

## **CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Localización del ensayo**

La fase de laboratorio se la realizó en las instalaciones del laboratorio de Cultivo de Tejidos de Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicados en la ciudad de Sangolquí, Av. el Progreso s/n, en el cantón Rumiñahui de la provincia de Pichincha.

### **2.2 Recolección del material vegetal**


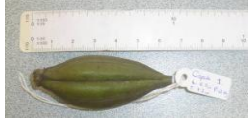





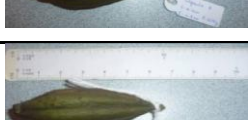
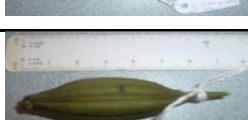
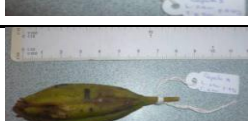


Se recolectaron 12 cápsulas de la especie *Oncidium stenotis*, del orquidiario "ORQUISAN" de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. Las cápsulas poseían una coloración verde oscura y una consistencia dura, lo cual fue un indicativo de su madurez fisiológica. Una cápsula verde que está madura y está lista para ser cultivada, se encuentra llena de semillas y no se deforma cuando se la aprieta con las pinzas, "queda intacta" (McKendrick, 2000).

Las cápsulas fueron transportadas al laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Escuela Politécnica del Ejército en la provincia de Pichincha y fueron almacenadas envueltas en tiras de papel mojado para evitar la pérdida de humedad, dentro de una caja de cartón.

### **2.3 Registro y etiquetado de las cápsulas**

Una vez en el laboratorio se registraron los datos de tamaño longitudinal, transversal y su peso, en la tabla 2.1 se muestra los datos de cada una de las cápsulas recolectadas.

Tabla 2.1 Datos de tamaño y peso de las 12 cápsulas de *Oncidium stenotis* recolectadas en el orquidiario ORQUISAN de la provincia de los Tsáchilas.

Cápsula	Tamaño Longitudinal (cm)	Tamaño Transversal (cm)	Peso (g)	Fotografía
1	6.5	7.5	13.66	
2	5.2	6.5	9.58	
3	5.4	6.0	7.56	
4	6.5	7.9	13.56	
5	6.0	7.0	10.01	
6	5.8	7.3	11.83	
7	6.3	6.9	12.85	
8	5.7	7.5	13.02	
9	5.4	6.9	8.93	
10	5.9	6.1	9.80	
11	4.2	3.9	3.03	
12	4.5	4.3	3.76	

De la cápsula 1 se utilizaron sus semillas para sembrar en los tratamientos en medio líquido, de las cápsulas 2 y 3 se utilizaron sus semillas para los tratamientos en medio sólido. Con el fin de no desperdiciar las semillas de las cápsulas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, estas fueron sembradas en medios Knudson C sin reguladores de crecimiento (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Detalle del uso de las semillas de las cápsulas de *Oncidium stenotis* en los diferentes tratamientos.

<b>Cápsula</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Número de Frascos</b>
1	Medio líquido: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16.	46
2	Medio sólido: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21.	60
3	Medio sólido: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37.	50
4	No fueron parte de ningun tratamiento	43
5	No fueron parte de ningun tratamiento	40
6	No fueron parte de ningun tratamiento	24
7	No fueron parte de ningun tratamiento	24
8	No fueron parte de ningun tratamiento	96
9	Cápsula contaminada	1
10	Cápsula contaminada	0
11	No fueron parte de ningun tratamiento	17
12	No fueron parte de ningun tratamiento	15

#### **2.4 Desinfección de las cápsulas**

Las semillas de orquídeas se mantienen estériles si las cápsulas permanecen cerradas e intactas por lo que se debe desinfectar la parte exterior

de las mismas, donde hongos y bacterias pueden desarrollarse y al abrir las cápsulas bajo condiciones de esterilización las semillas podrán mantenerse libres de contaminación (McKendrick, 2000).

La ventaja de este método es que no se requiere de la esterilización de las semillas, lo que podría provocar su deterioro. Además, algunas semillas tomadas de cápsulas casi maduras podrían germinar más rápido que las provenientes de cápsulas maduras a causa de los mecanismos de dormancia (McKendrick, 2000).

