UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

EVALUACIÓN DE TRES CRIOPROTECTORES PARA EL ALMACENAMIENTO EN NITRÓGENO LÍQUIDO DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS NATIVAS DE ECUADOR DE LOS CUATRO GÉNEROS *Elleanthus, Epidendrum, Odontoglossum* y *Oncidium.*

AUTORAS:

ESTHELA ELIZABETH CUEVA CATUCUAMBA
MARÍA BELÉN MOYA ARAQUE

DIRECTORA:

IVONNE DE LOS ANGELES VACA SUQUILLO

Quito, marzo del 2015

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DEL USO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaramos que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de las autoras.

Quito, marzo del 2015

Esthela Elizabeth Cueva Catucuamba	María Belén Moya Araque
CC: 171925841-8	CC: 172301447-6

`

DEDICATORIA

A mi Señor por protegerme en todo este tiempo y darme sabiduría, fortaleza para poder llegar a este momento tan especial en mi vida.

A las personas que más amo en mi vida mi familia; mi padre Luis por apoyarme en mi carrera en mis logros y por sacrificarse por mí todos los días y darme lo mejor, mi mami Esthela por ser forjadora de mi carácter y pilar fundamental en mi vida y mi hermana Verónica por estar pendiente de mí, ser un apoyo incondicional y ser como mi segunda madre.

A mis amigas Margorie, Aracely y Andrea por siempre estar pendiente de mí y darme ánimo y fuerzas para culminar mi trabajo de titulación.

Elizabeth Cueva

Al creador, por brindarme la fuerza y sabiduría para la culminación de esta etapa muy importante de mi vida.

Con todo mi cariño y mi amor a mis padres Patty y Marcelo, por que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano en todo momento, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A mis hermanos Andrés y Sebastián por siempre estar listos para brindarme toda su apoyo y amor, a ustedes mi eterno agradecimiento.

A mi princesa Aileen por ser mi motivo diario de superación, mi alegría y mi orgullo; que el presente trabajo sea un ejemplo de que siempre con decisión y constancia nada es imposible.

Belén Moya

AGRADECIMIENTO

Al laboratorio CIVABI (Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad) por facilitarnos sus instalaciones y personal para poder culminar la fase experimental de nuestra tesis.

A la Msc. Ivonne Vaca por ser nuestra tutora y guía en todo el proceso del trabajo de titulación, además por su apoyo en el desarrollo estadístico del presente estudio.

A la Directora de Carrera Ing. Diana Calero por su ayuda incondicional.

Al Msc. Marco Cerna por su apoyo con el proyecto de investigación Banco de germoplasma de Orquídeas del Ecuador Fase I (sección Cotacachi-Cayapas).

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO 1 4

MARCO TEÓRICO 4

1.1 Orquídeas 4

1.1.1 Generalidades 4

1.1.2. Hábitat 4

1.1.3 Taxonomía 4

1.1.4 Morfología de las orquídeas 5

1.1.5 Orquídeas en el Ecuador 8

1.1.6 Género *Elleanthus* 10

1.1.7 Género *Epidendrum* 11

1.1.8 Género *Odontoglossum* 12

1.1.9 Género *Oncidium* 13

1.2 Conservación de recursos fitogenéticos 14

1.2.1. Importancia de los recursos fitogenéticos 15

1.2.2 Conservación *in situ* 15

1.2.3 Conservación *ex situ* 15

1.3 Crioconservación 17

1.3.1 Ventajas de la crioconservación 18

1.3.2 Métodos de crioconservación 18

1.3.2.2 Método basado en vitrificación 21

1.4 Métodos de congelamiento 21

1.4.1 Congelamiento rápido 21

1.4.2 Congelamiento lento 22

1.5 Nitrógeno líquido 22

`

1.6 Viabilidad de semillas de orquídeas 22

CAPÍTULO 2 24

MARCO METODOLÓGICO 24

2.1 Materiales 24

2.2 Reactivos 24

2.3 Equipos 24

2.4 Ubicación 24

2.5 FASE 1: Descripción morfológica de semillas de cuatro géneros de orquídeas. 25

2.6 FASE 2: Determinación de la viabilidad de semillas de orquídeas sometidas a procesos de crioconservación. 28

2.7 FASE 3: Determinación de un protocolo de almacenamiento de semillas de orquídeas utilizando nitrógeno líquido. 31

CAPÍTULO 3 36

RESULTADOS-DISCUSIÓN 36

3.1 FASE 1: Describir morfológicamente las semillas de cuatro géneros de orquídeas. 36

3.1.1 Género *Elleanthus* 37

3.1.2 Género *Odontoglossum* 37

3.1.3 Género *Epidendrum* 38

3.1.4 Género *Oncidium* 39

3.2 FASE 2: Determinación de la viabilidad de semillas de orquídeas sometidas a procesos de crioconservación. 40

3.2.1 Prueba de tetrazolio 40

3.2.2 Prueba presencia de embrión 43

3.3 FASE 3 (Evaluación *ex vitro*): Determinación de un protocolo de almacenamiento de semillas de orquídeas utilizando nitrógeno líquido. 47

