

BIODIVERSIDAD DE ORQUÍDEAS DEL GÉNERO *PHRAGMIPEDIUM* Y LOS MARCADORES MOLECULARES DE ADN

Manuel Aníbal Rodríguez Salas



NOVO MUNDO

Manuel Aníbal Rodríguez Salas

Correo: marsarica@gmail.com

Perfil: Doctor en Ingeniería Ambiental.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1748-7997>

Afiliación: Universidad Nacional de Moquegua.

BIODIVERSIDAD DE ORQUÍDEAS DEL GÉNERO PHRAGMIPEDIUM Y LOS MARCADORES MOLECULARES DE ADN

Manuel Aníbal Rodríguez Salas



Todas nuestras publicaciones son sometidas a revisión doble-ciego de pares externos (*Peer Review Double Blind*ed).

Esta publicación cuenta con licencia Creative Commons Reconocimiento - NoComercial - SinObraDerivada 3.0 Unported License.



ISBN: 978-9942-7270-4-6

© Manuel Aníbal Rodríguez Salas

2024

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.13312572>

© Editorial Novo Mundo

Guayaquil, Ecuador.

www.editorialnovomundo.com

Queda prohibida la reproducción bajo cualquier modalidad de toda o una parte de esta obra sin autorización expresa del titular de los derechos.

Diseño de carátula y composición: Editorial Novo Mundo

Edición electrónica: Editorial Novo Mundo

Editado en Ecuador/ *Published in Ecuador*

BIODIVERSIDAD DE ORQUÍDEAS DEL GÉNERO PHRAGMIPEDIUM Y LOS MARCADORES MOLECULARES DE ADN

Manuel Aníbal Rodríguez Salas



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
INTRODUCCIÓN	11

CAPÍTULO I

NOCIONES CENTRALES DE LAS ORQUÍDEAS.....	14
1.1. Las orquídeas: distribución y biodiversidad	15
1.2. Tipología de las orquídeas, según su crecimiento.....	18
1.3. Descripción botánica de las orquídeas	19
1.3.1. Un panorama medular de la morfología de las orquídeas.....	20
1.4. La inflorescencia y polinización de las orquídeas	24
1.5. Taxonomía de la familia Orchidaceae	27

CAPÍTULO II

EL GÉNERO PHRAGMIPEDIUM Y SUS PRINCIPALES CARAC- TERÍSTICAS.....	30
2.1.Principales denominaciones y cualificaciones del género Phragmipedium	31
2.2.Descripción botánica del género Phragmipedium.....	32

2.2.1. Secciones del género <i>Phragmipedium</i>	33
2.2.2. Especies registradas del género <i>Phragmipedium</i>	35
2.2.3. Especies del género <i>Phragmipedium</i> en el Perú	35
2.3. Aspectos principales de la distribución geográfica del género <i>Phragmipedium</i>	41
2.2.3. Especies registradas del género <i>Phragmipedium</i>	43

CAPÍTULO III

ASPECTOS ESENCIALES DE LOS MARCADORES GENÉTICOS...44

3.1. Conceptos elementales de los marcadores genéticos.....	45
3.2. Marcadores morfológicos o fenotípicos	47
3.3. Marcadores basados en ADN o moleculares	48
3.4. Espaciadores transcritos internos (ITS) del ADN ribosomal	56

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD DEL GÉNERO PHRAGMIPE- DIUM DE ORQUÍDEAS PERUANAS A TRAVÉS DE MARCADO- RES MOLECULARES DE ADN 58

CAPÍTULO V

CONSIDERACIONES FINALES DE LA BIODIVERSIDAD DE LAS ORQUÍDEAS DEL GÉNERO PHRAGMIPEDIUM POR MEDIO DE MARCADORES MOLECULARES DE ADN 83

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	
<i>Flor de Cattleya máxima (una especie de orquídea)</i>	20
Figura 2.	
<i>Hojas de Helleborine que muestra su nervadura</i>	22
Figura 3.	
<i>Taxonomía de la familia Orchidaceae</i>	27
Figura 4.	
<i>Phragmipedium kovachii</i>	36
Figura 5.	
<i>Phragmipedium pearcei</i>	36
Figura 6.	
<i>Phragmipedium besseae</i>	37
Figura 7.	
<i>Phragmipedium caricinum</i>	38
Figura 8.	
<i>Phragmipedium boissierianum</i>	38
Figura 9.	
<i>Phragmipedium caudatum</i>	39
Figura 10.	
<i>Phragmipedium wallisii</i>	40
Figura 11.	
<i>Phragmipedium richteri</i>	41
Figura 12.	
<i>Distribución de Phragmipedium</i>	42
Figura 13.	
<i>Popularidad de los marcadores moleculares</i>	50
Figura 14.	
<i>Diagrama de repeticiones de ADN ribosomal</i>	56

Figura 15.

Corrida electroforética de ADN en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio de orquídeas del género Phragmipedium..... 68

Figura 16.

Dendograma UPGMA de interrelaciones genéticas entre 8 especies de las cinco secciones del género Phragmipedium basado en el coeficiente de similaridad genética usando 732 marcadores de AFLP..... 74

Figura 17.

Dendograma por el método complete en 8 especies del género Phragmipedium usando 732 marcadores de AFLP..... 76

Figura 18.

Dendograma por el método manhattan y el método complete en 8 especies del género Phragmipedium usando 732 marcadores de AFLP..... 76

Figura 19.

Dendograma por el método manhattan y el método Mcquitty en 8 especies del género Phragmipedium usando 732 marcadores de AFLP..... 77

Figura 20.

Dendograma y el método Mcquitty en 8 especies del género Phragmipedium usando 732 marcadores de AFLP..... 77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	
<i>Distribución de las orquídeas en continentes</i>	16
Tabla 2.	
<i>Ventajas y limitaciones del RAPD</i>	52
Tabla 3.	
<i>Ventajas y desventajas de la SSR</i>	53
Tabla 4.	
<i>Ventajas y limitaciones del AFLP</i>	55
Tabla 5.	
<i>Solución para la digestión del ADN</i>	61
Tabla 6.	
<i>Solución de ligación de adaptadores</i>	62
Tabla 7.	
<i>Solución de reacción de preamplificación</i>	63
Tabla 8.	
<i>Solución de reacción de amplificación selectiva</i>	64
Tabla 9.	
<i>Diluciones de ADN utilizadas en las reacciones de AFLP para cada especie de orquídeas del Género Phragmipedium</i>	69
Tabla 10.	
<i>Número de bandas producto de PCR obtenidas por diferentes combinaciones de Primers en el Análisis de AFLP del género Phragmipedium.</i>	71
Tabla 11.	
<i>Marcadores exclusivos de Phragmipedium kovachii con diferentes combinaciones de primers</i>	72
Tabla 12.	
<i>Coeficiente o distancia de similaridad de las relaciones genéticas entre 8 especies de las cinco secciones del género Phragmipedium usando 732 marcadores de AFLP</i>	75

INTRODUCCIÓN

La orquídea pertenece a la familia Orchidaceae, la cual es una de las familias botánicas más compleja de catalogar y evaluar. Esta planta se caracteriza por sus flores, debido a sus colores, forma, tamaño y olor. Además, las orquídeas comprenden de tipos según su ubicación; por ejemplo, en las zonas tropicales, la mayoría de orquídeas son epífitas y la gran mayoría de esta clase son atractivas; en cambio, en las zonas templadas se encuentran las orquídeas terrestres donde yacen orquídeas poco atractivas.

El Perú presenta una gran riqueza de diversidad de orquídeas, debido a la variedad de microclimas y pisos ecológicos. Sin embargo, del total de especies de orquídeas, 301 se encuentran categorizadas como amenazadas, de ellas 62 se encuentran en categoría en peligro crítico, 19 en categoría peligro y 220 especies en categoría vulnerable. Durante el 2016 hubo 13 intervenciones a nivel nacional donde se decomisó aproximadamente 752 ejemplares de orquídeas, la mayoría proveniente de la selva central (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, 2020).

Esta problemática se debe a dos factores: depredación selectiva de especies con fines comerciales y la destrucción masiva de hábitats debido a la extracción maderera y a la agricultura migratoria. Debido a ello, se está tomando medidas de prevención y control con la finalidad de preservar estas especies a través de los marcadores genéticos, el cual viene a ser, según Turchetto et al. (2017), cualquier rasgo visible de carácter fenotípico que es analizado para identificar el ADN y su variación.

Con respecto a las orquídeas del género *Phragmipedium*, se caracterizan por ser plantas terrestres, epífita en ciertos casos, sus raíces son más o menos carnosas y vellosas, presentan pocas flores relativamente grandes, con un labio en forma de zapatilla; por ello, en la mayoría de esta especie la denominan zapatito o zapatillas.

En el país se encuentran 10 especies de este género *Phragmipedium*, las cuales son *P. pearcei*, *P. besseae*, *P. caricinum*, *P. boissierianum*, *P. caudatum*, *P. wallisii*, *P. czerwiakowianum*, *P. richteri*, *P. reticulatum* y *P. kovachii*. Estas especies están distribuidas en algunas regiones del país, como por ejemplo San Martín, Huánuco, entre otros. Además, se está realizando estudios de preservación ya que *Phragmipedium kovachii* se encuentra en peligro de extinción. Asimismo, se está mostrando interés sobre el estudio de estas especies a través de diversas técnicas de marcadores moleculares basados en el ADN.

En este sentido, en el primer capítulo se desarrolla acerca de las nociones centrales de la orquídea, así como su distribución, características, tipología, morfología, inflorescencia y polinización, y la taxonomía de la familia Orchidaceae, los cuales explica el porqué es la especie más comercializada y valorada por las personas.

En el segundo capítulo se detalla sobre nociones generales del género *Phragmipedium*, así como también las características de las 10 especies de *Phragmipedium* que se encuentran en el Perú.

En el tercer capítulo se aborda sobre los aspectos esenciales de los marcadores genéticos, como conceptos elementales de los marcadores genéticos, morfológicos y moleculares o basados en ADN, donde este último presenta cuatro marcadores: el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), los microsatélites (SRR) y el polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).

Por último, en el cuarto y quinto capítulos se detalla sobre el análisis de la biodiversidad del género *Phragmipedium* de orquídeas peruanas a través de los marcadores moleculares de ADN y las generalidades finales, respectivamente.

CAPÍTULO I

NOCIONES CENTRALES DE LAS ORQUÍDEAS

Las orquídeas representan a uno de los grupos familiares más grandes de angiospermas; sin embargo, se sitúan dentro de las categorías de plantas con mayor vulnerabilidad a causa de la sobreexplotación, el tráfico ilegal de plantas, la pérdida de su hábitat, los efectos del cambio climático y, principalmente, su alta dependencia de las condiciones bióticas y abióticas. Esta situación de vulnerabilidad genera que varios países y autoridades internacionales desarrollen programas y actividades orientadas a su conservación (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2017).

Alrededor de nuestro planeta, las orquídeas son un conjunto de plantas representativo de la diversidad biológica, puesto que posee un aproximado de 35 mil especies con una capacidad evolutiva en términos morfológicos. Estas plantas presentan gran variedad de colores, diversidad en su estructura, un agradable aroma y forman hermosos paisajes al extenderse por una zona específicas. Por tales motivos, esta planta goza de alta demanda en el sector del comercio (Gutiérrez, 2020).

Por lo señalado, se deduce que esta planta posee gran diversidad y abundancia alrededor del planeta, por lo que es necesario conocer su distribución, características botánicas y entre otros aspectos relevantes. Al respecto, Štípková *et al.* (2021) afirman que conocer los patrones de abundancia, distribución, riqueza y composición de las orquídeas es un hecho primordial para realizar planes sobre estrategias de conservación de estas plantas e identificar las zonas que merecen protegerse con prioridad.

A partir de tal afirmación, se reafirma que es importante conocer los aspectos esenciales de las orquídeas con la finalidad de elaborar procesos que cooperen con el mantenimiento de su diversidad de especies.

1.1. Las orquídeas: distribución y biodiversidad

Las orquídeas se han distribuido y colonizado todos los continentes que poseen gran cantidad de vegetación e, incluso, se han ubicado en un gran número de islas subantárticas. Estas plantas tienen uno de los rangos de latitud más amplios, considerando todas las familias registradas de plantas y pueden asentarse en una extensa gama de hábitats en formas epífitas, terrestres y hasta subterráneas (Gaskett y Gallagher., 2018). La posibilidad de encontrar a las orquídeas en distintos espacios de la esfera terrestre es un factor que contribuye con el uso exacerbado de esta planta.

En cuanto a su biodiversidad, las orquídeas o familia *Orchidaceae* es estimada como el segundo grupo botánico con más diversidad de especies con flores en el mundo, aproximadamente con 28 000 especies. En la mayoría de países de América Tropical, es considerada como la familia con flores más diversa y se distinguen por su rasgo epífito. Esta biodiversidad es posible, dado que las orquídeas pueden presentarse en diversos ecosistemas neotropicales como los bosques de tierra baja con altas precipitaciones o con lluvias estacionales y los bosques montanos nubosos (Cascante-Marín y Trejos, 2019).

En lo que respecta a sus especies, las epífitas conforman el mayor número de orquídeas en el mundo y pueden crecer en lo alto de los bosques tropicales y al ras del suelo. La mayoría de las especies de orquídeas están sumamente especializadas para extenderse sobre un territorio y, con ayuda de condiciones específicas, prosperar; sin embargo, existen especies que no soy muy exigentes y no pueden desenvolverse en todos los hábitats (Cole y Waller, 2020).

Considerando su distribución por continente, es pertinente señalar países representativos que están enfrentando los problemas que afectan a las orquídeas. En tal sentido, en la Tabla 1, se observa que, en Asia, China, Tailandia e Indonesia son países con alta riqueza de orquídeas. En el continente africano, Madagascar concentra una de las mayores biodiversidades de flora y fauna, por ende, posee gran cantidad de especies de orquídeas. En América, Colombia y Ecuador posee la mayor riqueza de orquídeas del mundo; mientras que Brasil, al ser uno de los *hotspots* con mayor relevancia, también contempla gran riqueza de las plantas de orquídeas.

Tabla 1.
Distribución de las orquídeas en continentes

Continente	País	Especies	Géneros
Asia	China	1388 especies 291 especies endémicas	194 géneros 11 géneros endémicos
	Tailandia	1230 especies 150 especies endémicas	170 géneros
	Indonesia	197 especies	66 géneros
	Singapur	226 especies (178 extintas)	
	Nepal	104 géneros	18 especies

África	Madagascar	1000 especies	
América	Colombia y Ecuador	9000 especies (3000 en peligro de extinción)	
	Brasil	2553 especies 1636 especies endémicas	238 géneros 33 géneros endémicos

Nota. Adaptado de Tejeda-Sartorius et al. (2017)

De acuerdo con Gaskett y Gallagher (2018), la mayor diversidad en especies de orquídeas se encuentra en los continentes de Sudamérica (más de 12 000 especies), Asia (más de 8000 especies) y África. En cambio, los continentes de Norteamérica, Australia y Europa presentan una diversidad de orquídeas que no supera los 4000. En el caso del continente de la Antártida, este no presenta especies de esta planta.

Como se observa, la presencia de las orquídeas ocurre en todos los continentes, salvo la Antártida, y se ubica en las altitudes más extensas de cualquier otra familia de plantas, por lo que es plausible sostener que la vasta diversidad de este tipo de plantas está reflejada, en gran parte, en su amplia distribución por el mundo (Givnish *et al.*, 2016). Esto indica que las orquídeas pueden adaptarse a casi cualquier ambiente del planeta que habitamos, sin considerar los ambientes extremadamente fríos como las zonas antárticas.

Por su parte, Castillo y Carranza (2019) afirman que, en la actualidad, se ha registrado más de 30 mil especies de orquídeas, dispersas por diversos espacios geográficos del planeta, y es posible que se descubran más especies de esta planta mediante la exploración en nuevos territorios con fines botánicos. Asimismo, estos autores reconocen que las orquídeas no logran adaptarse a ambientes con temperaturas demasiado bajas o muy elevadas como los desiertos altamente cálidos y los extremos polares compuestos por hielo.

En resumen, las orquídeas presentan una evidente riqueza florística, reflejada en su cantidad de especies; esta riqueza puede ser el resultado de su habilidad para adaptarse a la mayoría de climas y suelos del planeta, sin embargo, la activa acción humana está ocasionando que la alta diversidad y la distribución mundial de esta planta se esté perdiendo conforme transcurren los años.

1.2. Tipología de las orquídeas, según su crecimiento

Como se ha señalado, las orquídeas pueden distribuirse por diversos espacios del mundo y esto es, en parte, por su capacidad de interacción con los agentes que intervienen en los territorios y a sus diversas formas de crecimiento. Con base en su crecimiento, Castillo y Carranza (2019) señalan los siguientes tipos de orquídeas:

- **Orquídeas terrestres.** Aquellas que, por medio del surgimiento de cormos o tallos bajo la superficie terrestre, logran acumular nutrientes y agua para su vida y crecimiento.
- **Orquídeas de litófito o rupícola.** Aquellas que se expanden por peñascos rocosos o encima de rocas calizas con el fin de obtener componentes nutritivos para su diversidad.
- **Orquídeas epífitas.** Aquellas que permanecen, a lo largo de su existencia, sobre otras plantas (principalmente arbóreas) sin perjudicar la vida de estas últimas. Este crecimiento se considera como el más visto en orquídeas.

Por su parte, Tobar-Suárez *et al.* (2018) indican que, de manera general, las orquídeas tienden a contemplar dos formas (también llamados hábitos) de crecimiento, los cuales son los siguientes:

Crecimiento monopodial

En el crecimiento monopodial, existe la probabilidad de que el tallo de la orquídea crezca de forma apical; en otros términos, con dirección longitudinal sin una forma definida, puesto que el brote constante de las hojas ocurre desde un punto de la parte superior de la planta. Troiani *et al.* (2017) añade que este crecimiento es lateral y permite que el tallo principal crezca más que las ramas; asimismo, las plantas con este crecimiento tienden a estructurarse de manera cónica.