Como primer paso para la desinfección se removieron con un bisturí cuidadosamente los restos de la flor muerta de las cápsulas. Posteriormente con la ayuda de un cepillo suave se lavó cada cápsula con una solución de agua y detergente comercial y se enjuagaron con abundante agua. Las cápsulas lavadas se introdujeron por 10 minutos aproximadamente en una solución de hipoclorito de sodio al 1% a la que se ha añadido 2 gotas de tween 20 y se mantuvieron en constante agitación (Fig. 2.1).



Figura 2.1 Cápsulas de *Oncidium stenotis* dentro de una solución de hipoclorito de sodio al 1% con tween 20%, para su desinfección (Roura, 2009).

Se transfirieron la cápsula sumergida en la solución de cloro a la cámara de flujo laminar, donde con la ayuda de unas pinzas estériles se colocaron en alcohol al 100% para flamearlas hasta que el alcohol se consuma completamente (Fig. 2.2), este proceso se repitió tres veces.



Figura 2.2 Proceso de flameo de una cápsula de *Oncidium stenotis* con alcohol al 100% (Roura, 2009).

## 2.5 Medios de cultivo para la germinación

El medio de cultivo base que se utilizó en la fase de germinación para semillas de *Oncidium stenotis* fue el medio de Knudson C 1951, sus componentes se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 2.3 Componentes del medio Knudson 1951, usado en la fase de germinación.

<b>Medio Knudson C</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Concentración mgL<sup>-1</sup></b>
Nitrato de Calcio	1.5
Fosfato de Potasio	0.375
Sulfato de Magnesio	0.375
Sulfato de Hierro	0.0375
Sulfato de Manganeso	0.01125
Sulfato de Amonio	0.75
Sacarosa	30

Se preparó medio Knudson C (1951) líquido con 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa con diferentes concentraciones de: ácido  $\alpha$ -naftalén acético (0.1, 0.5 y 1 mgL<sup>-1</sup>) y ácido giberélico (0.1, 0.5 y 1 mgL<sup>-1</sup>) y medio Knudson sólido con 30 gL<sup>-1</sup> se sacarosa, 7 gL<sup>-1</sup> de agar y diferentes concentraciones de: benziladenina (1, 1.5 y 2 mgL<sup>-1</sup>), ácido indolacético (1, 1.5 y 2 mgL<sup>-1</sup>), ácido  $\alpha$ -naftalén acético (0.1, 0.5 y 1 mgL<sup>-1</sup>) y ácido giberélico (0.1, 0.5 y 1 mgL<sup>-1</sup>).

En total se probaron 53 tratamientos con 3 repeticiones repartidos en 2 grupos (Tablas: 2.4, 2.5). Todos los medios se trabajaron en un rango de pH 5.5 - 5.7 (Ávila & Salgado, 2006; Lee *et al.*, 2007). En cada frasco de colocaron 30 mL de medio Knudson líquido y sólido y se esterilizaron autoclavandalos a 121 °C 15 psi por 30 minutos.

Tabla 2.4 Tratamientos con medio líquido para la germinación de las semillas de *Oncidium stenotis*.

<b>Medio líquido (sin agar)</b>		
Tratamiento	Reguladores de Crecimiento	
	ANA (mgL <sup>-1</sup> )	GA <sub>3</sub> (mgL <sup>-1</sup> )
1	-	-
2	0.1	-
3	0.5	-
4	1	-
5	-	0.1
6	-	0.5
7	-	1
8	0.1	0.1
9	0.1	0.5
10	0.1	1
11	0.5	0.1
12	0.5	0.5
13	0.5	1
14	1	0.1
15	1	0.5
16	1	1

Tabla 2.5 Tratamientos con medio sólido para la germinación de las semillas de *Oncidium stenotis*.

