

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Hoja de Legalización de Firmas.....	ii
Certificación.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimiento.....	v
Índice de Contenidos.....	vi
Índice de Tablas.....	ix
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Anexos.....	xix
Resumen.....	xxi
Abstract.....	xxii
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del Problema.....	1
1.2 Justificación del Problema.....	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Marco Teórico.....	5
1.4.1 Características generales de la familia	5
1.4.2 Descripción Botánica del Género <i>Oncidium</i>	9
1.4.3 Conservación de Recursos Fitogenéticos.....	12
1.4.3.1 Conservación <i>in situ</i>	14
1.4.3.2 Conservación <i>ex situ</i>	15
1.4.4 Técnica de cultivo <i>in vitro</i> en la conservación.....	16
1.4.4.1 Técnica de Crioconservación.....	18
1.4.5 Técnicas de almacenamiento del material a preservar.....	21
1.4.5.1 Técnica de Encapsulación-Deshidratación.....	23
1.4.6 Prueba de viabilidad y sobrevivencia.....	27
1.4.7 Determinaciones analíticas del daño en las membranas celulares...30	
1.4.7.1 Peroxidación Lipídica.....	30

1.4.7.2 Contenido de Proteínas.....	31
1.4.7.3 Pérdida de Electrolitos.....	33
1.5 Hipótesis.....	34
Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
2.1 Localización del ensayo.....	35
2.2 Recolección del material vegetal.....	35
2.3 Registro y etiquetado de las cápsulas.....	35
2.4 Desinfección de las cápsulas.....	37
2.5 Medios de cultivo para la germinación.....	39
2.6 Siembra de las semillas.....	43
2.7 Encapsulación del material vegetal.....	45
2.8 Osmoprotección.....	46
2.9 Deshidratación.....	47
2.10 Crioconservación.....	48
2.11 Recuperación.....	49
2.12 Recultivo.....	50
2.13 Tinción.....	50
2.14 Pérdida de electrolitos.....	50
2.15 Productos de la peroxidación lipídica.....	51
2.16 Contenido de proteínas.....	52
2.17 Análisis estadístico.....	52
Capítulo 3. RESULTADOS.....	55
3.1 Registro y etiquetado de las cápsulas.....	55
3.2 Desinfección de las cápsulas.....	56
3.3 Germinación de las semillas.....	57
3.3.1 Germinación de las semillas en medio líquido.....	57
3.3.1.1 Inicio de la germinación en medio líquido.....	60
3.3.1.2 Tiempo de Germinación en medio líquido.....	62
3.3.2 Germinación de las semillas en medio sólido.....	63
3.3.2.1 Inicio de la germinación en medio sólido.....	65
3.3.2.2 Tiempo de germinación en medio sólido.....	66

3.4 Recultivo de los protocormos.....	68
3.5 Tinción de protocormos.....	72
3.5.1 Tinción de los protocormos encapsulados.....	73
3.5.2 Tinción de protocormos osmoprottegidos.....	74
3.5.3 Tinción de protocormos deshidratados.....	76
3.5.4 Tinción de protocormos crioconservados.....	79
3.5.5 Tinción de protocormos en diferentes medios de cultivo.....	83
3.5.6 Tinción de protocormos sin fotoperiodo.....	87
3.6 Pérdida de electrolitos.....	90
3.7 Productos de la peroxidación lipídica.....	92
3.8 Contenido de proteínas.....	94
Capítulo 4. DISCUSIÓN.....	97
4.1 Germinación de las semillas de <i>Oncidium stenotis</i>	97
4.2 Recultivo de protocormos.....	100
4.3 Determinación de la supervivencia de los protocormos.....	103
Capítulo 5. CONCLUSIONES.....	108
Capítulo 6. RECOMENDACIONES.....	110
Capítulo 7. BIBLIOGRAFÍA.....	111
ANEXOS.....	117

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1.1.....	11
Distribución del Género <i>Oncidium stenotis</i> en el continente Americano.	
TABLA 1.2.....	13
Especies de <i>Oncidium</i> que se encuentran dentro del libro rojo en el Ecuador.	
TABLA 2.1.....	36
Datos de tamaño y peso de las 12 cápsulas de <i>Oncidium stenotis</i> recolectadas en el orquidiario ORQUISAN de la provincia de los Tsáchilas.	
TABLA 2.2	37
Detalle del uso de las semillas de las cápsulas de <i>Oncidium stenotis</i> en los diferentes tratamientos.	
TABLA 2.3.....	40
Componentes del medio Knudson 1951, usado en la fase de germinación.	
TABLA 2.4.....	41
Tratamientos con medio líquido para la germinación de las semillas de <i>Oncidium stenotis</i> .	
TABLA 2.5.....	41
Tratamientos con medio sólido para la germinación de las semillas de <i>Oncidium stenotis</i> .	
TABLA 2.6.....	53
Tratamientos evaluados en la fase de recultivo en cada paso del proceso de crioconservación	