Crecimiento simpodial

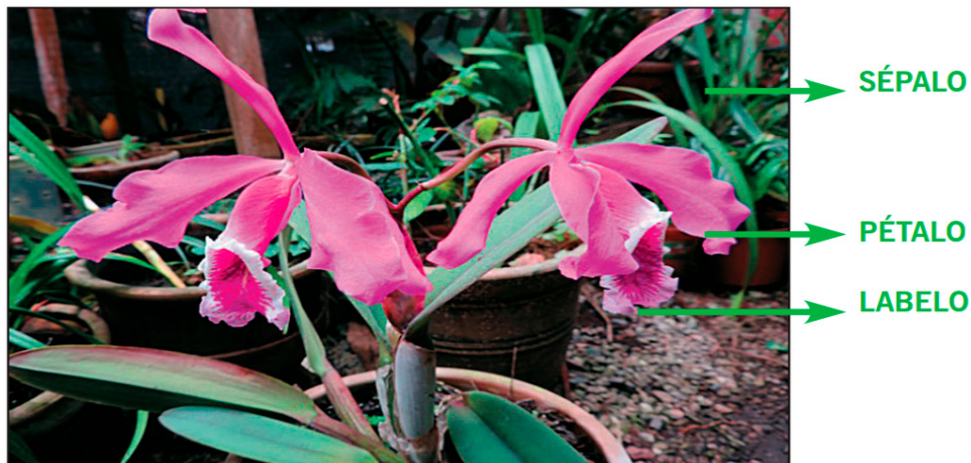
En el crecimiento simpodial, las orquídeas desarrollan un tallo o pseudobulbo, el cual posee un crecimiento definido, por lo que no puede crecer más tras la floración de la planta. Además, contrario al crecimiento monopodial, los brotes de las hojas toman lugar en la base o costados del tallo y pueden formar una sola unidad con tallo, hojas y raíz. Troiani *et al.* (2017) sostiene que este crecimiento, también, es lateral, posee ramas laterales con mayor desarrollo que el tallo principal y le confiere a la planta la adopción de una forma globosa o esférica.

1.3. Descripción botánica de las orquídeas

Las orquídeas son consideradas como vegetaciones ornamentales de alto valor estético, debido a la inigualable forma y color que poseen estas plantas. Por ende, estas características particulares han propiciado que las orquídeas reciban amplia atención de las personas cuando se busca adornar una zona específica (Farokhah *et al.*, 2018). Dado el interés mundial que emana de esta planta, se merece conocer aspectos esenciales de sus rasgos botánicos.

Figura 1.

Flor de Cattleya máxima (una especie de orquídea)



Nota. Tomado de Ministerio de Ambiente (2015)

En general, un rasgo característico de las orquídeas es la provisión de flores con, exactamente, tres sépalos y tres pétalos; uno de los pétalos se denomina labelo, debido que se ha modificado más y resulta ser más llamativo (Ministerio del Ambiente, 2017). Esta característica se aprecia en la Figura 1.

Por otro lado, es pertinente señalar que el término *orquídea* proviene del griego *Orchis* (testículo), dado que se relaciona con algunos tipos de la orquídea que presentan tubérculos bajo el ras de la tierra. Esta planta no solo se caracteriza por sus flores o tubérculos, sino también por otras características impactantes (Tobar-Suárez *et al.*, 2018).

1.3.1. Un panorama medular de la morfología de las orquídeas

Las orquídeas son consideradas como una de las familias que contiene gran diversidad morfológica y estrategias para atraer a polinizadores,

dado que casi la mayoría de sus especies (97 %) precisa de un intermediario (generalmente invertebrados) que posibilite la fecundación en las flores (García-Franco, 2017). Por tanto, es claro que esta planta posee diversas formas de morfología, debido a varios factores como sus flores, el crecimiento de su tallo.

En general, las orquídeas son plantas herbáceas permanentes, estáticas al suelo y no leñosas, generalmente epífitas, autótroficas y, pocas veces, micoheterótroficas. Sus raíces se logran desarrollar de manera fortuita y sus tallos tienden a ser delgados, alargados y redondos. En cuanto a sus hojas, estas son simples, basales y alternas con bordes enteros. Estas plantas también presentan inflorescencia y rasgos relacionados con la producción de flores (Tobar-Suárez *et al.*, 2018).

Por su parte, Cole y Waller (2020) indican que estas plantas poseen raíces carnosas, tubérculos e, incluso, rizomas; sin embargo, estos no son las únicas características de las orquídeas. Por ello, es preciso brindar una descripción general de las partes de estas plantas como sus hojas y flores.

Hojas de las orquídeas. Las orquídeas, en su mayoría, desarrollan hojas que poseen una distribución de nervios (nervadura) paralela o reticulada y bordes generalmente enteros (Ver Figura 2). Según se registra en las investigaciones sobre estas plantas, es posible evidenciar tres clases de hojas: plegada, cilíndrica y conduplicada (Ministerio del Ambiente, 2017).

Se conoce que las orquídeas son monocotiledóneas y, dado ello, las plantas jóvenes producen una sola hoja al germinar. Estas hojas no tienen pedúnculo ni divisiones y tienden a estar a la misma altura (cerca o sobre el suelo) en algunas orquídeas. En ciertas especies, es posible que las hojas se entrelacen y, en especies con escasa clorofila, las hojas se muestran como escamas que rodean el tallo (Cole y Waller, 2020).

Figura 2.

Hojas de Helleborine que muestra su nervadura



Nota. Tomado de Cole y Waller (2020)

Raíces de las orquídeas. La mayoría de las orquídeas poseen una raíz con velamen, este último es una porción de epidermis conformada por varias capas de tejido muerto en su estado adulto y que puede contener hongos. Estas raíces intervienen en la absorción de nutrientes y en la protección de la radiación ultravioleta del sol. Al tener un comportamiento de monocotiledónea, las orquídeas no cuentan con raíces principales y su sistema radicular solo es producto de raíces secundarias que se desprenden del tallo. Estas raíces pueden ser delgadas y de tejidos fibrosos o de ancho grosor (Tobar-Suárez *et al.*, 2018).

Tallos de las orquídeas. Los tallos de las orquídeas están inclinados a ser pseudobulbos o modificados, alargados y a poseer un vasto número de entrenudos. Por otro lado, estas plantas también pueden presentar, sorprendentemente, tallos sin entrenudos, lisos o arrugados y con o sin presencia de costillas. Estos últimos tallos suelen cubrirse por hojas modificadas en su estado adulto (Ministerio del Ambiente, 2017).

Los tallos también pueden ser rizomas, es decir, tallos horizontales que evolucionan en el exterior o interior del suelo de la planta y, generalmente, formado por tallos sucesivos, de los cuales nacen las raíces. Este rizoma puede tener una forma corta y no tan perceptible en algunas de

las especies de orquídeas; sin embargo, otras especies tienen un rizoma notorio, alargado y consistente (Tobar-Suárez *et al.*, 2018).

Para precisar más sobre los pseudobulbos, estos difieren de los bulbos de otras plantas como lirios, tulipanes, cebollas, entre otras, puesto que estos se describen como una porción engrosada del tallo que cumple la función de almacenar diversos nutrientes para el desarrollo de la vegetación en la planta; sin embargo, un pseudobulbo se encarga de muchas más actividades como el inicio de las inflorescencias y el proceso de floración. En cuanto a la forma de los pseudobulbos, esta puede ser reducida y esférica, grande y arrugada, aplanada y ovalada. Es posible encontrar formas más comunes en algunos géneros como *Dendrobium*, donde los pseudobulbos posibilitan un periodo inactivo o decadente de la planta y un periodo reluciente (Schiff, 2018).

Frutos de las orquídeas. El fruto de estas orquídeas surge por medio del ovario de las orquídeas y después del proceso de polinización. En los ovarios, se desarrollan miles de óvulos, los cuales, a su vez, originan las semillas tras un proceso de fertilización. Al final de este último proceso, ocurre la apertura de los frutos. Estos frutos pueden poseer una morfología de cápsula o de baya con numerosas semillas (Tobar-Suárez *et al.*, 2018).

En general, los frutos de estas plantas suelen ser cápsulas que pueden contener, alrededor, de miles semillas de diminuto tamaño. Precisamente, la cantidad de semillas en el interior de la cápsula es un factor dependiente de la especie de orquídea, por ello, es posible encontrar frutos con 100 e, incluso, con miles de semillas (Ministerio del Ambiente, 2017).

Flor de las orquídeas. Las flores de una orquídea son la parte más fundamental, dado que son muy demandadas por las formas y cumplen funciones esenciales como la polinización de la planta, por ello, es preciso conocer más sobre este órgano vegetal. Al respecto, Cole y Waller (2020), desde un enfoque general, señalan que las orquídeas tienen múltiples flores que surgen desde el tallo o están unidas al tallo. Estas flores poseen una

bráctea (hoja modificada) debajo del punto que se inserta entre la flor y el tallo. Asimismo, la estructura de la flor es de mucha simpleza y posee una simetría vertical, compuesta por pétalos y sépalos que protegen a la flor en su capullo. Cuando estos componentes se abren, los sépalos se ubican detrás de los pétalos, estos últimos pueden ser muy similares a los sépalos en algunas especies de orquídeas y muy distintos en otras especies.

Dentro de su estructura interna, las flores de las orquídeas se componen de un ovario y un perianto con un verticilo externo, el cual consiste en la agrupación de los sépalos y pétalos. En los géneros *Catasetum* y *Cycnoches*, las flores solo pueden ser o bien masculinas o bien femeninas, por ello, estas carecen de granos de polen o estigma (Tobar-Suárez *et al.*, 2018).

Por otro lado, la mayoría de las flores de orquídeas se comportan como hermafroditas y sus órganos sexuales masculinos (antera) y femeninos (estigma) son agrupados dentro de un mismo lugar, denominado columna, y apenas separados por la membrana rostelo (*rostellum*). Las flores de orquídeas, generalmente, realizan una rotación particular, en la cual la flor, al abrirse, se coloca boca abajo y no boca arriba; esta posición es lo que las personas visualizan (Schiff, 2018).

1.4. La inflorescencia y polinización de las orquídeas

El término *inflorescencia* elude a un rebrote de flores y dicho rebrote puede ser uniflora (una sola flor) y pluriflora (dos a más flores). De acuerdo con el proceso de ramificación, la inflorescencia se puede clasificar en racimosas (crecimiento monopodial) y en cimosas (crecimiento simpodial) o también conocidas como definidas (Troiani *et al.*, 2017). Por ende, se comprende que la inflorescencia refiere a la nueva producción de flores en una planta.

En el caso de las orquídeas, sus diversos géneros y especies pueden presentar estos tipos de inflorescencia, por ello, es posible encontrar orquídeas ramificadas o racimosas, orquídeas con flores que nacen en tiempos

distintos o que surgen sobre un tallo separado (inflorescencia uniflora). Otros géneros como *Lockhartia* presentan inflorescencia cimosa, es decir, las flores se abren consecutivamente después de la abertura de la flor que se encuentra al final de la inflorescencia. Asimismo, las flores pueden estar agrupadas en corimbo, umbelas, entre otros. Por otro lado, las orquídeas con crecimiento simpodial pueden desarrollar una inflorescencia terminal, basal o lateral. En cambio, las orquídeas con crecimiento monopodial, en toda oportunidad, presentan inflorescencia axilar (Tobar-Suárez *et al.*, 2018).

Por tanto, la inflorescencia de las orquídeas se puede definir como la porción floreciente de la planta que adquiere diversas formas (panículas, racimo, escapo, entre otros más), el cual, convencionalmente, refiere al pico sin considerar la forma o estructura de la planta (Schiff, 2018).

De acuerdo con Menchaca (2011), la inflorescencia de las orquídeas puede ser clasificadas bajo dos criterios: según su inserción en la planta y según su forma. De acuerdo con su inserción, la inflorescencia puede ser axilar (la vara floral surge entre el tallo y la hoja), basal (la vara floral nace desde la base del pseudobulbo) y terminal, cuando la vara o raíz erosiona desde el pico de pseudobulbo. Considerando la forma, la inflorescencia puede ser espiga (flores surgidas desde una vara central), panícula (tallo con varias ramificaciones de flores), racimo (flores nacidas de una ramificación de la vara floral) y umbrela (flores ubicadas al final de la vara). Es preciso señalar que la vara floral es similar a la raíz; sin embargo, tiende o adquirir un color verdoso.

En cuanto a la polinización, las orquídeas son muy bien conocidas por sus mecanismos de polinización, los cuales han evolucionado para cumplir el desarrollo del apareamiento de diversas plantas o la alogamia (*cross-fertilization*). Las flores de la mayoría de plantas y, por supuesto, de las orquídeas contienen órganos sexuales para ambos sexos. Por el contrario, se destaca que la autopolinización no es lo deseable en las plantas tal como ocurre en los animales (Chase *et al.*, 2018).

Dentro de la polinización de las orquídeas, dos fases fundamentales, vinculadas estrechamente con el polinizador, toman lugar: atracción y recompensa. En la primera etapa, la planta debe implementarse de aspectos atrayentes (colores y fragancias) para captar la atención del animal (polinizador). En la posterior etapa, la planta debe otorgar recompensas (perfumes, néctar o cera) a su polinizador; sin embargo, no todas las orquídeas cumplen con esta fase a fin de reservar energía y emplean otras herramientas de atracción. En un marco general, la recompensa más común de estas plantas es el polen (Tobar-Suárez *et al.*, 2018). Otras herramientas de atracción que usan las orquídeas pueden ser la simulación de néctar, de polen o de estructuras similares a un animal para producir atracción sexual (Serra *et al.*, 2019).

Si estas dos fases se realizan adecuadamente, se produce el éxito de la polinización y, por ende, el tubo del pondeo se desarrolla y el ovario floral se infla para formar la cápsula llena de varias semillas. Después de una óptima maduración de la cápsula, las semillas son liberadas y dispersadas por el viento hasta que logren entablar un contacto con el sustrato o hábitat de la orquídea con el fin de empezar un proceso germinativo (Ray y Vendrame, 2018).

Por otro lado, no todos los insectos que se posan en un determinado lugar de las flores de las orquídeas logran realizar el transporte del polen, puesto que el animal debe tener características específicas que se ajusten a labor de un polinizador apropiado. Bajo un enfoque holístico, los polinizadores son potenciales cuando cooperan con la polinización sin estar adaptados a ellos. En contraste, los visitantes son polinizadores que transitan por la flor con otros fines como la caza de otros invertebrados (Serra *et al.*, 2019).

Estos dos mecanismos son muy importantes para el surgimiento de frutos de la mayoría de orquídeas, puesto que la inflorescencia permite la formación morfológica, aromática y atractiva de las flores con el fin de atraer a los animales y el proceso de polinización cumple con la función de dar origen a los frutos. Por otro lado, la inflorescencia es un hecho que también

afecta la valorización de las orquídeas por parte del humano y, por ende, al comercio de flores.

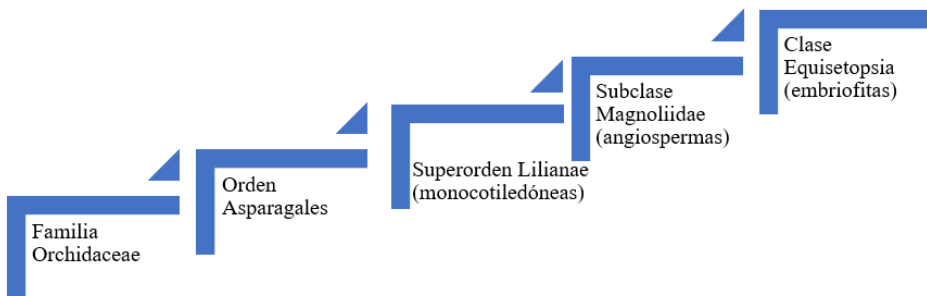
1.5. Taxonomía de la familia Orchidaceae

De acuerdo con la historia, las orquídeas fueron poblando Europa a mediados del siglo xviii, debido los viajes de los exploradores en continentes como África, Asia y América. Esta extensión de las orquídeas generó que el botánico francés, Joseph Pitton de Tournefort, distinguiera a las orquídeas como una nueva familia de plantas por primera vez. A través del tiempo, surgieron nuevos estudios como los de Carl Linnaeus y John Lindley; dichos estudios proporcionaron nuevos géneros y nuevas especies de orquídeas, modificaron ciertos géneros y, a su vez, renovaron las clasificaciones que se habían efectuado previamente (Schiff, 2018).

En la actualidad, la taxonomía de las orquídeas es un tema inestable, puesto que, conforme pasan los años, están en constante cambio y desarrollo. Estos cambios tienden a ser el producto de los avances y la minuciosidad de los análisis genéticos, los cuales pueden revelar sorprendentes relaciones entre taxones y rechazar totalmente teorías antiguas, que poseían años de aceptación (Cole y Waller, 2020).

Figura 3.

Taxonomía de la familia Orchidaceae



Nota. Tobar-Suárez et al. (2018)

Estos constructos de clasificaciones taxonómicas son promovidos por el ser humano al tratar de organizar, denominar y estructurar los componentes del universo. En el caso de las orquídeas, el hombre ha elaborado un sistema de clasificación taxonómica que, conforme a ciertos criterios, logra abarcar el tronco genealógico de la familia y organizar la familia Orchidaceae —tal como se percibe en la Figura 3— dentro de un respectivo orden, superorden y otras categorías de mayor jerarquía.

La familia Orchidaceae, a su vez, se divide en varios géneros, los cuales también poseen una división de cuatro rangos: especie, subespecie, variedad y forma. Las especies refieren a todas las orquídeas similares que pueden realizar procesos de intercambio de género y la subespecie está un rango debajo de la especie. En lo que respecta a variedad y forma, estas son rangos menores, en los cuales se presenta, al menos, un rasgo morfológico diferente a los miembros de la subespecie (Cole y Waller, 2020).

Por otro lado, es posible encontrar que la taxonomía de la familia Orchidaceae es dividida en cinco grupos denominados subfamilias, los cuales son *Apostasioideae*, *Vanilloideae*, *Cypripedioideae*, *Orchidoideae* y *Epidendroideae*. Estas familias, de igual manera, se fraccionan en géneros y especies (Chase *et al.*, 2017).

De acuerdo con Tobar-Suaréz *et al.* (2018), la subfamilia *Apostasioideae* es la menos diversa y se conforma de, aproximadamente, dos géneros y 16 especies. La subfamilia *Vanilloideae* muestra un poco de más variedad y se compone de 14 géneros y 250 especies. La subfamilia *Cypripedioideae*, en cambio, se compone solo de cinco géneros y 150 especies. Por el contrario, la subfamilia *Orchidoideae* posee una variedad totalmente más elevada que las tres primeras, dado que se constituye de 5000 especies y varios géneros. Finalmente, la subfamilia *Epidendroideae* evidencia la mayor riqueza florística de la familia con 20000 especies y numerosos géneros como los epífitos.

En síntesis, las orquídeas son una de las plantas más diversas de la naturaleza con más 30 mil especies, las cuales cumplen varios procesos importantes como la fotosíntesis, la polinización y la inflorescencia con la finalidad de aportar a su ciclo de vida. Las flores, hojas, tallos y pseudobulbos son aspectos morfológicos de mucha importancia, dado que otorgan un paisaje espléndido a los ambientes habitados por los humanos.