<b>Medio sólido (7 gL<sup>-1</sup>)</b>			
Tratamiento	Reguladores de Crecimiento		
	ANA (mgL <sup>-1</sup> )	BAP (mgL <sup>-1</sup> )	AIA (mgL <sup>-1</sup> )
1	-	-	-
2	1	-	-
3	1.5	-	-
4	2	-	-
5	-	1	-
6	-	1.5	-
7	-	2	-
8	-	-	1

9	-	-	1.5
10	-	-	2
11	1	1	1
12	1	1	1.5
13	1	1	2
14	1	1.5	1
15	1	1.5	1.5
16	1	1.5	2
17	1	2	1
18	1	2	1.5
19	1	2	2
20	1.5	1	1
21	1.5	1	1.5
22	1.5	1	2
23	1.5	1.5	1
24	1.5	1.5	1.5
25	1.5	1.5	2
26	1.5	2	1
27	1.5	2	1.5
28	1.5	2	2
29	2	1	1
30	2	1	1.5
31	2	1	2
32	2	1.5	1
33	2	1.5	1.5
34	2	1.5	2
35	2	2	1
36	2	2	1.5
37	2	2	2

En ambos grupos se tomaron datos del porcentaje de germinación, que se transformaron mediante la fórmula  $X = 2 \arcsen [(X / 100)^{0.5}] (180 / \pi)$ , debido a que esta variable fue sujeta a una apreciación visual subjetiva. Se analizó además el tiempo en días que tardan las semillas en indiciar el proceso



de germinación y el tiempo en días en que se presentan las primeras semillas germinadas en los diferentes tratamientos.

## 2.6 Siembra de las semillas

Las cápsulas se colocaron en la superficie desinfectada de una caja petri esterilizada donde se realizaron los cortes longitudinales con la ayuda de un bisturí desinfectado (Fig. 2.3). Se levantó la mitad de la cápsula con las pinzas y se sacó todas las semillas que se colocaron en la caja petri para la siembra en los medios de cultivo. Los restos de la cápsula fueron retirados para evitar la contaminación.



Figura 2.3 Corte longitudinal de una cápsula de *Oncidium stenotis* en el proceso de siembra (Roura, 2009).

Las semillas colocadas en las cajas petri, fueron sembradas en los medios de cultivo preparados. Con la ayuda de una espátula se recolecta una pequeña cantidad (aproximadamente 0.5 gramos) de semillas. La espátula se golpea en el filo del frasco con el fin de esparcir las semillas por toda la superficie del medio de cultivo (Fig. 2.4). En algunos casos se añadieron unas gotas de agua estéril en cada frasco de modo que ciertos grupos de semillas se separen en el caso de medio semisólidos y se distribuyan sobre el agar.



Figura 2.4 Siembra de semillas de *Oncidium stenotis* en los medios de cultivo para su germinación (Roura, 2009).

Después de la siembra los frascos se taparon inmediatamente con plástico, el cual se esterilizó dentro de la cámara de flujo laminar con luz ultra violeta. Luego, se aseguró el plástico con una cinta elástica. Finalmente se colocaron etiquetas en cada frasco par su registro e identificación (Fig. 2.5).



Figura 2.5 Medio de cultivo con semillas de *Oncidium stenotis*, con su respetiva etiqueta de identificación (Roura, 2009).

## 2.7 Encapsulación del material vegetal

En la fase de encapsulación se preparó una solución de alginato de sodio al 3% disuelto en medio Knudson base sin agar con la mitad de su concentración de sales, y una solución de cloruro de calcio a una concentración de 0.1 M. Ambas soluciones se esterilizaron a 121 °C y 1 atm de presión por 40 minutos (Tan *et al.*, 2005).

Los protocormos ya formados se colocaron en la solución de alginato de sodio (Fig. 2.6) y con la ayuda de una micropipeta se dejaron caer “gota a gota” dentro de la solución de cloruro de calcio que se encuentra agitándose (Fig. 2.7).