3.3.1 Turgencia (Evaluación *in vitro)*: 51

`

3.3.2 Evaluación *in vitro*: contaminación bacteriana y fúngica..... 52

C**ONCLUSIONES**..... 55

RECOMENDACIONES..... 57

LISTA DE REFERENCIAS 58

ANEXOS..... 65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de las orquídeas según su eje de crecimiento…….5
Figura 2. Estructura floral de *Orchidaceae* ……6
Figura 3. Semilla de orquídea género *Epidendrum* …….....7
Figura 4. *Elleanthus capitatus*……...11
Figura 5. *Epidendrum macrocarpum* Rich…….…...12
Figura 6. *Odontoglossum halli* Elegans…….13
Figura 7. *Oncidium* sp……....14
Figura 8. Medición de longitud y diámetro de las semillas de los cuatro géneros bajo el microscopio…….27
Figura 9. Metodología de evaluación de semillas con tetrazolio ……..29
Figura 10. Metodología de evaluación con presencia de embrión ……..30
Figura 11. Semillas del género *Elleanthus*……37
Figura 12. Semilla del género *Odontoglossum*…….38
Figura 13. Semillas del género *Epidendrum*…….39
Figura 14. Semillas del género *Oncidium*…….....40
Figura 15. Porcentaje de viabilidad en semillas de orquídeas en prueba de tetrazolio antes y después de crioconservación…….....41
Figura 16. Positivo tetrazolio género *Elleanthus* y *Odontoglossum*…….42
Figura 17. Fotografías de semillas de los cuatro géneros de orquídeas antes y después de crioconservación……...……43
Figura 18. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de viabilidad por test de presencia de embrión antes y después de crioconservación.……..44
Figura 19. Porcentaje de viabilidad en semillas de orquídeas en prueba de tetrazolio y presencia de embrión después de crioconservación……..……..45
Figura 20. Viabilidad por presencia de embrión de los géneros *Elleanthus* y *Odontoglossum* después de crioconservación……46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de color en semillas de cuatro géneros de orquídeas. 26
Tabla 2. Interacción entre crioconservante, dos técnicas de enfriamiento y tres crioprotectores por género..... 32
Tabla 3. Promedio (±) el error estándar de la longitud, diámetro número de semillas en un mg, forma y color de semillas de cuatro géneros de orquídeas..... 36
Tabla 4. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de viabilidad test de tetrazolio y presencia de embrión en relación a la técnica de enfriamiento (rápido-escalonado)..... 47
Tabla 5. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de viabilidad de semillas en las pruebas de tetrazolio y presencia de embrión en relación al crioprotector..... 48
Tabla 6. Promedio (±) el error estándar del análisis del porcentaje de viabilidad de semillas en las pruebas de tetrazolio y presencia de embrión en relación al crioprotector y la técnica de enfriamiento utilizada..... 49
Tabla 7. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de turgencia de semillas después de crioconservación..... 51
Tabla 8. Promedio (±) el error estándar porcentaje de contaminación *in vitro* en relación a género y crioprotector..... 53

`

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Escala Colorimétrica 65
Anexo 2. Formas generales de semillas 66
Anexo 3. Formas de semillas según Arditti 67
Anexo 4. Informe final Ministerio de Ambiente 68
Anexo 5. Protocolo de desinfección de semillas de orquídeas 69
Anexo 6. Procedimiento preparación de crioviales (crioprotector + semillas estériles) 70
Anexo 7. Procedimiento: Método de enfriamiento escalonado 71
Anexo 8. Procedimiento: Método de enfriamiento rápido 72

RESUMEN

En los últimos años las investigaciones de conservación realizadas por diferentes naturalistas y científicos, se han enfocado a preservar la Flora, ya que es parte fundamental de ecosistemas equilibrados. En el Ecuador, el nivel de endemismo de la familia *Orchidaceae* es alto, por lo que investigar alternativas de conservación es una importante herramienta con el fin de prolongar y asegurar su permanencia. El presente estudio se basó en el desarrollo de un protocolo de crioconservación de semillas de cuatro géneros de orquídeas *Elleanthus, Odontoglossum, Epidendrum* y *Oncidium*; mediante la evaluación de la interacción de los siguientes crioprotectores: C1 (1,5ml DMSO 1M), C2 (0,75ml de DMSO 1M+ 0,75ml de Sucrosa 1M), C3 (0,75ml de DMSO 1M+ 0,75ml de Glicerol 1M), C4 (0,5ml de DMSO 1M+ 0,5ml de Sucrosa 1M + 0,5ml de Glicerol 1M) y, dos técnicas de enfriamiento: Rápido (sumergidas directamente a -196°C); y, Escalonado (descenso de temperatura a -80°C y posteriormente a -196^{0}C en nitrógeno líquido). El material vegetal se obtuvo del Banco de germoplasma de Orquídeas del Ecuador Fase I (sección Cotacachi-Cayapas) almacenado en el centro de investigación y valoración de biodiversidad CIVABI-UPS. Los resultados muestran que en la técnica de enfriamiento rápido, el mejor crioprotector es el C1 (Dimetilsulfóxido), con los mayores porcentaje de viabilidad en la prueba de tetrazolio (*ex vitro*) en los géneros *Elleanthus, Epidendrum* y *Oncidium* con un promedio de 66,3%, 57,9% y 47,5%, respectivamente. Mientras que, en *Odontoglossum* el C2 (Dimetilsulfóxido+Sucrosa) con técnica de enfriamiento escalonada, presentó los mejores resultados con un 66,55% de viabilidad. Para la variable porcentaje de turgencia (*in vitro*) el protocolo óptimo de almacenamiento de semillas para todos los géneros, fue la técnica rápida más C1 (Dimetilsulfóxido), presentando un rango de turgencia desde un 55% a 83,3%.