CAPÍTULO II

EL GÉNERO PHRAGMIPEDIUM Y SUS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS

El género *Phragmipedium* es aquel que engloba un conjunto delimitado de orquídeas que viven en entornos terrestres húmedos, secos o rocosos. Tienen estambres de degeneración en forma de pantalla, largos, como la barba de pétalos y tres cuartos del ovario. Los labios en forma de saco están curvados hacia adentro. Las hojas puntiagudas miden unos 80 cm de largo. En los tallos y los bulbos, de unos 80 cm de largo, crecen dos o tres flores (Szlachetko *et al.*, 2020).

Hay muchas especies mixtas entre las especies de *Paphiopedilum*, pero la especie híbrida con *Paphiopedilum* es muy rara. *Paphiopedilum americana* se encuentra ahora bajo la protección del Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. La abreviatura de este género en el comercio hortícola es Phrag (Muñoz *et al.*, 2010).

El Perú posee 10 especies del género *Phragmipedium*: *P. pearcei*, *P. besseae*, *P. caricinum*, *P. boissierianum*, *P. caudatum*, *P. wallisii*, *P. czerwiakowianum*, *P.*

richteri, *P. reticulatum* y *P. kovachii* que están distribuidas en las diferentes regiones del país como en San Martín, Huánuco, Cerro de Pasco, entre otros. Sin embargo, algunas de estas especies se encuentran en extinción como el caso de *Phragmipedium kovachii*, la cual está siendo estudiada para su conservación en los laboratorios de la Universidad Nacional de San Martín. Además, según el Ministerio del Ambiente (2017), esta especie es endémica, ya que está limitada a una zona geográfica específica, y en este caso solo se concentra en el Bosque de Protección Alto Mayo.

2.1. Principales denominaciones y cualificaciones del género *Phragmipedium*

El término *Phragmipedium*, según Starks *et al.* (2012), proviene de los nombres *phragma* ‘separación’ y *pedium* ‘zapatilla’. El género *Phragmipedium* fue descrito por primera vez por el naturalista brasileño, José Velloso, en 1831. En 1896, el botánico inglés Robert Rolfe dividió el macrogrupo *Cypripedioideae* en cuatro géneros: *Paphiopedilum*, *Phragmipedium*, *Selenipedium* y *Cypripedium*. En 1975, el décimo segundo Congreso Botánico Internacional de Leningrado consolidó el nombre moderno del género, asimismo, *Uropedium* y *Phragmopedilum* fueron reconocidos como sinónimos (Pupulin y Díaz-Morales, 2018).

Otras denominaciones se interrelacionan con sus características botánicas, por lo que una de los principales calificativos taxonómicos básicos de las plantas de este género son terrestres, saxícolas y epífitas. Este género también se cualifica respecto a su modalidad de reproducción, esto es, se propone que es capaz de producir semillas de flores de polinización propia y cruzada. Esta acción, desde una perspectiva botánica, la diferencia de otras especies vegetales que se relacionan con ella anatómicamente. (Romero, 1996).

Otra de las principales calificaciones se involucra con el nivel de utilidad de las orquídeas para quienes las cultivan. De manera general, las orquídeas de las *Cypripedioideae* cumplen el rol central de la gestión de la tierra,

la protección de la tierra, la legislación y la política en el manejo de los incentivos económicos. Para las orquídeas de *Cypripedilinae*, *Dendrobieae* y *Vandaeae*, había prioridades similares, aunque los incentivos económicos eran menos importantes. En cambio, los incentivos económicos fueron importantes para las orquídeas de *Epidendreae*, *Malaxideae* y *Phragmipediaceae*. Para algunos pueblos originarios, había prioridades específicas, como para las orquídeas de *Cranichideae* la protección de la tierra (Wraith, 2020).

2.2. Descripción botánica del género *Phragmipedium*

El género *Phragmipedium* se caracteriza por ser humicultural, saxícolas o terrestres plantas, rara vez epífita, baja y herbácea, sin pseudobulbos o bulbos verdaderos, casi tallos en la mayoría de los casos, con un máximo de sesenta centímetros de altura. Sus raíces son más o menos carnosas y vellosas; inflorescencias terminales, simples, raramente ramificadas, con una o pocas flores relativamente grandes, con un labio saciforme o en forma de concha como una zapatilla. Tienen dos estambres desarrollados, y un tercer saminoide estéril, modificado en una estructura con un extremo ensanchado, formando un disco horizontal, similar a un escudo, que cubre a las dos anteras y los tres estigmas fértiles. El polen es suelto, granular, no agregado en madejas (Alwood y Dressler, 1998).

Las configuraciones biológicas, de acuerdo con los postulados de Cullina (2004), influyen en el cultivo de especies de *Phragmipedium*, por lo que, se cultivan con mayor frecuencia en los jardines de especialistas en cuidado de orquídeas, debido a su rectitud en los procedimientos de limpieza y riego de los constituyentes del vegetal. En suelo, con una mezcla de fibra de helecho arborescente, arena y carbón vegetal, en lugares poco soleados y muy húmedos, les va muy bien. Son plantas sensibles a la calidad del agua, que no deben tener demasiadas sales disueltas en su composición.

El sistema reproductivo en *Phragmipedium*, *verbi gratia*, *Phragmipedium longifolium* se manifiesta mediante las autopolinizaciones y polinizaciones

cruzadas manuales, los cuales no influyen en la producción de frutos entre las flores de autopolinización y las de polinización cruzada. Otro de los mecanismos con los que se explicitan las características reproductivas es el conjunto de tipos de tricomas glandulares en los pétalos de las tres especies. Se propone que, posiblemente, estén implicados en la secreción de fragancias con el objetivo de atraer a los agentes polinizadores (Goldingay y Carthew, 1998).

2.2.1. Secciones del género *Phragmipedium*

El género *Phragmipedium* se divide en las siguientes secciones: el primero es *Phragmipedium*, dividido en *P. caudatum*, *P. exstaminodium*, *P. lindenii*; el segundo, *Himantopetalum*, clasificado en *P. caricinum*, *P. christianseanianum*, *P. pearcei*, *P. klotzscheanum*, *P. richteri*, *P. tetzlaffianum*; el tercero, *Platypetalum*, subdividido en *P. lindleyanum*; el cuarto, *Lorifolia*, delimitado por *P. boissierianum*, *P. hirtzii*, *P. longifolium*, *P. vittatum*; el quinto, *Micropetalum*, en el que se implican *P. besseae*, *P. besseae* var. *dalessandroi*, *P. fischeri*, *P. kovachii*, *P. schlimii*; el sexto, *Schluckebieria*, en el que se evidencia *P. kovachii* (Dressler y Pupulin, 2011).

El número exacto de especies es discutido aún por los especialistas: Gruss reconoce 20 especies, frente a las 15 especies aceptadas por McCook. La mayoría de las especies de *Phragmipedium* son terrestres, epífitas o litófitas. Presentan un estaminodio único en forma de escudo, pétalos largos y con forma de bigote y un ovario de tres lóbulos. El gran labio en forma de bolsa está curvado hacia dentro en los márgenes. Las hojas agudas alcanzan una longitud de unos 80 cm. El tallo carece de pseudobulbos y crece unos 80 cm de altura, mostrando dos o tres flores (Silvera *et al.*, 2005).

Una de las especies destacadas es *Phragmipedium besseae*, la cual fue encontrada por primera vez en Perú por Elizabeth Locke Besse en 1981. Poco después, el yacimiento fue saqueado y destruido por cazadores de orquídeas. Por suerte, se conservaron suficientes semillas para evitar la extinción. Esta orquídea es inusual, porque sus flores tienen un color rojo

anaranjado brillante hasta casi un rojo salmón fuerte (también hay una variedad amarilla), no visto en ninguna orquídea zapatilla de dama. Los pétalos, de forma ovalada, son anchos. Las estrechas hojas tienen forma elíptica. Desde entonces se ha utilizado mucho en la hibridación (Schiff, 2018).

La *Phragmipedium caudatum* se considera una orquídea con una anatomía compleja, es decir, podría contener varias especies o subespecies, basándose en las diferencias de tamaño y color de las flores. Esta orquídea de tallo corto es semiterrestre, de semilitófito a epífita, dependiendo del sustrato. Las flores, de color crema, tienen rayas verdosas. Los pétalos laterales en espiral y caídos son de color rojo y muy largos, llegando incluso al suelo. Crecen en laderas húmedas y cubiertas de musgo (Gruss y Rohrl, 2009).

La *Phragmipedium lindleyanum*, denominada así por Lindley, forma una roseta de cinco hojas largas y lineales con un margen amarillo, que alcanza una longitud de 50 cm. El racimo erguido se extiende hasta el metro de altura. Tiene muchas flores y a veces está ramificado en la base. Las flores se abren sucesivamente, lo que da a la orquídea un largo período de floración. Las flores son verdes con venas marrones. El labio glabro, en forma de bolsa, es amarillo, con venas rojas (Unruh *et al.*, 2018).

La *Phragmipedium longifolium*, descrito en 1852 por Reichenbach y Warscewicz, tiene largas hojas laceoladas sin margen amarillo, que crecen hasta una longitud de 60 cm. La inflorescencia alcanza una longitud de un metro, con unas diez flores, que se abren sucesivamente. Los largos pétalos laterales son de color verde violáceo. El labelo glabro, más bien pequeño, es de color verde (Cribb y Rankou, 2017).

Los géneros aliados son *Paphiopedilum*, *Selenipedium*, *Cypripedium* y el monotípico *Mexipedium*. Por otro lado, se han registrado muchos híbridos interespecíficos. Se han realizado raros cruces entre *Phragmipedium* y *Paphiopedilum*. El género *Uropedium* Lindl se incluye generalmente en *Phragmipedium*. Esta orquídea se distribuye en los territorios amazónicos

y de bosques de alta montaña situados entre Venezuela y Ecuador (Pupulin y Díaz-Morales, 2018).

2.2.2. Especies registradas del género Phragmipedium

La especie *Phragmipedium caudatum* ha sido registrada en los países de Bolivia, Colombia, Ecuador, Nicaragua y Panamá (Ministerio del Ambiente, 2017). *Phragmipedium* es un género cuya cualificación geográfica es que las especies registradas se restrinjan a los trópicos y subtrópicos de América Central y del Sur. *Phragmipedium richteri* fue registrada en el departamento de San Martín.

2.2.3. Especies del género Phragmipedium en el Perú

- *Phragmipedium kovachii*. Es una especie que se encuentra en peligro de extinción, la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto está desarrollando protocolos para propagar de forma *in vitro*, con fines de conservación genética (Ruíz, 2021). *Phragmipedium kovachii*. se caracteriza por tener tres o seis hojas que miden hasta 64 cm de largo, además su flor es de color fucsia claro y puede alcanzar a 11 o 15 cm de ancho. Un dato resaltante es que esta especie endémica se encuentra únicamente en el Bosque de Protección Alto Mayo en San Martín (Ministerio del Ambiente, 2017).

Figura 4. *Phragmipedium kovachii*



Nota. Tomado del Ministerio de Ambiente (2017)

Como se observa en la Figura 4, esta especie presenta una particularidad llamativa por su color vistoso y por tener las flores más grandes.

- **Phragmipedium pearcei.** Presenta hojas lineares o lanceoladas de amarillo verdoso, los pétalos tienen patrones con líneas longitudinales. Está distribuida en los departamentos de San Martín y Madre de Dios (Ministerio del Ambiente, 2017).

Figura 5. *Phragmipedium pearcei*



Nota. Tomado del Ministerio de Ambiente (2012)

- **Phragmipedium besseae.** Presenta hojas coriáceas de color verde oscuro, puede llegar a medir hasta 70 cm de alto, sus flores son de color rojo brillante con marcas amarillas en la base de los pétalos y el labelo con forma de zapatilla; por ello, tiene como nombre común: zapatilla (Ministerio del Ambiente, 2017), así como se muestra en la Figura 6. Esta especie se encuentra en los departamentos de Cajamarca y San Martín.

Figura 6.

Phragmipedium besseae



Nota. Tomado de Elicriso. Revista sobre el entorno y la naturaleza (s.f.)

- **Phragmipedium caricinum.** Esta especie se caracteriza por presentar hojas largas y onduladas, cuyos colores son verde con líneas marrones. Tiene un sépalo en la parte superior que termina en punta, también presenta líneas de color verde oscuro. Su labelo presenta puntos en la parte superior y líneas marrones en la parte inferior, como se muestra en la Figura 7. Además, ha sido registrado en el departamento de San Martín.

Figura 7.

Phragmipedium caricinum



Nota. Tomado de Elicriso. Revista sobre el entorno y la naturaleza (s.f)

- **Phragmipedium boissierianum.** Esta especie presenta una particularidad en sus hojas, debido a que son coriáceas con tonalidades verdes y marrones, incluso tienes unas líneas finas de color blanco; sus flores son muy llamativas de color verde claro con tonos amarillos, además, sus flores están fusionados con los sépalos, y se localiza en el departamento de San Martín (Ministerio del Ambiente, 2017).

Figura 8.

Phragmipedium boissierianum



Nota. Tomado del Ministerio de Ambiente (2017)

En la Figura 8 se muestra la estructura de *Phragmipedium boissierianum*, la cual tiene un aspecto particular debido a la unión de los sépalos con las flores, además, se caracteriza por tener una variedad de tonalidad del color verde.

- ***Phragmipedium caudatum***. También conocida como zapatito de la reina. Esta orquídea se caracteriza por tener un porte robusto y erguido, su tallo puede medir de 40 a 50 cm de alto. Sus flores son de color amarillo verdoso con tintes de café o púrpura, como aparece en la Figura 9. Esta especie se distribuye en las zonas de Cusco, Pasco, Huánuco, Junín y Puno (Ministerio del Ambiente, 2017).

Figura 9.

Phragmipedium caudatum



Nota. Tomado del Ministerio del Ambiente (2012)

- ***Phragmipedium wallisii***. Esta especie puede medir hasta 60 cm de alto, incluso sus hojas pueden alcanzar hasta 50 cm de largo. Sus flores se caracterizan por ser ondulados y ovalados, así como aparece en la Figura 10. Por último, se localiza en el departamento de San Martín (Ministerio del Ambiente, 2012).

Figura 10.

Phragmipedium wallisii

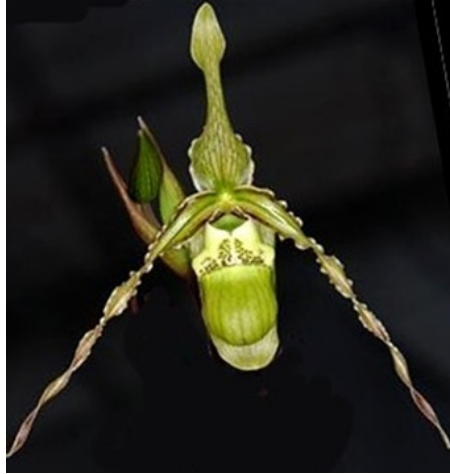


Nota. Tomado del Ministerio del Ambiente (2012)

- ***Phragmipedium czerwiakowianum***. Conocido como zapatito. Sus hojas son largas, delgadas y onduladas, cuyos colores son verde con morado y blanco. Los pétalos son muy finas y diminutas. Se encuentra en el departamento de Huánuco.
- ***Phragmipedium richteri***. Esta especie tiene sus flores de forma elíptica finas rayadas con unos puntos en los bordes, su pétalo se caracteriza por tener una estructura geométrica de color verde con bordes blancos, así como se observa en la Figura 11. Además, se distribuye por el departamento de San Martín.

Figura 11.

Phragmipedium richteri



Nota. Tomado de Elicriso. Revista sobre el entorno y la naturaleza (s.f)

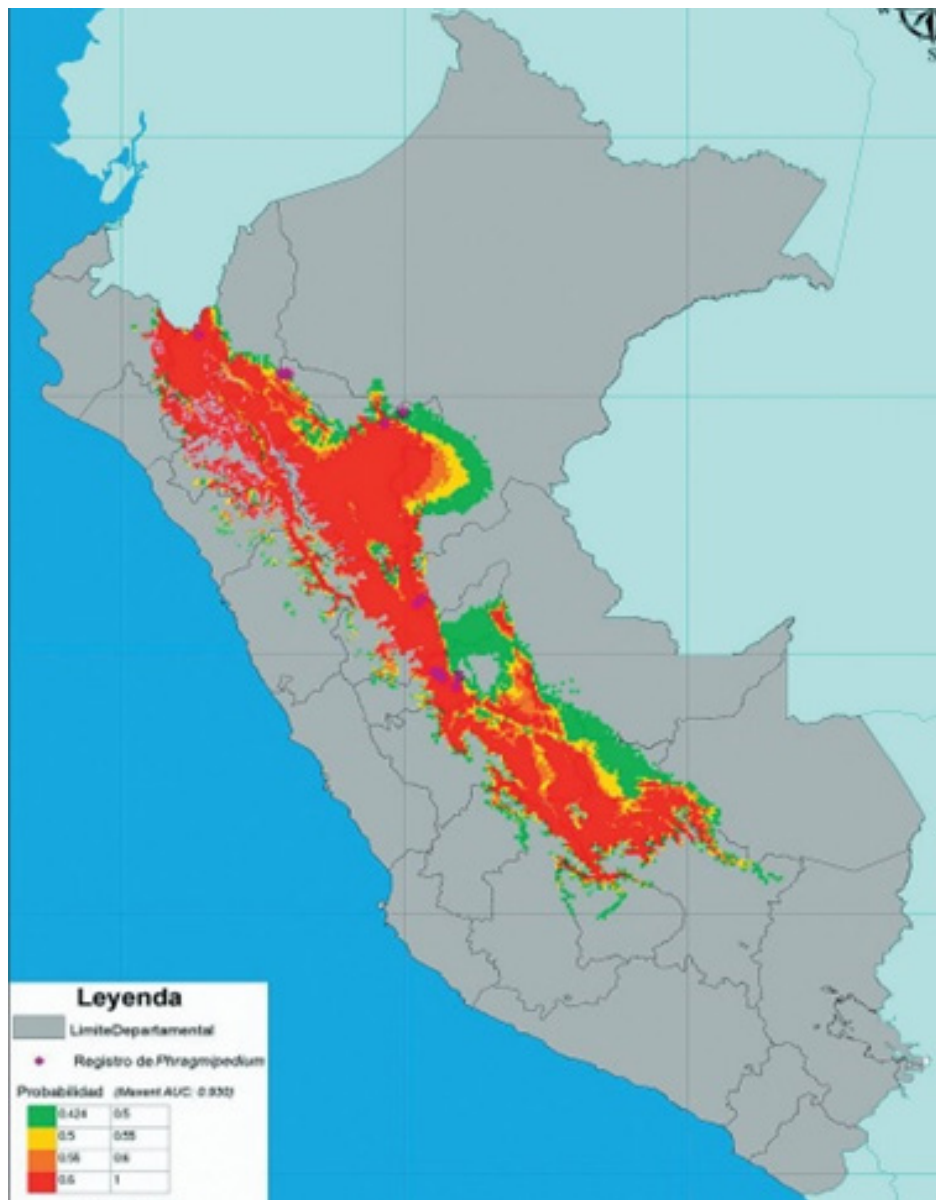
- **Phragmipedium reticulatum.** Los pétalos de esta especie son crespos. En los labelos de esta orquídea tiene una protuberancia en forma de cuernos (Ministerio del Ambiente, 2017).