TABLA 2.7.....	54
Tratamientos que evalúan la concentración de reguladores de crecimiento en el recultivo de protocormos crioconservados.	
TABLA 3.1.....	57
ANOVA de la evaluación del porcentaje de germinación para los diferentes tratamientos utilizados.	
TABLA 3.2.....	61
ANOVA para las variables tiempo de indicios de germinación y las diferentes concentraciones de ANA, GA ₃ y sus interacciones.	
TABLA 3.3.....	62
ANOVA para las variables tiempo de germinación y las diferentes concentraciones de ANA y GA ₃ y sus interacciones.	
TABLA 3.4.....	63
ANOVA del porcentaje de germinación para los diferentes tratamientos utilizados en el medio sólido.	
TABLA 3.5.....	65
ANOVA para el tiempo que tardaron las semillas en presentar indicios de germinación a las diferentes concentraciones de ANA, BAP y AIA	
TABLA 3.6.....	67
ANOVA para el tiempo de las primeras semillas germinadas con diferentes concentraciones de ANA, BAP, AIA y sus interacciones.	
TABLA 3.7.....	68
Tratamientos evaluados en la fase de recultivo en cada paso del proceso de crioconservación.	

TABLA 3.8.....	69
Tratamientos que evalúan la concentración de reguladores de crecimiento en el recultivo de protocormos crioconservados.	
TABLA 3.9.....	70
Prueba chi cuadrado para el número de plantas regeneradas en las diferentes fases del proceso de crioconservación.	
TABLA 3.10.....	73
Tabla de frecuencia de la supervivencia de los protocormos sometidos al proceso de encapsulación en alginato de calcio.	
TABLA 3.11.....	75
Tabla de contingencia de la supervivencia de los protocormos sometidos al proceso de osmoprotección con sacarosa.	
TABLA 3.12.....	76
Frecuencia de protocormos vivos y muertos a lo largo de los 15 días de evaluación.	
TABLA 3.13.....	78
Prueba de chi-cuadrado en base a la frecuencia de protocormos vivos y muertos luego del proceso de deshidratación con sílica gel.	
TABLA 3.14.....	80
Tabla de contingencia de la supervivencia de los protocormos sometidos al proceso de crioconservación con NL.	
TABLA 3.15.....	81
Prueba de chi-cuadrado en base a la frecuencia de supervivencia de protocormos luego de la fase de crioconservación.	

TABLA 3.16.....	84
-----------------	----

Prueba de chi-cuadrado en base a la frecuencia de supervivencia del tratamiento con AIA a lo largo de los 15 días de evaluación.

TABLA 3.17.....	87
-----------------	----

Tabla de frecuencia de la supervivencia de los protocormos sin fase de oscuridad en el proceso de recuperación.

TABLA 3.18.....	88
-----------------	----

Prueba de chi-cuadrado en base a la frecuencia de supervivencia de protocormos sin fase de oscuridad en el proceso de recuperación.

TABLA 3.19.....	90
-----------------	----

ANOIA para la pérdida de electrolitos en los 7 días de recuperación al evaluar los tratamientos con diferentes reguladores de crecimiento.

TABLA 3.20.....	93
-----------------	----

ANOVA para el contenido de malondialdehído en los 7 días de recuperación al evaluar los tratamientos con reguladores de crecimiento, sin reguladores de crecimiento y el tratamiento control.

TABLA 3.21.....	95
-----------------	----

ANOVA para el contenido de proteínas totales en los 7 días de recuperación al evaluar el tratamiento control, el tratamiento sin reguladores de crecimiento y con reguladores de crecimiento.