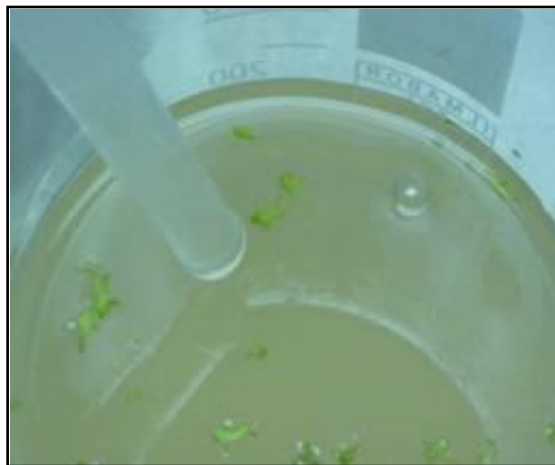


Figura 2.6 Solución de alginato de sodio que contiene protocormos de *Oncidium stenotis* (Roura, 2009).



Figura 2.7 Formación de las cápsulas de alginato de calcio, que contienen suspendidas los protocormos de *Oncidium stenotis* (Roura, 2009).

La polimerización (formación de las cápsulas) finalizó luego de 30 minutos después de que se coloca la última gota de alginato con el protocormos, polimerización, la cual se pudo controlar visualmente observando como las cápsulas translúcidas inmediatamente después de su formación progresivamente se tornan opacas indicativo de un normal proceso de polimerización. La formación de las cápsulas, este procedimiento se realizó dentro de la cámara de flujo laminar para evitar contaminación (Fabre & Dereuddre, 1990).

## 2.8 Osmoprotección

Para la fase de osmoprotección se utilizó un gradiente creciente de concentración de sacarosa. La sacarosa de cada solución se disolvió en agua estéril y las soluciones fueron esterilizadas en el autoclave a 121 °C y 1 atm de presión por 30 minutos (Flachsland *et al.*, 2002).

Luego de formadas las cápsulas, las que contengan protocormos se colocaron dentro de una solución de sacarosa con una concentración de 0.15 M por 24 horas, luego 0.25 M por 24 horas y finalmente 0.5 M por 24 horas (Fig. 2.8).

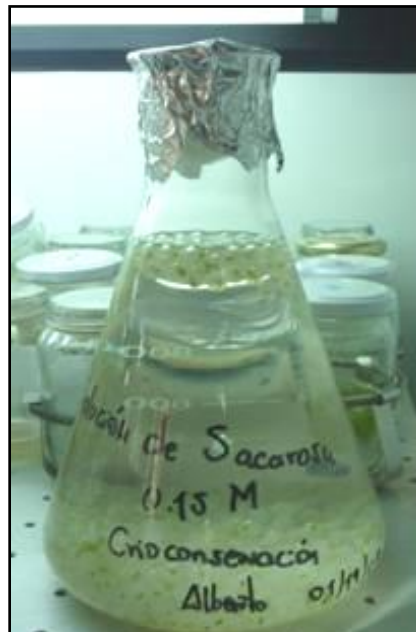


Figura 2.8 Cápsulas con protocormos de *Oncidium stenotis* dentro de una solución de sacarosa 0.15 M (Roura, 2009).

## 2.9 Deshidratación del material vegetal

La fase de deshidratación de las capsulas se inició con la eliminación de la solución de sacarosa, para lo cual se filtró las cápsulas con la ayuda de un embudo y un algodón estériles dentro de la cámara de flujo laminar, posteriormente se colocaron las cápsulas sobre la superficie de papel absorbente esterilizado en el autoclave a 121 °C y una atm de presión por 30 min.

Luego de 30 min. de colocadas las cápsulas sobre el papel absorbente, se las coloraron en cajas Petri con sílica gel selladas herméticamente y se llevaron al desecador por 5 horas (Fig. 2.19).



Figura 2.9 Cajas Petri con sílica gel que contienen los protocormos encapsulados en el desecador (Roura, 2009).

## **2.10 Crioconservación**

La crioconservación en nitrógeno líquido  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  de las cápsulas deshidratadas se la realizó de manera directa, por lo que se empacaron las cápsulas en tubos Falcon de 50 mL y se introdujeron en el tanque de nitrógeno líquido por una hora (Fig. 2.10).



Figura 2.10 Crionservación de los protocormos en tanques de NL (Roura, 2009).