2.3. Aspectos principales de la distribución geográfica del género *Phragmipedium*

Sobre la distribución del género *Phragmipedium*, esta especie crece en los bosques muy húmedos, desde el norte hasta el sur de los Andes Orientales (Ministerio del Ambiente, 2015). Además, este género es nativo del continente americano, aunque se ha encontrado en México meridional (Chiapas), en América central y del sur, en los países tales como Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela, Guyanas, Brasil, Panamá, y Costa Rica. En el caso del Perú, el género *Phragmipedium* se distribuye en la zona cálida y húmeda de los departamentos de San Martín, Cerro de Pasco, Huánuco, Loreto, Ucayali, Amazonas, así como se muestra en la Figura 12.

Figura 12.

Distribución de Phragmipedium



Nota. Tomado del Ministerio del Ambiente (2017).

Por otro lado, la especie *Phragmipedium caudatum* no solo se localiza en el país, sino también en Bolivia, Ecuador, Nicaragua y Panamá; así como el caso de *Phragmipedium besseae* está distribuida en Ecuador y Colombia; *Phragmipedium reticulatum* y *Phragmipedium czerwiakowianum* se localizan en Ecuador (Ministerio del Ambiente, 2017).

2.2.3. Especies registradas del género Phragmipedium

La especie *Phragmipedium caudatum* ha sido registrada en los países de Bolivia, Colombia, Ecuador, Nicaragua y Panamá (Ministerio del Ambiente, 2017). *Phragmipedium* es un género cuya cualificación geográfica es que las especies registradas se restrinjan a los trópicos y subtrópicos de América Central y del Sur. *Phragmipedium richteri* fue registrada en el departamento de San Martín.

CAPÍTULO III

ASPECTOS ESENCIALES DE LOS MARCADORES GENÉTICOS

En la diversidad genética se puede identificar tres atributos: composición, estructura y función. La composición es la identidad y variedad de los genes, la estructura viene a ser la cantidad y distribución de los genes dentro de la población de una especie; por último, la función implica los procesos evolutivos responsables de la variación de los genes en una población, lo cual forma una estructura genética de la diversidad. Por lo tanto, la diversidad genética presenta una organización compleja donde se observa el grado de similitud entre los pares de unidades, donde la variabilidad genética es objeto de estudio de la evolución (Caruso *et al.*, 2015).

Con respecto a los marcadores genéticos son elementos que permiten identificar la variación genética de una especie. Se puede identificar a través de una reacción de cadena de la polimerasa. Además, Barrientos (2017) señala que los marcadores genéticos son mutaciones que están ubicados en la secuencia del ADN, además, estas presentan un modo de herencia conocido y son relativamente fáciles de identificar. Asimismo, presentan

una posición conocida dentro del genoma y son analizados a través de técnicas moleculares.

Mayormente, los marcadores genéticos son utilizados para estudios de vegetales, y los resultados de estos marcadores se obtienen a través de diversas técnicas como polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo amplificado al azar (RAPD), polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), entre otros. La técnica de AFLP, según Remón y Peña (2018), contribuye a la exploración rápida de los polimorfismos del genoma.

Por otro lado, las tecnologías basadas en el empleo de marcadores moleculares son de utilidad para el estudio de similitud y distancia genética que ayuda a obtener una clasificación de los mismos en diferentes grupos. Además, Angarita *et al.* (2017) sostienen que las técnicas moleculares como RAPD y RFLP permiten el estudio de un genoma completo o secuencias específicas de ADN de secuencias largas o cortas con la finalidad de detectar y analizar secuencias de interés para las investigaciones relacionadas a la genética. En cuanto a la técnica de AFLP, Suárez-Contreras (2017) resalta la importancia de ella por su contribución al estudio de la biología molecular y genética

Por lo tanto, en este capítulo se desarrollará con mayor profundidad sobre las nociones elementales que están comprendidas por los marcadores genéticos y moleculares, así como las diversas técnicas mencionadas para el estudio genético y taxonómico de especies de flora.

3.1. Conceptos elementales de los marcadores genéticos

Un marcador genético es cualquier carácter o fenotipo visible que de alguna forma es analizada, los alelos o *loci* segregan del modo mendeliano, como el caso de los guisantes estudiados por Mendel. Los marcadores genéticos morfológicos fueron los primeros que se utilizaron e incluso ahora es la base del mejoramiento genético convencional (Turchetto *et al.*, 2017).

Entonces, con el avance de la ciencia, se puede decir que el marcador genético ha contribuido con el mejoramiento genético de ciertas especies, incluso con la conservación de la misma, debido a un proceso de extinción de productos alimenticios o tipos de plantas, ya que hoy en día el uso indiscriminado de ciertas especies y la comercialización de flora exótica están ocasionando la extinción de alguna de ellas; por ello, es fundamental este estudio para su preservación.

El marcador genético es aplicado “a cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo de la misma, y permiten identificar los cambios en el ADN, una molécula que está presente en todas las células y que no está condicionada a cambios ambientales. Asimismo, contribuye en la identificación varietal de alguna variedad de mutación” (Ibáñez *et al.*, 2020, p. 170). Entonces, los marcadores genéticos son aplicados a cualquier desarrollo que presente la planta u otro organismo, donde se podrá verificar los cambios que haya realizado el ADN.

Además, los marcadores genéticos son mutaciones que se presentan en la secuencia de ADN que presentan un modo de herencia conocido y son relativamente sencillos para identificar. Presentan una posición conocida dentro del genoma y son analizados a través de técnicas moleculares. Estas mutaciones pueden localizarse dentro del gen responsable de cierto fenotipo o locus; este último debe ser polimórfico para ser caracterizado informativo (Barrientos, 2017). En otras palabras, este segmento de ADN es el elemento clave que facilita la búsqueda de la causante de una enfermedad hereditaria porque permite rastrear su origen.

Entonces, los marcadores genéticos son caracterizados como cualquier elemento que permite diferenciar entre las características de un individuo. Además, son fáciles de visualizar, ya que generalmente está controlado por un único gen que permite diferenciar de otros como en la forma de las hojas, flores u otras partes de una planta. Los marcadores de ADN son caracterizados por la variación de secuencias de ADN entre los

individuos. Las diferencias entre las secuencias de nucleótidos entre los individuos permiten detectar diferencias o similitudes.

3.2. Marcadores morfológicos o fenotípicos

Los marcadores morfológicos fueron los primeros en ser utilizados para estudios de caracterización y de genética en poblaciones; a través de ello se logró identificar los caracteres altamente heredables para determinar las frecuencias génicas y la identidad de los individuos; por ello, esta técnica es adecuada para el estudio de la variación (Rodríguez, 2016).

Estos marcadores morfológicos o fenotípicos establecen las bases para identificar y diferenciar las variedades de una especie; es decir, se especifica los caracteres de una especie o individuo en un ambiente específico. Por ejemplo, el marcador morfológico de una orquídea es el peso o tamaño.

Además, estos marcadores morfológicos son herramientas de gran importancia porque permite determinar variedades de especies como, por ejemplo, variedades de especies cultivadas, que esta puede coincidir con conocimientos ancestrales de la comunidad. A través de estas caracterizaciones se puede determinar los fenotipos de una especie. Además, estos marcadores morfológicos son utilizados para estudios paleontológicos con la finalidad de caracterizar especies de animales o plantas extintas (Porras, 2017).

Por lo tanto, los marcadores morfológicos son técnicas elementales para identificar las progenies originadas entre dos variedades de una especie. Asimismo, contribuyen con la investigación para determinar la diversidad de la población de una especie determinada. Su uso es fundamental, ya que permite conocer la clasificación taxonómica de ciertas especies. Mayormente se encuentra nuevas especies de plantas y se necesita estudiarla para poder encontrar y ubicarla a un grupo taxonómico.

3.3. Marcadores basados en ADN o moleculares

Los caracteres bioquímicos y moleculares pueden considerarse como marcadores genéticos. Los marcadores moleculares proveen gran cantidad de información por lo que permite estimar la diversidad genética neutral, hacer comparaciones entre individuos y poblaciones. Por otro lado, la aplicación de marcadores de ADN ha facilitado en la clasificación de materiales, detección de duplicados y la identificación del origen geográfico (Caruso *et al.*, 2015). Incluso en la investigación genética, a través de estos marcadores se puede conocer el parentesco, así como también identificar genes responsables de crecimiento o resistencia a ciertas enfermedades.

El uso de marcadores moleculares permite determinar la identidad de los individuos de poblaciones naturales problemáticos para los criterios basados en caracteres morfológicos de la taxonomía clásica, lo cual facilita la identificación a nivel específico (Rosero-Galindo *et al.*, 2016). Debido a ello, se puede reconocer de manera sencilla los caracteres morfológicos de una especie porque sus expresiones son fáciles detectar, debido que son observables y cuantificables y, de este modo, se procede a la respectiva clasificación.

Los marcadores moleculares o genéticos son segmentos de ADN que presentan una ubicación identificable en un cromosoma. En los últimos años, diversos estudios han evidenciado que los tipos de marcadores moleculares han desarrollado a ser dominantes; es decir, no distinguen el individuo homocigoto, además se ha desarrollado marcadores de tipo codominante que son capaces de distinguir entre homocigotos y heterocigotos, como es el caso de los microsatélites (SSR), que son las repeticiones de algunas bases (Ibáñez *et al.*, 2020).

Entonces, los marcadores moleculares han logrado convertirse en una herramienta fundamental en el campo de la ciencia biológica, debido a que esta técnica molecular permite identificar la distribución de los genes. Además, los diferentes tipos de marcadores se diferencian debido a su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples. Cabe

resaltar que los polimorfismos son mutaciones o cambios en el ADN (Martínez, 2021). Por lo tanto, se infiere que los marcadores son elementos importantes para detectar cualquier anomalía que presente el ADN, así como también la distribución de los genes.

Otro uso que tienen los marcadores moleculares es confirmar la estabilidad genética y detectar la variación entre plantas, incluso dentro de un grupo cerrado de plantas (Lema-Rumińska *et al.*, 2018). Es fundamental conocer alguna especie de plantas que posea una variación genética, porque a partir de ello se puede tomar o plantear medidas de conservación y manejo de recursos, ya que el ser humano está en constante uso de estos recursos que podría ocasionar la extinción de alguna de estas especies. Además, es necesario enfatizar que el mundo está en constante cambio, y lo que hay ahora es producto de una variación.

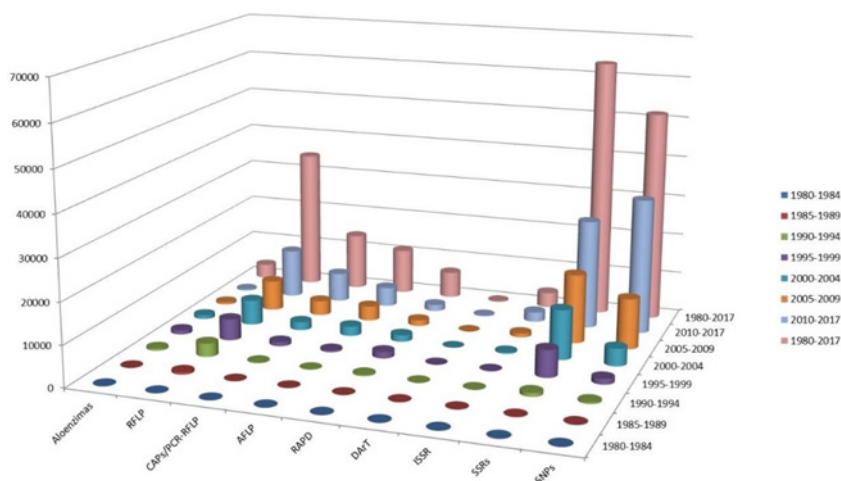
Por último, acerca de los marcadores moleculares, Bobadilla-Larios *et al.* (2017) señalan que el marcador molecular forma parte de las estrategias de análisis genético. Los marcadores del ADN se basan en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas son diversas y pueden ser de carácter dominante o codominante. Entonces, los marcadores moleculares tienen la ventaja de detectar las variaciones directas en el ADN, se comportan de forma estable y no son afectados por el ambiente. Por otro lado, es necesario tener en cuenta que los marcadores moleculares no siempre van a considerarse como genético.

Con respecto a la caracterización de los marcadores moleculares de ADN es la extracción de ADN que presenta buena concentración y calidad, siendo en los vegetales un punto crítico debido a la gran cantidad y diversidad de metabolitos secundarios que producen, lo cual puede ocasionar problemas durante el proceso de extracción. En relación a la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso de marcadores ISSR, esta ofrece una serie de ventajas como la alta variación que se detecta, así como su reproducibilidad, que no necesita de altas concentraciones de ADN (Quijano y Prieto, 2020).

En relación a los marcadores moleculares de ADN se desarrollará cuatro puntos: el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), los microsatélites (SSR) y el polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).

Figura 13.

Popularidad de los marcadores moleculares



Nota. Tomado de Turchetto et al. (2017)

En la Figura 13 se observa la popularidad que se ha tenido el uso de los marcadores desde el año 1980 hasta el 2017. Dentro de los cuatro marcadores a desarrollar, el SSR es el que se usa más en los últimos años y el menos usado es el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

- **Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP).** Viene a ser el resultante de la variación de una secuencia de ADN reconocida por las enzimas de restricción usadas para cortar secuencias de ADN en lugares conocidos. Estos son empleados como marcadores genéticos. Además, este método es comúnmente empleado debido a su

rapidez en la obtención de resultados, otra ventaja de esta técnica es que se necesita un mínimo de instrumentos de laboratorio (Angarita *et al.*, 2017).

Las tecnologías basadas en el empleo de marcadores moleculares son de utilidad para el estudio de similitud y distancia genética que ayuda a obtener una clasificación de los mismos en diferentes grupos. Con el tiempo, el ADN se convirtió como la base para el estudio genético, tales como el RFLP que son más estables y son capaces de detectar mayores niveles de polimorfismos. Entonces, esta herramienta contribuye con el estudio del genoma. Además, tiene como ventaja la rapidez de sus resultados y el acceso a los instrumentos de laboratorio.

- **ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).** El ADN polimórfico amplificado al azar fue propuesto por Welsh, McClelland, Williams en 1990. Esta técnica es utilizada para el estudio relacionado a la identidad genética, así como la variación de cultivo, además esta técnica se utilizó junto a los marcadores ALFP y SSR (Lema-Rumińska *et al.*, 2018).

También es conocido como polimorfismo amplificado aleatorio ADN. En esta técnica se emplea marcadores moleculares con el propósito de amplificar a través de la RCP (reacción en cadena de la polimerasa) de secuencias cortas de ADN polimórfico, empleando un cebador de secuencia corta. Como esta técnica se basa en la RCP, necesita control sobre ciertos factores que pueden influir con el desempeño de la técnica como los dNTPs, TaqDNA polimerasa, la temperatura de hibridación y la integridad de la cadena de molde (Angarita *et al.*, 2017).

El análisis de RAPD es una técnica muy utilizada debido a que permite la detección rápida de polimorfismos en diferentes loci con solo utilizar cantidades de nanogramos de ADN genómico, asimismo, se puede realizar este análisis en organismos que no presenten mucha información relacionada a su secuencia genómica (González *et al.*, 2018).

La detección rápida de polimorfismos, que vienen a ser las variantes de una secuencia de ADN, es gracias a la técnica del polimorfismo amplificado aleatorio ADN, debido a la utilización de la poca cantidad de nanogramos de ADN genómico. Estos marcadores RAPD se caracterizan por ser dominantes, además, esta técnica es muy utilizada para los estudios de la identidad genética y el grado de diversidad genérica.

Por último, con respecto a las nociones básicas del RAPD, esta técnica sigue siendo el marcador de elección para la evaluación de la variabilidad genética entre diferentes accesiones de una especie. Este marcador, como herramienta, es fundamental para estudios de diversidad genética en cultivos de importancia económica porque permite corroborar la variabilidad molecular existente en los cultivos, lo que permite mejorar, conservar y enfrentar a plagas y enfermedades (Arias *et al.*, 2018).

Tabla 2.
Ventajas y limitaciones del RAPD

Ventajas	Limitaciones
- Produce un gran número de bandas que luego se pueden utilizar para la caracterización individual. - La técnica es simple y rápida.	- Se caracteriza por ser de baja reproducibilidad. - Es dominante. - Es difícil de analizar, incluso para las comparaciones de estudio.

Nota. Adaptado de Turchetto et al. (2017)

En la Tabla 2 se muestra las ventajas y limitaciones que tiene el marcador ADN polimórfico amplificado al azar. Entonces, la técnica RAPD es un marcador dominante que permite la amplificación de la RCP. Además, este marcador contribuye en la evaluación de la variabilidad genética que permite estudiar a una especie, con el propósito de identificar estrategias que permita enfrentarse a ciertos problemas que pueda afectar a los cultivos, incluso para preservar su especie que se encuentra

vulnerable antes diversos cambios ambientales o naturales, incluso por amenaza humana.

- **Microsatélites (SSR).** Los marcadores de microsatélites (secuencias simples repetidas) se usó por primera vez en la cartografía genética en humanos y desde ahí se han utilizado ampliamente en varias áreas de la ciencia. Este tipo de marcador se basa en la amplificación por PCR de regiones específicas del genoma utilizando un par de cebadores específicos del locus. Los microsatélites abundan en el genoma, y son fáciles de automatizar. Por último, los patrones de polimorfismo exhibidos por los SSR son mayores que cualquier otro marcador contemporáneo (Turchetto *et al.*, 2017).

Tabla 3.