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1.1.....	1
Porcentaje de distribución de las familias con especies vegetales endémicas en el Ecuador.	
FIGURA 1.2.....	7
Estructura de una flor de orquídea: pétalos (P), sépalos (S), labelo.	
FIGURA 1.3.....	29
Reducción de una sal de Tetrazolium en Formazan.	
FIGURA 2.1.....	38
Cápsulas de <i>Oncidium stenotis</i> dentro de una solución de hipoclorito de sodio al 1% con tween 20%, para su desinfección.	
FIGURA 2.2.....	39
Proceso de flameo de una cápsula de <i>Oncidium stenotis</i> con alcohol al 100%.	
FIGURA 2.3.....	43
Corte longitudinal de una cápsula de <i>Oncidium stenotis</i> en el proceso de siembra.	
FIGURA 2.4.....	44
Siembra de semillas de <i>Oncidium stenotis</i> en los medios de cultivo para su germinación.	
FIGURA 2.5.....	44
Medio de cultivo con semillas de <i>Oncidium stenotis</i> , con su respectiva etiqueta de identificación.	

FIGURA 2.6.....	45
Solución de alginato de sodio que contiene protocormos de <i>Oncidium stenotis</i> .	
FIGURA 2.7.....	46
Formación de las cápsulas de alginato de calcio, que contienen suspendidas los protocormos de <i>Oncidium stenotis</i> .	
FIGURA 2.8.....	47
Cápsulas con protocormos de <i>Oncidium stenotis</i> dentro de una solución de sacarosa 0.15 M.	
FIGURA 2.9.....	48
Cajas Petri con sílica gel que contienen los protocormos encapsulados en el desecador.	
FIGURA 2.10.....	49
Criopreservación de los protocormos en tanques de NL.	
FIGURA 2.11.....	49
Recuperación de los protocormos criopreservados en Baño María a 37 °C por 1 minuto.	
FIGURA 3.1.....	55
Gráfico del tamaño longitudinal, transversal y peso de las 12 cápsulas de <i>Oncidium stenotis</i> recolectadas en el Orquidiario ORQUISAN.	
FIGURA 3.2.....	56
Fotografía de las cápsulas 9 (a) y 10 (b) donde se observa la contaminación fúngica.	
FIGURA 3.3.....	57
Fotografías de la contaminación bacteriana en medios de cultivo para germinación.	

FIGURA 3.4.....	59
Efecto de la aplicación de ANA y GA ₃ y sus interacciones en el porcentaje de germinación de los 16 tratamientos en medio líquido.	
FIGURA 3.5.....	60
Fotografía en esteromicroscópio de la germinación de las semillas de <i>Oncidium stenotis</i> en medio líquido con 0.5 mgL ⁻¹ de ANA y 0.5 mgL ⁻¹ de GA ₃ .	
FIGURA 3.6.....	61
Tiempo en que presentan las semillas en presentar los primeros indicios de germinación en los 16 tratamientos en medio líquido.	
FIGURA 3.7.....	63
Tiempo en que tardan las semillas en germinar en los 16 tratamientos en medio líquidos.	
FIGURA 3.8.....	65
Porcentajes de germinación de los 37 tratamientos del medio sólido mediante la utilización de diferentes concentraciones ANA, BAP, AIA.	
FIGURA 3.9.....	66
Tiempo en que tardan las semillas en presentar los primeros indicios de germinación en los 33 tratamientos del medio sólido que presentaron germinación.	
FIGURA 3.10.....	67
Tiempo en que tardan las semillas en germinar en los 33 tratamientos del medio sólido que presentaron germinación.	
FIGURA 3.11.....	71
Número de plantas regeneradas en las diferentes fases del proceso de crioconservación y en los medios de cultivo.	

FIGURA 3.12.....72

Fotografía de plántulas regeneradas a partir de protocormos.

FIGURA 3.13.....74

Fotografía de protocormos antes y después de proceso de encapsulación: a) Protocormo sin teñir luego de ser encapsulados con alginato de sodio, b) Protocormos teñidos luego de ser encapsulados con alginato de sodio.

FIGURA 3.14.....76

Fotografías de protocormos antes y después de proceso de encapsulación y osmoprotección: a) Protocormo sin teñir luego de ser sometido a una osmoprotección con sacarosa, b) Protocormos teñidos luego de ser sometido a una osmoprotección con sacarosa.

FIGURA 3.15.....77

Fotografías de protocormos antes y después de proceso de encapsulación, osmoprotección y deshidratación: a) Protocormo teñido sin ser sometido a la deshidratación con sílica gel, b) Protocormos teñidos luego de ser sometido a la deshidratación con sílica gel, coloración rojiza indicativo de supervivencia, c) Protocormo teñido luego de ser sometido a la deshidratación con sílica gel, coloración rozada indicativo de muerte celular.