### 2.11 Recuperación

Para la recuperación se retiraron las cápsulas del tanque de nitrógeno líquido e inmediatamente se colocaron a baño de María con una temperatura de 37 °C por un minuto (Fig. 2.11).



Figura 2.11 Recuperación de los protocormos crioconservados en Baño Maria a 37 °C por 1 minuto (Roura, 2009).

## **2.12 Recultivo**

Los protocormos luego de recuperados en baño de María fueron recultivados en diferentes medios de cultivo para evaluar su recuperación. El medio de cultivo fue Knudson sólido sin la presencia de sulfato de amonio (modificado) para un periodo de 7 días en completa oscuridad, a excepción de un tratamiento que evaluó la incidencia de la luz directamente. Posteriormente se transplantaron los protocormos a medios Knudson con sulfato de amonio y se los colocó con un fotoperiodo de 12 horas luz.

## **2.13 Tinción**

El TTC se disolvió en una solución buffer de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , a una concentración del 1%.

Para evaluar la sobrevivencia de los protocormos en los diferentes tratamientos post-congelamiento se colocaron los protocormos en un cubre objetos, para observar sus características antes de la tinción y se tomó una fotografía a cada protocormo, luego se colocaron los protocormos en tubos eppendorff, a los que se colocaron aproximadamente 1 mL de la solución de TTC y se incubaron en completa oscuridad por 2 horas a una temperatura de 70 °C. Finalmente se eliminó el TTC y se colocaron los protocormos teñidos en porta objetos para su observación en el estereomicroscopio.

## **2.14 Pérdida de electrolitos**

La pérdida de electrolitos se calculó según lo informado por Sun en 1999, pero con modificaciones. Las muestras de protocormos con una masa fresca de aproximadamente 500 mg, se transfirieron a vaso de precipitación de 30 mL de capacidad con 30 mL de agua bidestilada. Se realizó la medida de la conductividad del agua de imbibición de los protocormos a las 2 horas y de la



conductividad total de los protocormos que hirvieron por 10 min., y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

El porcentaje de la pérdida de electrolitos se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de pérdida de electrolitos} = \frac{\text{Conductividad del agua de imbibición a las 2 h}}{\text{Conductividad total}} \times 100$$

## 2.15 Productos de la peroxidación lipídica

Para la medición de los productos de la peroxidación lipídica y del contenido de proteínas totales se realizó la preparación de la fracción microsomal según Hurkman y Tanaka en 1986, con modificaciones.

Los protocormos se trituraron en nitrógeno líquido hasta lograr un polvo fino, aproximadamente 2 g de este polvo se homogenizó en frío con 20 mL de una solución de homogenización en politrón. La solución homogenizadora contiene 250 mmolL<sup>-1</sup> de sacarosa, 100 mmolL<sup>-1</sup> de NaCl, 1 mmolL<sup>-1</sup> de ácido tetraacético dietilenamino, 5 mmolL<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, polivinilpirrolidona 1% (m/v), 2 mmolL<sup>-1</sup> de ditiotreitól, 10 ug mL<sup>-1</sup> de bacitracín ajustado a pH 7.2 con 10 mmolL<sup>-1</sup> de Tris. Los extractos crudos se centrifugaron a 10000 x g durante 1 hora a 4 °C. Los desechos celulares, la fracción nuclear y las mitocondrias se sedimentaron, por lo que el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de ensayo y se centrifugó a 100000 x g durante 2 horas a 4 °C. La fracción microsomal se recuperó del pellet y se disolvió con 15 mmolL<sup>-1</sup> de KCl.

Luego de obtenida la fracción microsomal, se realizó la determinación del contenido de los productos de la peroxidación lipídica. Como primer paso se tomó 0.5 mL de las membranas de la fracción microsomal en un tubo de ensayo y se adicionó 5 mL de ácido tiobarbitúrico 0.5% (m/v). Las muestras se agitaron y se incubaron en baño María a 95 °C durante 30 min. Posteriormente se enfriaron los tubos en hielo durante 15 min. y se centrifugaron a 10 000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia específica del producto de la reacción se midió a 532 nm para las mediciones del malondialdehído.