Ventajas y desventajas de la SSR

Ventajas	Limitaciones
- Altamente informativo - Es fácil de aislar - Codominante - Alta reproducibilidad	- Comportamiento complejo mutacional - Alelos nulos - La comparación entre los estudios requiere de preparación especial. - Especie específico

Nota. Adaptado de Turchetto et al. (2017)

En la Tabla 3 se observa las ventajas y limitaciones de la secuencia simple repetidas. Por otro lado, Martínez (2021) señala que los marcadores de tipo SSR son unidades cortas que puede variar de 1 a 6 pares de bases y suelen a repetirse de manera indeterminada en genomas de organismos eucariotas y procariotas.

Asimismo, Fernández (2018) sostiene que los microsatélites, también conocidos como STR, son secuencias cortas de ADN que se repiten en tándem; es decir, entre un conjunto de serie de elementos, cuyo

tamaño oscila entre 2 y 6 pb que son distribuidas en los genomas, además, muestran alto nivel de polimorfismo alélico. De este modo, los microsatélites están relacionados a la repetición de las unidades cortas del ADN, que incluso pueden identificar alguna variedad o mutación en el genoma.

Otros estudios confirman que los microsatélites vienen a ser las repeticiones de algunas bases, generalmente entre 2 y 6 que pueden variar entre cromosomas homólogos. Además, las características de los microsatélites permiten el empleo de un conjunto de ellos para ser usado en identificación varietal. Se dice que la combinación de varios microsatélites puede ser altamente eficaz para discernir entre grupos varietales o para identificar una variedad híbrida; sin embargo, el empleo de los microsatélites en la identificación de variedades procedentes de mutación tanto naturales como inducidas es poco eficaz. La probabilidad de que una mutación afecte al microsatélite escogido es baja (Ibáñez *et al.*, 2020).

Entonces, los microsatélites son las repeticiones de algunas bases que permite la identificación varietal donde se muestra las características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y otras características que diferencien a una especie de otra; por ejemplo, especies de plantas o semillas. Por ello, se dice que a través de esta técnica se puede conocer la variabilidad de las especies incluso su mutación. Las variaciones en especies de plantas y animales son altas en los microsatélites, pero esto no impide alguna alteración en los resultados.

- **Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).** Esta técnica contribuye en la investigación sobre la biología molecular y diversidad genética, y provee en el análisis del *fingerprin-*ting o identificación de aislamiento (Suárez-Contreras, 2017). Los marcadores de AFLP permiten una exploración rápida de los polimorfismos del genoma, incluso no necesita información previa del genoma para su aplicación (Vos *et al.*, 1995, Montalvo *et al.*, 2012, citado en

Remón y Peña, 2018).

Entonces, la técnica de AFLP beneficia al estudio de la biología molecular y diversidad genética, así como también contribuye al análisis de identificación de aislamiento. Asimismo, contribuye a los estudios exploratorios de los polimorfismos del genoma; es decir, el polimorfismo es el elemento responsable de la variabilidad existente entre los individuos de una misma especie; por ello, los autores señalan que durante la exploración no se necesita una información previa del genoma para aplicarlo en la investigación.

El AFLP se basa en la amplificación selectiva por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fragmentos de restricción generados por enzimas de restricción específica y vinculado a adaptadores de oligonucleótidos. Además, esta es una técnica popular para estudios de genética, diversidad de poblaciones, estudios ecológicos y evolutivos. Otra particularidad del marcador AFLP es que muestra una herencia dominante, siendo genotipo por la presencia o ausencia de bandas o alelos. Por otro lado, esta técnica sigue siendo relativamente caro y requiere una gran cantidad de mano de obra y conocimientos técnicos (Turchetto *et al.*, 2017).

Tabla 4.

Ventajas y limitaciones del AFLP

Ventajas	Limitaciones
- Gran número de marcadores por reacción - Elevada reproducibilidad - Es rápido - No se necesita tener conocimiento previo del genoma	- Marcador de tipo dominante - Homoplasia de tamaño de las bandas generadas

Nota. Adaptado de Turchetto et al. (2017)

En la Tabla 4 se observa las ventajas y limitaciones que se tiene al aplicar el marcador del polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados. Entonces, a partir de ello se puede concluir que AFLP es una herramienta fundamental para la investigación relacionada a la biología molecular y la genética, cuyo objeto de estudio es la exploración del polimorfismo, este último se encuentra en las regiones codificantes del genoma y en las zonas no codificantes. Una particularidad resaltante del AFLP es que analiza al azar las regiones del ADN que se encuentran distribuidas en el genoma.

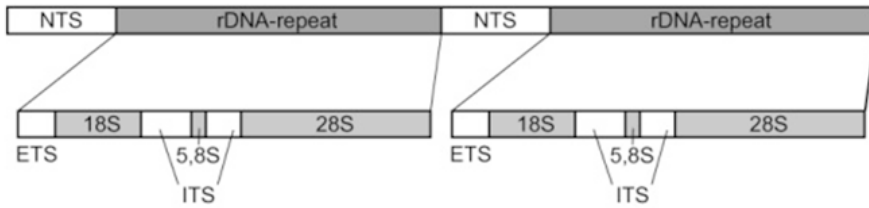
3.4. Espaciadores transcritos internos (ITS) del ADN ribosomal

En primer lugar, es importante precisar sobre los genes ribosomales; los espaciadores asociados a los genes ribosomales son conocidos como ADN ribosomal (ADNr). En los eucariotas superiores, el ADNr comprende de dos familias multigénicas diferentes: mayor y menor. La estructura secundaria de estos genes, las diversas tasas de evolución entre las variedades de regiones y la organización de los genes ocasionan que el ADNr sea un candidato atractivo para la clasificación de las especies y poblaciones, así como también para los estudios filogenéticos y el análisis de la estructura genómica (Fernández, 2018).

Cabe resaltar que el ribosoma es un organelo intracelular que sintetiza proteínas, además se compone de proteínas y ARN ribosomal, que es codificado por el ADN ribosomal. Con respecto al ADN ribosomal nuclear, este presenta a los genes ribosomales organizados en unidades de transcripción que se encuentran de manera repetidas y dispuestas en agrupaciones, y su estructura se encuentra de forma específica (Pimentel, 2020).

Figura 14.

Diagrama de repeticiones de ADN ribosomal



Nota. Tomado de Pimentel (2020)

En la Figura 14 se observa un caso de repeticiones tándem de ADN ribosomal. Fernández (2020) señala que el 18S, 5.8S y 28S son los tractos del segmento génico del ADNr eucariota. En la figura se estructura en NTS (espaciador no transcrito), ETS (espaciador transcrito externo) e ITS (espaciadores transcritos internos).

En segundo lugar, el análisis de secuencias de espaciadores transcritos internos (ITS) cumple una función primordial en los estudios de filogenia (Ortiz *et al.*, 2018). Además, esta secuencia de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal es aplicada en la taxonomía, debido a su alto grado de polimorfismo entre especies que se encuentran relacionadas. Incluso las regiones ITS están rodeadas por secuencias que facilitan la estructuración para ampliar la reacción en cadena de la polimerasa (Jaramillo-Pineda *et al.*, 2015). Entonces, los ITS están relacionados a las secuencias que permiten la reacción de la cadena de la polimerasa (RCP).

Con respecto a los espaciadores transcritos internos, esta región puede amplificarse fácilmente por RCP, utilizando cebadores que anillen en los genes de flanco conservados, asimismo constituyen uno de los marcadores más utilizados en el campo de la filogenética y diferenciación de especies (Fernández, 2018). Por lo tanto, el uso de los ITS resalta el estudio taxonómico de las especies e incluso la evolución de sus variantes, ya que esta forma parte del proceso de amplificación de las secuencias de ADN.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD DEL GÉNERO PHRAGMIPEDIUM DE ORQUÍDEAS PERUANAS A TRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES DE ADN

Las orquídeas son plantas de tipo ornamental más pedidas en el mercado peruano, debido a su belleza y colores vistosos, incluso tiene un valor comercial importante en el país. Las orquídeas del género *Phragmipedium* comprende de 34 especies divididas en seis secciones *Phragmipedium*, *Himantopetalum*, *Platypetalum*, *Latifolium*, *Micropetalum* y *Schluckebieria*.

El Perú posee 10 especies de este género: *P. pearcei*, *P. besseae*, *P. caricinum*, *P. boissierianum*, *P. caudatum*, *P. wallisii*, *P. czerwiakowianum*, *P. richteri*, *P. reticulatum* y *P. kovachii*, por lo que este estudio tiene por objetivo evaluar la diversidad y distancia genética de ocho especies del género *Phragmipedium* a través de la técnica de polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP). Esta técnica es una herramienta genética que permite analizar la taxonomía del género *Phragmipedium*.

En este capítulo se desarrollará con mayor profundidad la metodología para la obtención de datos como la recolección de hojas de cada especie

nativa que están registradas por el Instituto Nacional de Recursos Naturales (INRENA), así como el análisis de sus resultados.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la biodiversidad del género *Phragmipedium* de orquídeas nativas peruanas usando marcadores moleculares de ADN.

Objetivos específicos

- Estudiar la filogenia de colecciones de *Phragmipedium* peruanos por marcadores moleculares y mediante el análisis filogenético.
- Establecer la Técnica de AFLP para el estudio de la biodiversidad de orquídeas del género *Phragmipedium*

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Material biológico

Se colectó las hojas jóvenes de cada especie nativa para el estudio, de las especies *P. kovachii*, *P. pearcei*, *P. caricinum*, *P. boissierianum*, *P. besseae*, *P. caudatum*, *P. wallisii* y *P. schlimii* del vivero Peruanino S.R.L registrado por INRENA en las ciudades de San Ramón y Palca (Junín) y Lima. Se obtuvo un espécimen por especie y se almacenó con adecuada humedad en bolsas plásticas tipo ziploc para su traslado al laboratorio de la Universidad Cayetano Heredia donde se lavaron, esterilizaron y en una balanza analítica se pesó 4 gr. de hojas de cada especie rotulada y se almacenó en una refrigeradora a -70°C hasta su utilización. Para los análisis de la variación genética se requiere de una alta calidad de pureza del ADN para realizar la reacción de PCR para la caracterización molecular y evaluación de la variabilidad, similitud, diferencia e identificación genética molecular interespecífica de las especies del género *Phragmipedium*, utilizando tecnología de AFLP.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó hojas jóvenes de las especies a estudiar según los protocolos Doyle y Doyle (1990) y modificado a mediana escala por Ghislain (1997).

Determinación de la concentración del ADN extraído.

La estimación de la concentración ADN de las muestras se realizó comparándola con la concentración del estándar de ADN lambda (λ) digerida con la enzima de restricción Pst I de tamaño molecular de 48502 pb en gel de agarosa al 1%. El estándar se encontraba a una concentración de 280 ng/ μ L, cuya banda de más alto peso molecular es de 14000 pb. Determinada la concentración del ADN de la muestra, se preparó diluciones que contenían 300 ng de ADN en agua libre de nucleasas o Nuclease Free Water NFW (SIGMA). Para comprobar si la cuantificación es correcta se corrieron 300 ng de ADN en gel de agarosa al 1 % obteniéndose bandas de intensidad uniforme.

Técnica de AFLP

La técnica de AFLP presenta tres grandes pasos (Vos *et al.*, 1995):

Digestión del ADN con endonucleasas de restricción y ligación de los adaptadores. El ADN genómico es digerido simultáneamente con endonucleasas de restricción: Eco RI y MseI. Eco RI tiene un sitio de reconocimiento de 6 pares de base para el corte (G/AATTC), y MseI reconoce 4 pares de base (T/TAA). Usando ambas enzimas se generan tres tipos de fragmentos de extremos cohesivos: Eco/Eco, Eco/Mse y Mse/Mse, estos fragmentos se encuentran en el rango óptimo (<1Kb) para una separación en gel denaturante de poliacrilamida. Durante el uso de las enzimas ligasas se une a los extremos libres de los fragmentos digeridos adaptadores sintéticos que tienen una secuencia complementaria a los iniciadores que se usarán en el siguiente paso.

La calidad de ADN es un factor crítico en la obtención de marcadores de AFLP confiables, además debe ser de buena calidad, no degradado, sin contaminantes, ni inhibidores.

Será realizada de acuerdo al procedimiento descrito por los protocolos CIP específico para plantas a partir de hojas.

- 1. Digestión del ADN.** Se preparó una solución que contenía ADN genómico, agua libre de nucleasas (SIGMA), BSA(NEB), buffer de reacción OPA (PHARMACIA), enzimas MseI (NEB) y EcoRI (GIBCO) en las cantidades como se muestra en la Tabla 5. Posteriormente la solución se incubó a 37 °C por 3 horas y 15 minutos y para inactivar las endonucleasas de restricción a 70 °C obteniéndose el ADN digerido.

Tabla 5.

Solución para la digestión del ADN

Soluciones	Vol. / tubo (μL)
BSA (10mgr/ml)	0,50
OPA 10X	5,00
MseI (10 unidades/μL)	0,50
EcoRI (10 unidades /μL)	0,50
ADN genómico (100 ng/μL)	5,00
Agua libre de nucleasas (μL)	38,50
Vol. final x tubo (μL)	50,00

- 2. Ligación de los adaptadores.** Los fragmentos producidos después de la digestión del ADN son ligados con los adaptadores específicos de cada enzima en los extremos de cada fragmento digerido. Para lo cual

se preparó una solución que contenía ADN digerido, T4 ADN Ligasa (PROMEGA), Buffer de reacción, adaptador MseI ((NEB), adaptador EcoRI (GIBCO), agua libre de nucleasas (SIGMA), en las cantidades como se muestra en la Tabla 6, posteriormente la solución se incubó a temperatura ambiente (20 °C) por 3 horas, si no se utiliza se almacena a -20 °C, para posteriormente realizar la pre-amplificación.

Tabla 6.

Solución de ligación de adaptadores

Soluciones	Vol. (μL)
T4 ADN Ligasa (1 unidad / μL)	0,33
Buffer de Ligación 10 X	1,00
Adaptador MseI (10 unidades/μL)	1,00
Adaptador EcoRI (10 unidades/μL)	1,00
Agua libre de nucleasas. (μL)	6,67
ADN digerido (μL))	50,00

3. Amplificación de los fragmentos digeridos. Los fragmentos Eco/Mse fueron amplificados sobre los fragmentos Eco/Eco o Mse/Mse. Se realizaron dos amplificaciones PCR consecutivas, la primera, llamada preamplificación de los fragmentos digeridos, en el cual se usaron iniciadores o primers con secuencia complementaria a la secuencia de los adaptadores, más una base selectiva (Eco+A y Mse+C) complementaria a la secuencia del fragmento, con ello se consiguió la reducción del número de fragmentos a analizar. El producto de esta amplificación es diluido y se usa como molde para una segunda amplificación PCR llamada amplificación selectiva, en ella se pueden usar diferentes combinaciones de iniciadores o primers con tres bases selectivas, en este paso los iniciadores pueden ser marcados con ³³P o ³²P (método radiactivo), con productos fluorescentes (método de fluorescencia) o simplemente no ser marcados (método de

tinción de nitrato de plata). El diseño de dos amplificaciones consecutivas hace más reproducible el patrón de bandas y además se obtiene un número de fragmentos amplificados que va de 10 a 100 con un promedio de 50.

Reacción de pre-amplificación.

Consiste en utilizar un set de iniciadores o primers complementarios a los adaptadores. Estos primers no son selectivos, los cuales reconocen todos los sitios para E 01 y M 02 que da lugar a los fragmentos pre-amplificados, los que a su vez serán utilizados como templados para la amplificación.

Para esta reacción se preparó la solución que contenía ADN ligado (del paso anterior), MgCl₂, buffer de reacción, dNTPs (PROMEGA), primers E 01 (INVITROGEN) y primers M 02 (INVITROGEN), tag polimerasa (PROMEGA) y agua libre de nucleasas (SIGMA) como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7.

Solución de reacción de preamplificación

Soluciones	Vol. / tubo (μ L)
MgCl ₂ (25 mM)	2,50
Buffer 10 X	2,50
dNTPs (10 mM)	0,50
E 01 primer (10 μ M)	0,70
M 02 primer (10 μ M)	0,70
Taq Polimerasa (5 unidades/ μ L)	0,20
Agua libre de nucleasas	15,90
ADN ligado (de la reacción anterior)	2,00
Volumen total	25,00

La reacción de pre-amplificación de PCR se realizó en el termociclador (PTC 100 MJ Research, Inc) el cual se programó con las siguientes condiciones de temperatura y tiempo:

1 ciclo de	72 °C 2 min.
26 ciclos de	94 °C 30 seg.
	56 C 1 min.
	72 °C 1 min.
1 ciclo de	72 °C 5 min.
Indefinido	4 °C termina el programa.

Después de terminado la reacción se llevó el volumen inicial a 100 µL con agua libre de nucleasas (SIGMA) y se almacenó a – 20 °C hasta su utilización.

Amplificación selectiva.

Para esta reacción se utilizó varias combinaciones de primers específicos que contenía 3 nucleótidos adicionales en sus extremos 3' para amplificar un número menor y específico de fragmentos de ADN.

Se preparó una solución que contenía ADN pre-amplificado, MgCl₂, buffer de reacción, dNTPs (PROMEGA), primers EcoRI (INVITROGEN) y MseI (INVITROGEN), tag polimerasa (PROMEGA) y agua libre de nucleasas (SIGMA), en las cantidades como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8.

Solución de reacción de amplificación selectiva

Soluciones	Vol / tubo. (µL)
MgCl ₂ (25 mM)	1,00
Buffer 10 X	1,00

Soluciones	Vol / tubo. (μL)
dNTPs (10 mM)	0,40
EcoRI primer (10 μM)	2,00
MseI primer (10 μM)	2,00
Taq Polimerasa (5 unidades /μL)	0,15
Agua libre de nucleasas	1,45
ADN pre-amplificado (10 ng/μL)	2,00
Volumen total / tubo (μL)	10,00

La reacción de amplificación de PCR se realizó en el termociclador (PTC 100 MJ Research, Inc) el cual se programó con las siguientes condiciones de temperatura y tiempo:

1 ciclo de 94 °C 2 min.

65 °C 20 seg.

72 °C 2 min.

12 ciclos de 94 °C 30 seg.

65 °C 30 seg.

72 °C 2 min.

20 ciclos de 94 °C 30 seg.

56 °C 30 seg.

72 °C 1 min.

Indefinido 4 °C termina el programa.

Las muestras que no fueron utilizadas para electroforesis se almacenaron a -20°C. 3.5

Análisis electroforético de los fragmentos amplificados

Los productos de la amplificación selectiva fueron separados en gel de poli-acrilamida al 6 % en condiciones denaturantes. Los patrones de bandas obtenidos fueron analizados por visualización directa mediante el método tinción con nitrato de plata.