FIGURA 3.16.....79

Supervivencia de protocormos en el proceso de deshidratación con sílica gel.

FIGURA 3.17.....80

Fotografías de protocormos antes y después de proceso de encapsulación, osmoprotección, deshidratación y crioconservación: a) Protocormos sin teñir luego de ser crioconservados por una hora, b) Protocormos teñidos con TTC inmediatamente después de sacarlos del NL.

FIGURA 3.18.....92

Supervivencia de protocormos en el proceso de crioconservación.

FIGURA 3.19.....83

Fotografías de protocormos antes y después de proceso de encapsulación, osmoprotección, deshidratación y crioconservación: a) Protocormo teñido sin ser sometido a la crioconservación en NL, b) Protocormos teñidos luego de ser sometido a la crioconservación con NL, coloración rojiza indicativo de supervivencia, c) Protocormo teñido luego de ser sometido a la crioconservación en NL, coloración rosada indicativo de muerte celular.

FIGURA 3.20.....85

Frecuencia de protocormos vivos y muertos en los tratamientos: control, con AIA y con BAP e IBA.

FIGURA 3.21.....86

Fotografías de protocormos antes y después de proceso de encapsulación, osmoprotección, deshidratación y crioconservación recuperados en diferentes medios de cultivo: a) Protocormo teñido recultivado en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, con coloración rojiza indicativo de supervivencia, b) Protocormo teñido recultivado en el medio de cultivo con 1.5 mgL^{-1} de AIA, con coloración rojiza indicativo de supervivencia c) Protocormo teñido recultivado en el medio de cultivo con 1.5 mgL^{-1} de AIA, con coloración blanquecina indicativo de muerte celular d) Protocormo teñido recultivado en el medio de cultivo con 0.5 mgL^{-1} de BAP + 0.1 mgL^{-1} de IBA .

FIGURA 3.22.....89

Frecuencia de protocormos vivos y muertos en los tratamientos con fase de oscuridad y sin fase de oscuridad.

FIGURA 3.23.....90

Fotografías de protocormos antes y después de proceso en tratamientos con fase de oscuridad y sin fase de oscuridad: a) Protocormo teñido recultivado con fase de oscuridad, con coloración rojiza indicativo de supervivencia, b) Protocormo teñido recultivado sin fase de oscuridad, con coloración rojiza indicativo de supervivencia c) Protocormo teñido recultivado sin fase de oscuridad, con coloración blanquecina indicativo de muerte celular.

FIGURA 3.24.....	92
------------------	----

Cambios en la pérdida de electrolitos después de la crioconservación para los tratamientos con reguladores de crecimiento y el tratamiento control de protocolos. Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Duncan, $p < 0.05$). Los datos se transformaron para el análisis según $X = 2 \arcsen [(X / 100)^{0.5}] (180 / \pi)$.

FIGURA 3.25.....	94
------------------	----

Cambios en el contenido de malondialdehído después de la crioconservación para el tratamiento control, el tratamiento sin reguladores de crecimiento y con reguladores de crecimiento. Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Duncan, $p < 0.05$).

FIGURA 3.26.....	96
------------------	----

Cambios en el contenido de proteínas totales después de la crioconservación para el tratamiento control, el tratamiento sin reguladores de crecimiento y con reguladores de crecimiento. Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Duncan, $p < 0.005$).

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A.....	117
Grupos de significancia de los tratamientos con medio líquido, al evaluar el porcentaje de germinación.	
ANEXO B.....	119
Grupos de significancia para los tratamientos con medio sólido, al evaluar el porcentaje de germinación.	
ANEXO C.....	120
Grupos de significancia para los tratamientos con medio sólido, al evaluar el tiempo en presentar los indicios de germinación.	
ANEXO D.....	121
Grupos de significancia en los tratamientos con medio sólido, al evaluar el tiempo de germinación.	
ANEXO E.....	122
Grupos de significancia para la el porcentaje de pérdida de electrolitos.	
ANEXO F.....	123
Curva de Calibración de la concentración de malondialdehído.	
ANEXO G.....	123
Grupos de significancia en el análisis de la Peroxidación Lipídica	
ANEXO H.....	124
Curva de calibración de la concentración de proteínas totales.	
ANEXO I.....	125
Grupos de significancia al analizar el contenido de proteínas totales.	