## **2.16 Contenido de proteínas**

La concentración de proteínas de la fracción de las membranas microsomales obtenidas se determinó por el método de Lowry modificado (Lowry *et al.*, 1951). El suero de albúmina bovina se utilizó como estándar para realizar la curva de calibración. Una alícuota de 120 µL de la fracción de las membranas microsomales en tubos de ensayo, a continuación se adicionaron 60 µL de NaOH 1 molL<sup>-1</sup>, 800 µL del reactivo A que contiene: 1% de sulfato de cobre, 1% de tartrato de potasio y sodio y 2% de carbonato de sodio a razón de un volumen 1:1:98 y 100 µL de reactivo de Folin. La absorbancia se midió a 720 nm después de 30 min. de la reacción.

## **2.17 Análisis estadístico**

Con los datos obtenidos del proceso de germinación de los 53 tratamientos ejecutados, para la variable porcentaje de germinación se analizó a través de un arreglo factorial 2x4x4 en un Diseño estadístico completamente al azar para el grupo con medio líquido, para el grupo con medio sólido se analizaron los datos en un diseño estadístico completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y para la diferencias significativas entre los tratamientos y los grupos se aplicó una prueba Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

Para el tiempo del proceso de germinación en los tratamientos se analizaron los datos mediante un análisis de varianza (ANOVA) y para la diferencias significativas entre los tratamientos y los grupos se aplicó una prueba Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

El análisis del número de plantas regeneradas en los tratamientos (Tabla 2.6 y 2.7) se analizó con un análisis de chi-cuadrado. La sobrevivencia se evaluó mediante la tinción con TTC y se analizó mediante la prueba de chi-cuadrados. Las pruebas analíticas se analizaron mediante curvas de calibración para la peroxidación lipídica y las proteínas totales, se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) para su análisis.

Tabla 2.6 Tratamientos evaluados en la fase de recultivo en cada paso del proceso de crioconservación

Tratamiento	Fases				Pruebas
	Encapsulación	Osmoprotección	Deshidratación	Inmersión en NL	
Control (Tratamiento 1)	—————→				Medio S.R.C
2	Esferas de alginato	—————→			Medio S.R.C
3	Esferas de alginato	Sacarosa (0.15, 0.25 y 0.75 M)	—————→		Medio S.R.C
4	Esferas de alginato	Sacarosa (0.15, 0.25 y 0.75 M)	Sílica gel (5 horas)	—————→	Medio S.R.C
5	Esferas de alginato	Sacarosa (0.15, 0.25 y 0.75 M)	Sílica gel (5 horas)	-196 °C	Medio S.R.C

S.R.C: Sin reguladores de crecimiento

En la tabla 2.4 se detallan los diferentes tratamientos realizados que evalúan el número de plántulas regeneradas a partir de protocormos sometidos al proceso de crioconservación y recultivados en medios de cultivo Knudson con diferentes reguladores de crecimiento por 15 días (7 días en oscuridad y 8 días con luz). A excepción del tratamiento 8 que fue sometido los 15 días a un fotoperiodo.

Tabla 2.7 Tratamientos que evalúan la concentración de reguladores de crecimiento en el recultivo de protocormos crioconservados.

Tratamiento	Fases				Pruebas
	Encapsulación	Osmoprotección	Deshidratación	Inmersión en NL	Recultivo
6	Esferas de alginato	Sacarosa (0.15, 0.25 y 0.75 M)	Sílica gel (5 horas)	-196 °C	1.5 mgL <sup>-1</sup> AIA
7	Esferas de alginato	Sacarosa (0.15, 0.25 y 0.75 M)	Sílica gel (5 horas)	-196 °C	0.5 mgL <sup>-1</sup> BAP + 0.1 mgL <sup>-1</sup> IBA
8*	Esferas de alginato	Sacarosa (0.15, 0.25 y 0.75 M)	Sílica gel (5 horas)	-196 °C	Medio S.R.C

\* En tratamiento 8 no tendrá fase sin fotoperiodo, es decir en su recuperación desde el descongelamiento existirá un fotoperiodo de 12 horas luz (2000 luxes).

S.R.C: Sin reguladores de crecimiento