Análisis e interpretación de resultados

Los diferentes fragmentos polimórficos producidos con cada par de iniciadores fueron nombrados con un número (sistema binario) y en forma secuencial. A la presencia de los fragmentos o banda de cada especie se le asignó el número 1, a la ausencia el 0. Solo aquellos fragmentos que muestren separación con media y alta intensidad fueron considerados para el análisis, las bandas tenues no se consideraron porque no influyen en los resultados, y si se consideran podrían conducir a error de interpretación y obtener resultados no veraces. Los fragmentos monomórficos o comunes a todas las especies o variedades no se consideran en el análisis de la biodiversidad, porque en AFLP solo se utilizan los fragmentos polimórficos o no comunes.

Los fragmentos monomórficos, también denominados marcadores comigrantes, no pueden ser considerados como marcadores homólogos si la secuencia de nucleótidos es diferentes (Mechanda *et al.*, 2004 y Casallo 2000) y si presentan la misma secuencia de nucleótidos es considerado como marcador homólogo, por lo tanto están ubicados en la misma posición y que representan alelos del mismo locus, pudiendo presentar una variación hasta 5 bases en la secuencia de nucleótidos según Rouppe van der Voort (1997), debido a que se presentan como

bandas homoplásicas; es decir, generados con la misma combinación de primers y presentan el mismo tamaño en los geles de electroforesis, pero ubicados en diferentes loci generados por los métodos moleculares que generan gran cantidad de marcadores como los AFLP, en otros métodos de marcadores como RFLP y SSR los marcadores monomórficos o homoplásicos son mucho menos frecuentes (Ghislain *et al.*, 2000, Casallo, 2000).

Las relaciones basadas en la distancia binaria de similaridad (similaridad = 1 – disimilaridad) entre las especies, son presentadas en un dendograma obtenido con el método de agrupamiento de distancia genética descrita por Jaccard y usadas para construir el árbol filogenético UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) que es aplicado para AFLP usando el *software* NTSYS (Rohlf, 2009) y como lo confirman trabajos realizados por Van Droogenbroeck *et al.* (2002), Coulibaly *et al.* (2002), Nguyen *et al.* (2004), Morales *et al.* (2004) y Segovia-Lerma *et al.* (2003). Para verificar la solidez de los resultados obtenidos mediante este método se utilizó el *software* STAT CLUSTER ANALYSIS RELEASE 8 para los datos binarios para distancia de similaridad.

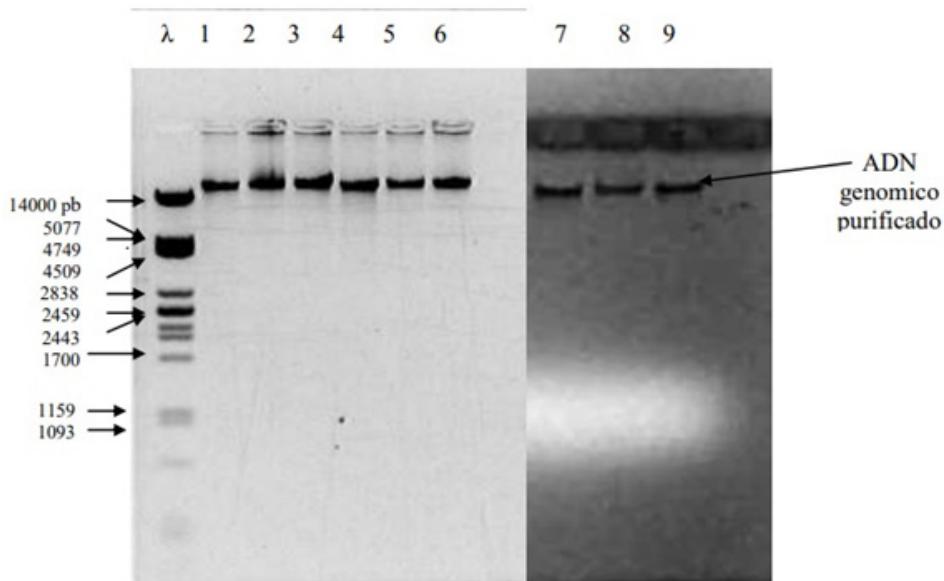
Resultados

Extracción y cuantificación del ADN

Se logró extraer una buena cantidad y calidad de ADN de cada especie sin contaminantes y no degradados. Se estimó su concentración en gel de agarosa al comparar la intensidad de la banda de ADN de la muestra con el estándar de ADN lambda digerida con Pst I (Ver Figura 15 y Tabla 9).

Figura 15.

Corrida electroforética de ADN en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio de orquídeas del género *Phragmipedium*



Muestras:

Λ = Estándar de ADN lambda digerido con Pst I

1 = *Phragmipedium pearcei*.

2 = *Phragmipedium caricinum*

3 = *Phragmipedium boissierianum*

4,8 = *Phragmipedium besseae*

5 = *Phragmipedium wallisii*

6 = *Phragmipedium caudatum*

7 = *Phragmipedium kovachii*

9 = *Phragmipedium schlimii*

Tabla 9.

Diluciones de ADN utilizadas en las reacciones de AFLP para cada especie de orquídeas del Género Phragmipedium

Fuente	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentración inicial de ADN (ng/μL)	200	230	250	250	210	250	200	200	200
Concentración final de ADN (ng/μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Vol. inicial ADN (μL)	50	43.5	40	40	47.6	40	50	50	50
Vol. agua (μL)	50	56.5	60	60	52.4	60	50	50	50
Vol. Total (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Muestras:

1 = *Phragmipedium pearcei*

2 = *Phragmipedium caricinum*

3 = *Phragmipedium boissierianum*

4,8 = *Phragmipedium besseae*

5 = *Phragmipedium wallisii*

6 = *Phragmipedium caudatum*

7 = *Phragmipedium kovachii*

9 = *Phragmipedium schlimii*

Estandarización de la técnica de AFLP para orquídeas del género *Phragmipedium*

(Ver Tablas 10 y 11)

Después de realizar modificaciones en el protocolo original utilizado, la técnica de AFLP fue exitosamente estandarizada. Para verificarlo se realizó 3 repeticiones, se obtuvo el protocolo adaptado para orquídeas del género *phragmipedium*. Se observó un alto índice de polimorfismo para las 18 combinaciones de iniciadores el que se presenta en la Tabla 10.

Se obtuvo un total de 732 fragmentos polimórficos que representan el 82 %, un total de 159 fragmentos monomórficos o bandas comunes que representan el 18 % y 30 bandas tenues no son consideradas para el análisis.

Del total de 732 fragmentos polimórficos 220 corresponden a *P. pearcei*, 229 a *P. caricinum*, 169 a *P. boissierianum*, 259 a *P. besseae*, 303 a *P. caudatum*, 283 a *P. wallisii*, 311 a *P. kovachii*, 250 a *P. schlimii* (Ver Tabla 10).

Tabla 10.

Número de bandas producto de PCR obtenidas por diferentes combinaciones de Primers en el Análisis de AFLP del género *Phragmipedium*.

#	Combinaciones de iniciadores	pearcei	caricinum	boissierianum	besseae	caudatum	wallisii	kovachii	schlimii	Total
1	EcoRI 36/ MseI 48	36	44	29	37	32	30	30	36	77
2	EcoRI 36/ MseI 55	30	32	19	52	39	30	52	42	119
3	EcoRI 38/ MseI 60	0	2	6	12	8	9	15	6	30
4	EcoRI 36/ MseI 60	4	16	10	10	16	17	13	2	60
5	EcoRI 38/ MseI 50	16	10	10	13	12	13	19	18	31
6	EcoRI 36/ MseI 50	15	14	9	22	21	18	15	12	37
7	EcoRI 35/ MseI 55	17	14	14	21	21	19	21	20	51
8	EcoRI 35/ MseI 60	8	1	5	16	13	12	18	18	36
9	EcoRI 38/ MseI 55	28	10	9	29	18	17	37	16	59
10	EcoRI 35/ MseI 50	8	10	10	5	13	13	17	12	30
11	EcoRI 38/ MseI 48	6	9	10	7	12	12	11	9	23
12	EcoRI 42/ MseI 50	12	10	3	3	9	10	5	7	25
13	EcoRI 35/ MseI 48	9	14	2	6	9	10	10	8	26
14	EcoRI 42/ MseI 55	8	13	1	3	16	18	5	6	24
15	EcoRI 40/ MseI 50	6	8	15	9	18	17	14	14	42
16	EcoRI 31/ MseI 60	15	18	16	11	25	19	15	9	35
17	EcoRI 45/ MseI 60	2	4	1	0	19	17	10	12	37
18	EcoRI 45/ MseI 45	0	0	0	3	2	2	4	3	7
Total		220	229	169	259	303	283	311	250	732

Debido a que *P. Kovachii* es considerado patrimonio nacional y se encuentra protegido por el estado a través de INRENA de la biopiratería, la comercialización y cualquier forma de tráfico ilegal de esta especie, se consideró importante realizar la identificación de bandas exclusivas de *Phrag. Kovachii*. El número de bandas exclusivas para esta especie se muestran en la Tabla 11, los cuales pueden ser considerados como candidatos para marcadores SCAR.

Tabla 11.

Marcadores exclusivos de Phragmipedium kovachii con diferentes combinaciones de primers

Combinación de primers	Número de marcadores o bandas exclusivas
E36/M48	1
E36/M60	8
E36/M55	14
E35/M55	1
E35/M60	6
E38/M55	8
E35/M50	1

Relaciones filogenéticas de las especies del género *Phragmipedium*

Cuando el valor del coeficiente o distancia de similaridad es cercano a la unidad significa que las especies son más próximas o semejantes y/o el coeficiente o distancia de disimilaridad, cuando más próximo están a cero significa que las especies son más próximas o semejantes.

Las relaciones filogenéticas de similaridad (Figura 16 y Tabla 12) entre las especies analizadas son agrupadas dentro de cuatro clusters mayores. El primer cluster formado está subdividido en dos subgrupos, el primero comprende las especies de la sección Himantopetalum (*P. pearcei* y *P. caricinum*) que tienen un coeficiente o distancia de similaridad entre ellos de 0,5678571 y el segundo comprende la especie de la sección Lorifolia (*P. boissierianum*) que tiene un coeficiente de similaridad con *P. pearcei* de 0,2979452 y con *P. caricinum* de 0,4686347, el segundo cluster comprende las especies de la sección Micropetalum (*P. besseae* y *P. schlimii*) que tienen un coeficiente de similaridad entre ellos de 0,3152455, el tercer cluster comprende la especie de la sección Schluckebieria (*P. kovachii*) que tiene un coeficiente de similaridad con *P. besseae* de 0,250 y con *P. schlimii* de 0,2635135 y el cuarto cluster comprende las especies de la sección *Phragmipedium* (*P. caudatum* y *P. wallisii*) que tienen un coeficiente de similaridad entre ellos de 0,8198758.

Para verificar la solidez del resultado obtenido mediante el método UPGMA, se corrió un programa para que analice los datos binarios para distancia de disimilaridad (disimilaridad = 1 – similaridad), seleccionando los métodos Manhattan, Complete, y Mcquitty son mostrados en las Figuras 17, 18, 19 y 20. También se utilizó los métodos: Single con Euclidean, Single con Absolute, Average con Euclidean, Average con Absolute, Average con Squared, Complete con Absolute, Complete con Squared del software Stata Cluster Analysis Release 8, se obtuvo el mismo resultado que el método UPGMA.

Figura 16.

Dendrograma UPGMA de interrelaciones genéticas entre 8 especies de las cinco secciones del género Phragmipedium basado en el coeficiente de similitud genética usando 732 marcadores de AFLP

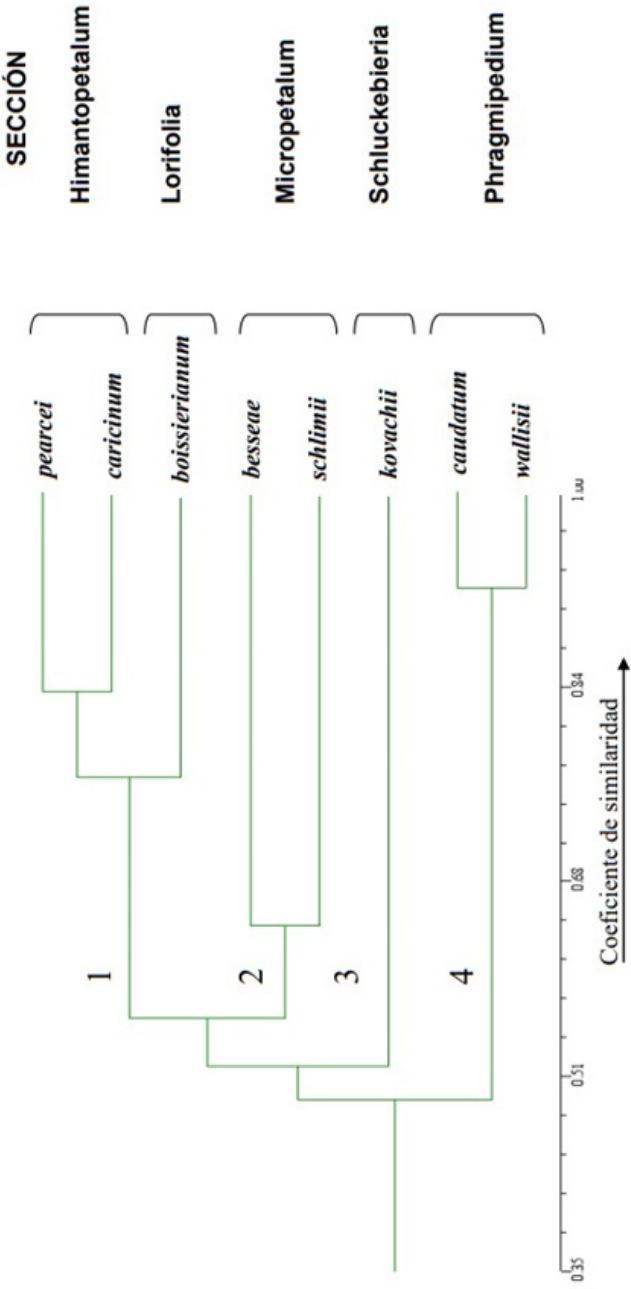


Tabla 12.

Coefficiente o distancia de similitud de las relaciones genéticas entre 8 especies de las cinco secciones del género *Phragmipedium* usando 732 marcadores de AFLP

Especie	pearcei	caricinum	boissierianum	besseae	wallisii	caudatum	kovachii
caricinum	0,5678571						
boissierianum	0,2979452	0,4686347					
besseae	0,1695761	0,1702638	0,1204188				
wallisii	0,2331731	0,2090909	0,1770574	0,1399594			
caudatum	0,2325000	0,2018779	0,1740260	0,1291667	0,8198758		
kovachii	0,1734234	0,192053	0,1566265	0,2500000	0,1673004	0,1511628	
schlimii	0,2041885	0,2126582	0,1671309	0,3152455	0,1691332	0,166302	0,2635135

Figura 17.

Dendograma por el método complete en 8 especies del género Phragmipedium usando 732 marcadores de AFLP

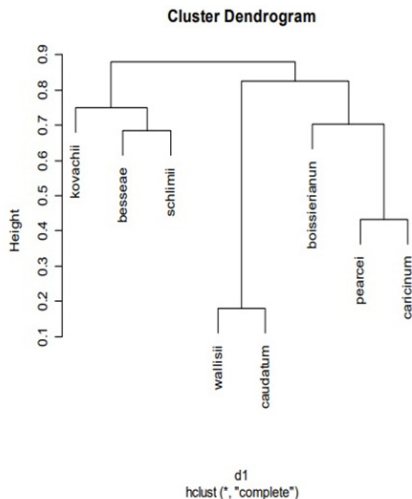


Figura 18.

Dendograma por el método manhattan y el método complete en 8 especies del género Phragmipedium usando 732 marcadores de AFLP

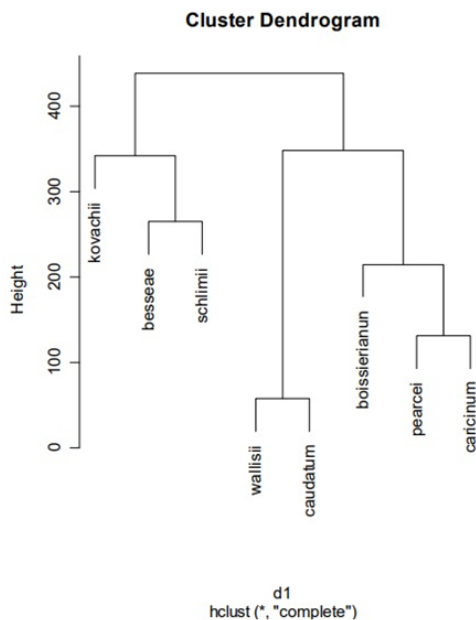


Figura 19.

Dendrograma por el método manhattan y el método Mcquitty en 8 especies del género *Phragmipedium* usando 732 marcadores de AFLP

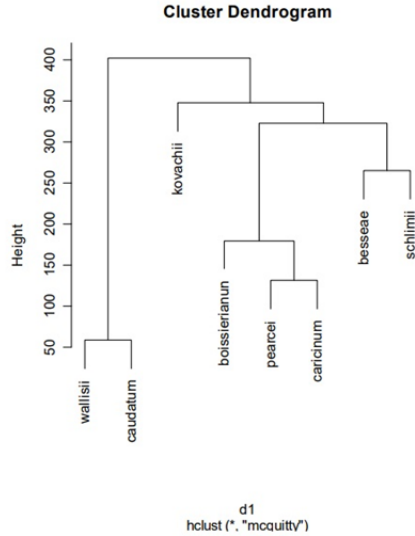
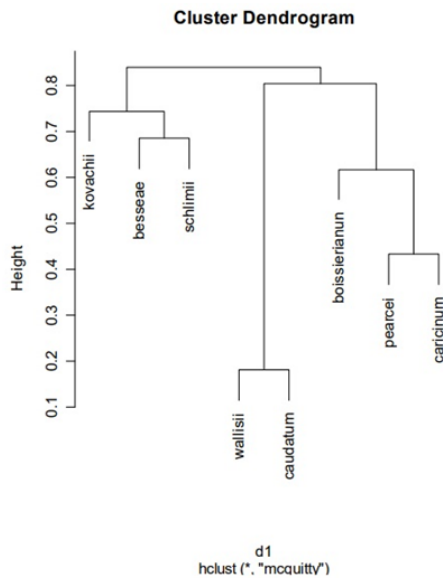


Figura 20.

Dendrograma y el método Mcquitty en 8 especies del género *Phragmipedium* usando 732 marcadores de AFLP



Discusión

La técnica de AFLP es un ensayo muy sensible, reproducible y altamente informativo para evaluar genomas de las plantas, la cual puede ser utilizada para generar identidad genética (*fingerprinting*). Con ella se puede obtener simultáneamente información sobre múltiples marcadores genéticos anónimos, abarcando mayores extensiones del genoma y dando mayor información de alelos, aun sin conocer la secuencia de ADN e independiente de su complejidad. Actualmente se está utilizando esta técnica para estudiar polimorfismos entre individuos cercanamente relacionados, e identificar diferencias intra e interespecífica entre poblaciones. El presente estudio aprovecha las características y ventajas de AFLP para el análisis de variabilidad de la biodiversidad e identificación de diferentes especies, variedades y formas del género *Phragmipedium* (Vos *et al.*, 1995).

En estudios previos se han realizado el análisis por alineamiento de secuencias ITS (Internal Transcribed Spacers o Espaciador Transcrito Interno del ADN nuclear ribosomal), de secuencias de ADN mitocondrial y secuencias de ADN de cloroplastos de *P. kovachii* (Damian *et al.*, 2005). En estos estudios ha sido necesario combinar el análisis tanto de genes nucleares como de genes extranucleares para el estudio de la sistemática molecular de orquídeas, teniendo en cuenta que la información genética de los genes ribosomales nucleares es transmitida por ambos padres mientras que el genoma mitocondrial o de cloroplasto presenta una herencia uniparental (Pridgeon *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la técnica de AFLP es más robusta y confiable que el análisis por alineamiento de secuencias de ITS para el establecimiento de interrelaciones genéticas entre las especies del género *Phragmipedium* y como herramienta de la sistemática molecular para orquídeas, a pesar de que se usó un único espécimen por cada especie. Los resultados concordaron con la clasificación morfológica, pero son contrarios a los obtenidos por Damian *et al.* (2005). Según Williams & Whitten (2001) y Damian *et al.* (2005) afirmaron que el análisis de secuencias ITS puede ser usada para demostrar el parentesco de híbridos de orquídeas de ambos

progenitores, así como la identificación vegetativa de plantas sin floración de *Phragmipedium*; sin embargo, no obtuvieron diferencias moleculares intraespecíficas en las cuatro plantas de *P. kovachii* analizadas con dicha técnica, demostrando que no es útil para determinar la biodiversidad de *P. kovachii*. El estudio demostró que AFLP es útil para la identificación genética molecular de plantas sin floración, y de híbridos inter-específicos de *Phragmipedium*, ya que la información genética es de ambos padres. Es necesario analizar una mayor cantidad de especímenes por especie con la técnica de AFLP, para demostrar si es útil o no en el estudio de la diversidad genética molecular dentro de cada especie de *Phragmipedium*.

Cuando Gruss (2003) incorpora a *P. kovachii* como miembro de la sección Micropetalum junto con *P. besseae* y *P. schlimii* se basa en la morfología y el color de la flor. Posteriormente Braem (2004) hace lo mismo y los separa en base en el tamaño de las flores creando la sección Schluckebieria con *P. kovachii* como único miembro y la sección Micropetalum, la que contiene a las especies estudiadas *P. besseae* y *P. schlimii* además de otras especies.

Esta separación propuesta por Braem no fue apoyada por el análisis de secuencias ITS realizado por Damian y otros, afirmando que *P. kovachii* debería permanecer a la sección Micropetalum porque en sus resultados obtuvieron un solo cluster para *P. besseae*, *P. schlimii* y *P. kovachii* (Damian *et al.*, 2005). Sin embargo, en este estudio con el uso de la técnica de AFLP y el método analítico UPGMA ratificado por otros métodos alternos de análisis se obtuvo dos cluster: uno para *P. kovachii* de la sección Schluckebieria y otro para *P. besseae* y *P. schlimii* de la sección Micropetalum en concordancia con Braem.

Los taxónomos morfológicos como Veitch (1887-1894), Pfitzer (1903), Garay (1979), Schoser (1983), McCook (1989 y 1998), Hennessy y Hedge (1989), Cash (1991) y Gruss (2003) catalogaron *P. boissierianum* en la sección Lorifolia y a *P. pearcei* y *P. caricinum* en la sección Himantopetalum. Esta separación fue apoyada por el sistema de análisis de secuencias ITS realizada por Damian *et al.* (2005), con la cual se obtuvo dos cluster para

cada sección, a diferencia de este estudio usando la técnica de AFLP, en el que se obtiene un único cluster para estas 3 especies.

La mayoría de los botánicos consideran a *P. caudatum* como especie verdadera de la sección *Phragmipedium* mientras que *P. wallisii*, todavía no está definida como especie miembro de esta sección o como variedad de *P. caudatum*. Siguiendo las reglas de la taxonomía morfológica. Garay (1979) y McCook (1989, 1998) los reconoció como especies diferentes (*P. caudatum*, *P. wallisii*), mientras que Gruss (2003) los consideró como especie y variedad (*P. caudatum* y *P. caudatum* var. *wallisii*).

El alineamiento de secuencias ITS hecho por Damian *et al.* (2005) dio como resultado que estos especímenes se encuentran en clusters diferentes y por lo tanto consideraron a *P. wallisii* como una especie diferente. En cambio en nuestro estudio se obtiene un acercamiento genético molecular muy próximo (0,8198758) entre ambos especímenes considerando a *P. wallisii* como una variedad de *P. caudatum*. Esto debería ser confirmado utilizando un mayor número de especímenes por especie y además el uso de un secuenciador automático para análisis de las bandas polimórficas.

La técnica de AFLP adaptada para orquídeas del género *Phragmipedium* en geles de poliacrilamida ha permitido visualizar bandas polimórficas exclusivas de *P. kovachii* (Tabla 12). Estas bandas pueden ser aisladas, clonadas, amplificadas y secuenciadas, para luego ser utilizadas como marcadores SCAR (Secuencia Caracterizada de una Región Amplificada), que permitan diferenciar especies cercanamente relacionadas, así como certificar la especie y sus híbridos, de la misma forma como la utilizaron Scheef *et al.* (2003) en la identificación de una variedad de pasto de la especie bentgrass. Por otro lado, las bandas comunes para todas las especies del género *Phragmipedium*, que se obtienen con las combinaciones de primers E36/M48 y E36 /M55, constituyen bandas candidatas a ser utilizadas como marcadores SCAR de identificación y la certificación del género *Phragmipedium*.

Los estudios filogenéticos de orquídeas basados en el análisis de secuencias ITS (espacios ITS 1 y ITS 2 y regiones 5.8s, 18s, y 26s), de los genes *rbcL*, *matK*, *tmL-F*, *psaB*, y de los espaciadores intergénicos entre los genes *accD-psaI*, *atpB-rbcL*, *rpl16* y *trmC-D* del cloroplasto y el intron mitocondrial (*nad1-c*), reportan que estas regiones de ADN presentan poca o ninguna variación molecular (Chase *et al.*, 2003; Damian *et al.*, 2005). Por lo tanto, no se considera ventajoso el uso de estas secuencias de ADN para el análisis filogenético, debido a que puede reflejar una filogenia no real por las hibridaciones intra-específicas (Cameron *et al.*, 1999; Smith y Sytsma, 1990).

Damian *et al.* (2005) reportaron que no pudieron optimizar los protocolos y amplificar las regiones intergénicas *atpB-rbcL*, *rpl16* y *trmC-D* del cloroplasto; además de tener problemas durante las descargas de secuencias del genbank que fueron utilizadas para el alineamiento filogenético; es por esa razón que los mismos autores recomendaron que todas las especies utilizadas por ellos sean resecuenciadas a partir de material fresco de procedencia conocida y documentada. Por estos motivos se considera que el análisis filogenético obtenido en dicho estudio no es confiable. No es de sorprender que los resultados obtenidos en el presente trabajo sean contrarios a los obtenidos en el estudio de Damian *et al.* (2005).

Conclusiones

- *P. kovachii* pertenece a la sección Schluckebieria.
- *P. besseae* y *P. schlimii* pertenecen a la sección *Micropetalum* por su acercamiento molecular.
- *P. boissierianum* y *P. pearcei*, *P. caricinum* deberían pertenecer a una misma sección por su acercamiento molecular.
- *P. caudatum* y *P. wallisii* pertenecen a la sección *Phragmipedium* por su acercamiento molecular.
- Se tiene patrones genéticos moleculares de las 8 especies de

Phragmipedium estudiados.

- Con la técnica de AFLP se podría determinar híbridos de *Phragmipedium*.
- El análisis molecular de ADN mediante la técnica de AFLP para el análisis de la biodiversidad es ajeno a factores ambientales, morfológicos, fisiológicos y anatómicos de las plantas.

Recomendaciones

- Utilizar el análisis molecular de ADN mediante la técnica de AFLP para el análisis de la biodiversidad porque es ajeno a factores ambientales, morfológicos, fisiológicos, anatómicos de las plantas.
- Continuar y amplificar este estudio con mayor número de plantas y especies de *Phragmipedium*, por ser este un avance en este tipo de investigación.
- Utilizar el análisis molecular de ADN mediante la técnica de AFLP como una herramienta para combatir el tráfico ilegal de especies vegetales protegidas como el género *Phragmipedium*, ya que se tiene patrones genéticos moleculares de las ocho especies estudiadas.
- Utilizar el secuenciador automático para la lectura de las bandas eliminaría la subjetividad en la selección de las bandas que se incluyen o excluyen en el análisis filogenético.

CAPÍTULO V

CONSIDERACIONES FINALES DE LA BIODIVERSIDAD DE LAS ORQUÍDEAS DEL GÉNERO PHRAGMIPEDIUM POR MEDIO DE MARCADORES MOLECULARES DE ADN

Las orquídeas, desde siglos, ha sido el centro de atención de muchas personas, debido a su forma, colores y olores, incluso se la consideraba como una planta exótica y misteriosa, debido a sus cualidades. Además, las orquídeas son consideradas como vegetaciones ornamentales, debido a su particular característica que atrae a muchas personas debido a su color y a la provisión de flores, con tres sépalos y tres pétalos, lo que ha ocasionado el aumento del comercio de esta planta debido a las características ya mencionadas. La falta de control relacionado a la comercialización de las orquídeas puede ocasionar su extinción.

Las orquídeas, en cuanto a su diversidad, representan a la familia de Orchidaceae, que es considerada como el segundo grupo botánico con más diversidad de especies con flores en el mundo (Cascante-Marín y Trejos, 2019). Con respecto a su taxonomía, no es estable, ya que dicha investigación se encuentra en constante cambio, pero hasta el momento se ha establecido que la familia Orchidaceae se divide en cuatro rangos: especie, subespecie, variedad y forma. El primero se refiere a todas las orquídeas

similares que pueden realizar procesos de intercambio de género y la subespecie está un rango debajo de la especie. La variedad y forma son rangos menores, en los cuales se presenta, al menos, un rasgo morfológico diferente a los de la subespecie (Cole y Waller, 2020).

Por otro lado, hay tres tipos de orquídeas: terrestres, litófito y epífitas. La primera acumula nutrientes por medio de los tallos, el segundo se expande por peñascos para obtener componentes nutritivos y el último vive en árboles (Castillo y Carranza, 2019).

En cuanto a su distribución, se puede encontrar a esta especie en todos los continentes, en excepción de Antártida que no presenta ningún tipo de planta. Asia, Sudamérica y África son los continentes que presentan mayor cantidad de orquídeas, dentro de este grupo Sudamérica es la zona donde se encuentra más de 12 000 especies de orquídeas mientras que Europa, Norteamérica y Australia no superan las 4000 especies de orquídeas. (Gaskett y Gallagher, 2018).

Esto refleja que la orquídea está distribuida en la mayor parte del mundo, asimismo demuestra que este tipo de plantas puede adaptarse a cualquier tipo de ambiente, sin tener en cuenta a los cambios fríos de la zona antártica. Otro punto resaltante en este caso es la ventaja de la ubicación que tiene América del Sur, ya que esta zona presenta diversidad de especies, ya sea mineral, botánico, ictiológico, entre otros.

Con respecto al género de orquídeas, *Phragmipedium* comprende al conjunto de orquídeas que se encuentran en ambientes húmedos, secos y rocosos. Se caracterizan por tener estambres largos, hojas puntiagudas que pueden medir hasta 80 cm de largo; en los tallos crecen dos o tres flores (Szlachetko *et al.*, 2020). Asimismo, el género *Phragmipedium* es muy conocido por ser plantas terrestres, en ocasiones epífita y sus flores tienen forma de zapatillas, debido a ello, algunas especies son denominadas zapatito de reina o simplemente zapatito.

Las orquídeas del género *Phragmipedium*, comprende aproximadamente 34 especies que están compuestas en seis secciones: *Phragmipedium*, *Himantopetalum*, *Platypetalum*, *Lorifolia*, *Micropetalum* y *Schluckebieria*. En el Perú se ha registrado 10 especies de este género: *P. pearcei*, *P. besseae*, *P. caricinum*, *P. boissierianum*, *P. caudatum*, *P. wallisii*, *P. czerwiakowianum*, *P. richteri*, *P. reticulatum* y *P. kovachii* que están distribuidas en las diferentes regiones del país como en San Martín, Huánuco, Cerro de Pasco, Loreto y Ucayali (Ministerio del Ambiente, 2017).

Dentro de esta agrupación hay una especie de orquídea que se encuentra en peligro de extinción: *Phragmipedium kovachii*. Para ello se está realizando estudios que permita la conservación de esta especie. De este modo, para la conservación de especies o estudios sobre la variación genética, se requiere el uso de marcadores genéticos. Estos son elementos que facilitan el trabajo de identificar la variabilidad genética de una especie, que se encuentra en una secuencia de ADN. Además, son fáciles de reconocer porque está controlado por un único gen que permite diferenciar alguna característica de otras especies; por ejemplo, las diferentes formas de hojas que tiene el género *Phragmipedium*.

Otro elemento que contribuye a este estudio es el marcador morfológico o fenotípico. Este marcador implanta las bases con el propósito de identificar y diferenciar las variedades de una especie; por ejemplo, el marcador morfológico de una orquídea viene a ser el peso o tamaño. Por ello, Porras (2017) sostiene que esta herramienta es de gran utilidad para determinar la variedad de una especie, incluso contribuye a los estudios de especies de animales y plantas extintas. Otra ventaja que ofrece esta técnica es la representación taxonómica y la identificación de las progenies originadas entre dos variedades de una especie.

Con respecto a los marcadores moleculares del ADN, proveen un porcentaje alto de información por lo que permite estimar la diversidad genética para realizar comparaciones entre individuos y poblaciones. Además, es pertinente resaltar sus beneficios porque contribuye en la detección

de genes responsables ante una enfermedad o alguna causa que afecte al ADN de una especie determinada; por ejemplo, se puede detectar elementos que afecten el crecimiento de un tipo de orquídea. Debido a ello, los marcadores moleculares han logrado convertirse en un instrumento fundamental para el campo de la ciencia biológica.

En cuanto a los marcadores moleculares de ADN están el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), los microsatélites (SSR) y el polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).

El RFLP es empleado como marcador genético porque permite la obtención de resultados de manera rápida y no requiere de muchos instrumentos de laboratorio. Las tecnologías basadas en el empleo de marcadores moleculares son de gran utilidad para el estudio de similitud y distancia genética, además, facilita en lograr una clasificación de las especies en diferentes grupos, asimismo, contribuye con el estudio del genoma.

En el caso del RAPD, González *et al.* (2018) indica que esta técnica es usada para el estudio de la identidad genética, porque permite la detección rápida de polimorfismos en distintos loci, con solo emplear cantidades de nanogramos de ADN genómico. Además, corrobora la variabilidad genética, por lo que una herramienta básica para corroborar alguna variabilidad molecular existente en alguna planta o cultivo, lo que permite conservar y enfrentar alguna enfermedad que pueda afectarla. Asimismo, se caracteriza por ser una técnica simple y rápida, aunque presenta dificultad para realizar comparaciones entre los resultados.

En relación a los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR), son las repeticiones de algunas bases que ayuda a la identificación varietal; es decir, muestra las características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas, incluso su mutación. Por ello es considerado por ser altamente informativo; en comparación con otras técnicas, no es compleja para el aislamiento del ADN y tiene alta reproducibilidad (Turchetto *et al.*, 2017).

Con respecto al último marcador, el AFLP contribuye en la investigación sobre la biología molecular y la diversidad genética, asimismo provee en el análisis del *fingerprinting* o identificación de aislamiento (Suárez-Contreras, 2017). Las ventajas del uso del AFLP es que presenta elevada reproducibilidad y no se necesita tener conocimiento previo del genoma por lo que su procedimiento es rápido.

Entonces, para este estudio se tuvo por objetivo estudiar la biodiversidad del género *Phragmipedium* de orquídeas nativas peruanas a través del uso de marcadores moleculares de ADN. Para ello se colectó hojas de ocho especies del género *Phragmipedium* que se encuentra en la zona peruana: *P. kovachii*, *P. pearcei*, *P. caricinum*, *P. boissierianum*, *P. besseae*, *P. caudatum*, *P. wallisii* y *P. schlimii* del vivero Peruanino S.R.L., registrado por el Instituto Nacional de Recursos Naturales (INRENA). Luego se extrajo el ADN de cada especie sin contaminantes y no degradado y se utilizó la técnica del AFLP con tres repeticiones para realizar el estudio de la biodiversidad del *Phragmipedium*.

Por lo tanto, a través de la aplicación del marcador del polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) se identificó que ciertas especies del género *Phragmipedium*, como *kovachii* y *besseae*, pertenecen a la sección *Schluckebieria* y *Micropetalum*, respectivamente. Entonces, la aplicación de la herramienta del AFLP contribuye con la clasificación y el análisis taxonómico del *Phragmipedium*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angarita, M., Torres, M., Díaz, A. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(5), 796-807. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7000431>
- Arias, Y., González, I., Miranda, I., Fernández, L. y Delgado-Oramas, B. (2018). Diversidad genética en maíz (*Zea mays* L.) procedente de Pinar del Río y Guantánamo, Cuba, mediante el empleo de RAPD. *Revista de Protección Vegetal*, 33(1). <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/944/1031>
- Atwood, J. y Dressler, R. (1998). Clarifications and new combinations in the *Phragmipedium caudatum* complex from Central America. *Selbyana*, 19(2), 245-248. <http://www.jstor.org/stable/41759995>.
- Barrientos, L. (2017). *Estudio de asociación mediante marcadores genéticos de la queratitis superficial crónica en perros de raza ovejero alemán* [tesis de doctorado de la Universidad Nacional de La Plata]. Repositorio institucional de la Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/59531>

- Bobadilla-Larios, V., Esparza-Ibarra, E., Delgadillo-Ruiz, L., Gallegos-Flores, P. y Ayala-Luján, J. (2017). Variedades de chile (*Capsicum annuum* L.) identificadas mediante marcadores RAPD. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(3), 465-473. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93953814014.pdf>
- Braem, G. (2004). *Phragmipedium kovachii*, Schluckebieria - nouvelle section du genre *Phragmipedium* - et réflexions sur les pratiques taxinomiques. *Richardiana*, 4, 89-102.
- Cameron, K., Chase, M., Whitten, W., Kores, M., Jarrell, D., Albert, V., Yukawa, T., Hills, H., & Goldman, D. (1999). A Phylogenetic Analysis of the Orchidaceae: Evidence from rbcL Nucleotide Sequences. *American Journal of Botany*, 86(2), 208-224. <https://bit.ly/3p3wFGv>
- Caruso, G., Broglia, V. y Pocovi, M. (2015). Diversidad genética. Importancia y aplicaciones en el mejoramiento vegetal. *Llawet. Nuestro entorno*, 4(1). <http://portalderrevistas.unsa.edu.ar/ojs/index.php/Lhawet/article/view/275/261>
- Casallo, G. (2000). Anclaje de grupos de ligamiento en el mapa genético de la papa mediante marcadores AFLP [tesis de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos]
- Cascante-Marín, A. y Trejos Hernández, C. (2019). Diversidad y vulnerabilidad de la flora orquideológica de un bosque montano nuboso del valle central de Costa Rica. *Lankesteriana*, 19(1), 31-55. <https://doi.org/10.15517/lank.v19i1.37031>
- Cash, C. 1991. *The Slipper Orchids*. Timber Press. Inc.

- Castillo Pérez, L. y Carranza Álvarez, C. (2019). ¿Cómo crecen y se relacionan las orquídeas? *Universitarios Potosinos*, 236, 18-23. <https://bit.ly/323V4nq>
- Chase, M., Cameron, K. Barrett, R. & Freudenstein, J. (2003). DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification. *American Journal of Botany* 86(2): 208-224. <https://bit.ly/3CU6abA>
- Chase, M., Christenhusz, M. y Mirenda, T. (2017). *The book of orchids: A Life-Size Guide to Six Hundred Species from around the World*. The Ivy Press Limited. <https://bit.ly/3wYRruB>
- Cole, S. y Waller, M. (2020). *Britain's orchids: a field guide to the orchids of Great Britain and Ireland*. Princeton University Press. <https://bit.ly/3qP6B4p>
- Coulibaly, S., Pasquet, R., Papa, R. y Gepts, P. (2002). AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. *Theor Appl Genet* ,104, 358-366. <https://bit.ly/3FQL1AR>
- Cribb, P., & Rankou, H. (2017). 862. *Phragmipedium Hirtzii*. *Curtis's Botanical Magazine*, 34(2), 90-97. <https://bit.ly/3nP5oZ4>.
- Cullina, W. (2004). *Understanding Orchids: an uncomplicated guide to growing the world's most exotic plants*. Houghton Mifflin Harcourt. <https://bit.ly/2Zo100x>.
- Damian, M., Williams, N. & Whitten, M. (2005) *Phragmipedium kovachii*, molecular systematics of a New World Orchid. *Orchids* 74 (2), 132-137.
- Doyle, J. & Doyle, J. (1990). Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*, (12), 13-15.

- Dressler, R. y Pupulin, F. (2011). *Phragmipedium* section *Phragmipedium*. *Orchids*, 80(10), 626-631. <https://bit.ly/2ZoGcz3>.
- Elicriso. Revista sobre el entorno y la naturaleza. (s.f). *Phragmipedium*. Principales especies. <https://www.elicriso.it/es/orquideas/phragmipedium/phragmipedium/>
- Farokhah, T., Utami, S. y Jumari, J. (2018). Diversity and Abundance of Orchids at Gebugan Nature Reserve in Semarang, Indonesia. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 10 (2), 284-290. <http://dx.doi.org/10.15294/biosaintifika.v10i2.14579>
- Fernández, J. (2018). Population genetic analysis and characterization of nuclear gene regions and mitogenomes in four European *Donax* species [tesis de doctorado de la Universidad de La Coruña]. Repositorio Universidade Da Coruña. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/21065>
- Garay, L. (1979). The Genus *Phragmipedium*. *The Orchid Digest* 43(4): 133-149.
- García-Franco, J. (2017). La fragmentación del bosque de niebla y su efecto en la comunidad de orquídeas (Orchidaceae). *Agro Productividad*, 10 (6), 13-18. <https://bit.ly/3oZsLyz>
- Gaskett, A. y Gallagher, R. (2018). Orchid diversity: Spatial and climatic patterns from herbarium records. *Ecology and Evolution*, 8, 11235-11245. <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.4598>
- Ghislain, M., Zhang, D., y Herrera, R. (1997). *Protocolos de Biología Molecular Tipificación Genética*. Centro Internacional de la Papa (CIP). Departamento de Recursos Genéticos. Manual De Capacitación. Perú.
- Ghislain, M., Trognitz, B., Herrera, R, Solis, J., Casallo, G., Vasquez, C.,

hurtado, O., Castillo, R., Portal, L., Orrillo, M. (2000). Genetic Loci associated with field resistance to late blight in offspring of *S. phureja* and *S. tuberosum* grow under short-day conditions. *Manuscript submitted to Theor Appl Genet*.

<https://bit.ly/3FRNScQ>

Givnish, T., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S., Hunter, S., Zuluaga, A., Doucette, A., Giraldo Caro, G., McDaniel, J., Clements, M., Arroyo, M., Endara, L., Kriebel, R., Williams, N. y Cameron, K. (2016). Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)*, 43, 1905-1916. <http://dx.doi.org/10.1111/jbi.12854>

Goldingay, R. y Carthew, S. (1998). Breeding and mating systems of Australian Proteaceae. *Australian Journal of Botany*, 46(4), 421-437. <https://www.publish.csiro.au/bt/bt97037#:~:text=https%3A//doi.org/10.1071/BT97037>.

González, S., Rangel-Serrano, A., Páramo-Pérez, I., Ramírez-Montiel, F., Anaya-Velázquez, F. y Padilla-Vaca, F. (2018). Análisis del polimorfismo genético de cepas de diferente virulencia de *Entamoeba histolytica*. *Jóvenes en la ciencia. Revista de divulgación científica*.

<http://148.214.84.21/handle/20.500.12059/5207>

Gruss, O. (2003). Checklist of the Genus *Phragmipedium*. *Orchid Digest* 67(4), 213-241

Gruss, O. y Rohrl, H. (2009). *Phragmipedium caudatum*: the species and its hybrids. *Orchids*, 78(9), 530-541. <https://bit.ly/3p45Lyj>.

- Gutiérrez Novoa, Y. (2020). Las orquídeas y su acción parasitaria, un nuevo cambio en su apreciación tradicional. *Encuentro Sennova del Oriente Antioqueño*, 6 (1), 82-97. <https://doi.org/10.23850/22565035.2919>
- Hennessy, E. y Hedge, T. (1989). *Slipper Orchids*. Acorn Books.
- Ibáñez, V, Terol, J. y Talón, M. (2020). Herramientas genómicas para la identificación, autenticación y mejora del material vegetal. *ReDiVia*, 167-175. <http://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/6608>
- Jaramillo-Pineda, J., Guerrero-Olazarán, M., Fuentes-Garibay, J., Viader-Salvadó, J., Meza-García, J. y Morales-Ramos, L. (2015). Identificación de especies de *Meloidogyne* utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(1), 1-11. <https://bit.ly/30NUUAB>
- Lema-Rumińska, J., Miler N. y Gesinski, K. (2018). Identification of new polish lines of henopodium quinoa (Willd.) by spectral analysis of pigments and a confirmation of genetic stability with SCoT and RAPD markers. *Acta scientiarum Polonorum. Hortorum cultus*, 17(1), 75-86. <https://bit.ly/3l24IO2>
- Martínez, Y. (2021). Determinación de la diversidad genética y estructura poblacional del maíz criollo (*Zea mays L.*) de Sahagún, Córdoba mediante marcadores microsatélites. Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Córdoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/4376>
- McCook, L. (1989). The Genus *Phragmipedium* - Part I. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 58(11), 1095-1100.

- McCook, L. (1998). An Annotated Check List of the Genus *Phragmipedium*. *Orchid Digest Special Publication*.
- Mechanda, S., Raum, B., Johnson, D. y Arnason, J. (2004). Sequence assessment of comigrating AFLP bands in *Echinacea* implications for comparative biological studies. *Genome* 47(1), 15-25.
- Menchaca García, R. (2011). *Manual para la propagación de orquídeas*. Comisión Nacional Forestal. <https://bit.ly/3cx2YaR>
- Ministerio del Ambiente (2012). *Catálogo de Flora: Especies CITES Peruanas*. <https://bit.ly/3nPKlp2>
- Ministerio del Ambiente. (2015). Guía de identificación de orquídeas con mayor demanda comercial. Ministerio del Ambiente. <https://bit.ly/3CwlUB2>
- Ministerio del Ambiente. (2017). *Orquídeas del Perú y herramientas para su identificación*. Ministerio del Ambiente. <https://bit.ly/3cqIMr9>
- Ministerio del Ambiente (2020). *Plan Nacional de Conservación de las orquídeas amenazadas del Perú. Período 2020-2029*. Repositorio Institucional del SERFOR.
- Ministerio de Conservación de las orquídeas amenazadas del Perú (2020). Plan nacional de conservación de las orquídeas amenazadas del Perú. Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR). <https://bit.ly/3cO-8GW4>
- Morales, Á., Medina, D. y Yaguache, B. (2004). Genetic diversity, phylogeny and geographic distribution of the genus *Vasconcella* in Southern Ecuador. *Lyonia* 7(2): 15-27. <https://bit.ly/3xqsOqT>

- Muñoz, M., Warner, J. y Albertazzi, F. (2010). Genetic diversity analysis of the endangered slipper orchid *Phragmipedium longifolium* in Costa Rica. *Plant Systematics and Evolution*, 290(1), 217-223. <https://doi.org/10.1007/s00606-010-0362-6>.
- Nguyen, T., Taylor, P., Redden, R. y Ford, R. (2004). Genetic diversity estimates in Cicer using AFLP analysis. *Plant Breeding* 123, 173-179
- Ortiz, E., Pineda, J. y Duarte, A. (2018). *Auricularia fuscusuccinea*: una cepa nativa ecuatoriana para hacer frente a la crisis alimentaria. *Revista Biorrefinería*, 1(1), 32-39. <https://bit.ly/3xhEtbD>
- Pimentel, S. (2020). Puesta a punto y validación de metodologías basadas en ADN para diagnóstico de nemátodos gastrointestinales de ovinos en Uruguay [tesis de maestría de la Universidad de la República Uruguay]. Colibrí - Repositorio institucional. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/27248>
- Pfitzer, E. (1903). *Orchidaceae-Pleonandrae*. <https://bit.ly/3ldMKIv>
- Pridgeon, A., Cribb, P., Chase, M. & Rasmussen, F. (1999). *Genera Orchidacearum*, vol. 1, Oxford University Press.
- Porras, E. (2017). Variabilidad genética y cuantificación genómica en especies del complejo *Agave potatorum* basado en marcadores morfológicos y citométricos [tesis de maestría del Instituto Politécnico Nacional]. Instituto Politécnico Nacional. <https://bit.ly/3p612vM>
- Pupulin, F. y Diaz-Morales, M. (2018). On the meaning of *Cypripedium×grande* (Orchidaceae) and its taxonomic history, with a new name for the nothospecies occurring in Costa Rica and Panama. *Phytotaxa*, 382(2), 167-181.

<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.382.2.2>.

- Quijano, C. y Prieto, Z. (2020). Variabilidad genética en *Pouteria lucuma* mediante marcadores ISSR. *Manglar*, 17(1), 7-12. <http://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/139/246>
- Ray, H. y Vendrame, W. (2018). *Orchid Pollination Biology*. UF Department of Environmental Horticulture. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/EP/EP52100.pdf>
- Remón, Y. y Peña, G. (2018). Diversidad genética de papas nativas (*Solanum* spp.) del distrito de Vilcashuamán, Ayacucho- Perú, mediante AFLP. *Revista Peruana de Biología*, 25(3), 259-266. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i3.15209>
- Rodríguez, A. (2016). Asociación de marcadores morfológicos y moleculares ISTR y SSR con heterosis en generaciones F1 y F2 de maíz (*Zea mays*) [tesis de maestría de la Universidad de Guadalajara]. Repositorio Dspace. <http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/5945>
- Rohlf, J. (2009). *NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.2*. Exeter Software. Applied Biostatistics Inc. <https://bit.ly/3xuXSG3>
- Romero, G. (1996). The Orchid Family (Orchidaceae). En Hagsater, E., Dumont, V. y Pridgeon, A. (Eds.), *Orchids. Status survey and conservation action plan* (3-5). IUCN/SSC Orchid Specialist Group. <https://bit.ly/3xoC0Mn>.
- Rosero-Galindo, Montenegro-Coral, F. y García-López, J. (2016). Marcadores moleculares como herramientas en la identificación y análisis genético de

- especies vectores de interés en salud pública, género *Lutzomyia* (Grupo *Verrucarum* Theodor, 1965). *Universidad y Salud*, 18(1), 138-155. <https://bit.ly/3DObH4H>
- Roupe van der Voort, j., van Zandvoort, P., van Eck, H. J., folkertsma, R. T., hutten, R. C. B., Draaistra, J., Gommers, F. J., Jacobsen, E., Helder, J., Bakker, J. (1997). Use of alele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol Gen Genet* 225:438-447.
- Ruiz, M. (2021). Micropropagación de *Phragmipedium kovachii* con fines de conservación genética. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 1(1), 45-61. <http://revistas.unsm.edu.pe/index.php/raa/article/view/99>
- Scheef, E., Casler, M. & Jung, G. (2003). Development of species-specific SCAR marker in Bentgrass. *Crop Sciencie*, 43, 345-349.
- Schiff, J. (2018). *Rare and Exotic Orchids: their nature and cultural significance*. Springer. <https://bit.ly/3HyuuTX>
- Segovia-Lerma, A., Cantrell, R., Conway J. y Ray I. (2003). AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasms using bulk DNA templates. *Genome* 46(1), 51-58(8).
- Serra Laliga, L., Fabregat Llueca, C., Oltra Benavent, J., Laguna Lumberas, E., Benito Ayuso, J., Martí Colomer, E., Catalá Doménech, J. (2019). *Guía de las orquídeas de la Comunitat Valenciana*. Generalitat Valenciana. <https://bit.ly/3x2HyvU>
- Silvera, K., Santiago, L. y Winter, K. (2005). Distribution of crassulacean acid metabolism in orchids of Panama: evidence of selection for weak

- and strong modes. *Functional Plant Biology*, 32(5), 397-407. <https://doi.org/10.1071/FP04179>.
- Smith, R. y Sytsma, K. (1990). Evolution of *Populus nigra* L. (sect. *Aigeiros*): introgressive hybridization and the chloroplast contribution of *Populus alba* L. (sect. *Populus*). *American Journal of Botany*, 77(9), 1176-1187. <https://www.jstor.org/stable/2444628>
- Suárez-Contreras, L. (2017). Diversidad genética de *Moniliophthora roreri* mediante Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(2), 425-434. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i2.7342>
- Szlachetko, D., Górniak, M., Kowalkowska, A., Kolanowska, M., Jurczak-Kurek, A. y Archila, F. (2020). The natural history of the genus *Cypripedium* (Orchidaceae). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 125(4), 1-25. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1785963>.
- Starks, C., Williams, R., Norman, V, Lawrence, J., O'Neil-Johnson, M. y Eldridge, G. (2012). Phenylpropanoids from *Phragmipedium calurum* and their antiproliferative activity. *Phytochemistry*, 82(10), 172-175. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.06.017>.
- Štípková, Z., Tsiftsis, S., Kindlmann, P. (2021). Distribution of Orchids with Different Rooting Systems in the Czech Republic. *Plants*, 10 (4), 1-16. <https://doi.org/10.3390/plants10040632>
- Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velasco, M. y Escobar-Aguayo, J. (2017). Estado de conservación de orquídeas silvestres (Orchidaceae). *Agro Productividad*, 10 (6), 3-12. <https://bit.ly/3oZsLyz>

- Tobar-Suárez, F., Yanouch, M., Fernández-Fernández, D., Hirtz, A., Gálvez, M., Peña-fiel Cevallos, M. y Freire, E. (2018). *Orchidaceae Juss.* En D. Fernández-Fernández, F. Tobar-Suárez, C. Garzón-Santomaro, M. Yáñez-Muñoz, J. Mena-Jaén y D. González-Romero (Eds.), *Orquídeas y bromelias de la provincia de el oro: Una guía de identificación para los principales géneros y especies del páramo al manglar* (pp. 77-316). <https://bit.ly/3qLatDA>
- Troiani, H., Prina, A., Muiño, W., Tamame, M. y Beinticinco, L. (2017). *Botánica, morfología, taxonomía y fitogeografía*. Universidad Nacional de La Pampa. <https://bit.ly/32k2qnb>
- Turchetto, C., Turchetto-Zolet, A., Passaia, G. y Martini, C. (2017). Marcadores genéticos basados em DNA. En *Marcadores Moleculares na Era Genômica: metodologías e aplicações* (12-20). Sociedad Brasileira de Genética. <https://bit.ly/3r56X6X>
- Van Droogenbroeck, B., Breyne, P., Goetghebeur, P., Romeijn-Peeters, E., Kyndt, T., Gheysen, G. (2002). AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. *Theor Appl Genet*, 105, 289–297. <https://bit.ly/3d8n63H>
- Veitch, J. (1887). *Manual of Orchidaceous Plants Cultivated Under Glass in Great Britain*. Veitch & Sons. <https://archive.org/details/manualoforchidac-510jame/page/n7/mode/2up>
- Vos, P., Hogers, R., Bleeke, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407- 4414.

- Unruh, S., McKain, M., Lee, Y., Yukawa, T., McCormick, M., Shefferson, R., ... y Pires, J. (2018). Phylotranscriptomic analysis and genome evolution of the Cypripedioideae (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 105(4), 631-640. <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ajb2.1047>.
- Wraith, J. (2020). *Orchid conservation: Assessing threats and conservation priorities* [tesis de Doctorado, Universidad de Griffith]. Repositorio Institucional de la Universidad de Griffith. <http://hdl.handle.net/10072/392403>.
- Williams, N. & Whitten, W. (2001). Checking an orchid hybrid's background: The use of molecular data in determining parentage of hybrids. *Orchids*, 70, 1056-1061.