Palabras claves: crioconservación, crioprotector, dimetilsulfóxido, orquídeas, turgencia, viabilidad.

ABSTRACT

In recent years conservation research conducted by different naturalists and scientists have focused on preserving the flora, since it is a fundamental part of balanced ecosystems. In Ecuador, the level of endemism of Orchidaceae is high, so investigate alternative conservation is an important tool in order to prolong and ensure their permanence. This study was based on the development of a cryopreservation protocol seed four orchid *Elleanthus Odontoglossum*, *Epidendrum* and *Oncidium*; by evaluating the interaction of cryoprotectants following: C1 (1,5ml DMSO 1M), C2 (0,75ml DMSO 1M + 0,75ml Sucrose 1M), C3 (0,75ml DMSO 1M + 0,75ml Glycerol 1M), C4 (0,5 DMSO 1M + 0,5ml Sucrose 1M+ 0,5ml Glycerol 1M) and two cooling techniques: Fast (submerged directly to -196 °C); and shoulder (temperature drop to -80 °C and subsequently in liquid nitrogen at -196 °C). The plant material was obtained from the genebank of Orchids of Ecuador Phase I (section Cotacachi-Cayapas) stored in the research and biodiversity assessment CIVABI-UPS. The results show that in the rapid cooling technique, is the best cryoprotectant C1 (Dimethylsulfoxide), with the largest percentage viability tetrazolium test (*ex vitro*) in *Elleanthus* gender, *Oncidium* and *Epidendrum* averaging 66, 3%, 57,9% and 47,5% respectively. While in *Odontoglossum* C2 (Dimethylsulfoxide + Sucrose) with stepwise cooling technique, showed the best results with a 66,55% viability. For variable rate turgor (*in vitro*) the optimal seed storage protocol for all genders was more rapid technique C1 (Dimethylsulfoxide), presenting a range of turgor from 55% to 83,3%.

Keywords: cryopreservation, cryoprotectant dimethyl sulfoxide, orchids, turgor, viability.

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae constituye uno de los grupos de plantas más diversos, con alrededor de 25000 especies conocidas a nivel mundial (Chase , Freudenstein, Cameron, & Barrett, 2011) (Dressler, 2005), se considera que una de cada 10 plantas en el mundo es una orquídea. En Ecuador se han catalogado 228 géneros con 4023 especies, sin embargo, el número podría superar fácilmente las 4500, por lo que es considerado uno de los 17 países con mayor diversidad de orquídeas en el mundo (Jijón, 2007, pág. 336). Del total de orquídeas que existen en el país, aproximadamente el 40% son endémicas por la presencia de gran variedad de microclimas, razón por la cual las orquídeas tienen propensión natural a la formación de nuevas especies (Jijón, 2007, pág. 336) (Ecuagenera, 2011).

Esta familia aunque es muy numerosa, algunas especies se encuentran amenazadas o en peligro de erradicación, debido al saqueo indiscriminado, destrucción de espacios, contaminación ambiental, incendios y deforestación (Mayo, Cazares, Lazaro, & Flores, 2010), el cambio climático es también un factor relevante ya que provoca una baja tasa de reproducción natural por la disminución de polinizadores (Tellez, Hernandez, & Hernandez, 2007) (Arditti, Fundamentals of Orchis Biology, 1992, p. 692). Las alteraciones mencionadas han contribuido a que algunas orquídeas se encuentren catalogadas y reportadas en el libro rojo de especies amenazadas de Ecuador, por esta razón es importante evaluar métodos eficientes de conservación *in situ* y *ex situ* (Valencia, Pitman, León-Yánez, & Jorgensen, 2000).

Entre las técnicas *ex situ* más usadas para la conservación de tejidos está, la criogenia la cual consiste en someter a los tejidos vegetales a temperaturas muy bajas, de -196 °C temperatura a la que se encuentra el nitrógeno líquido. Se utiliza dos tipos de enfriamiento: el rápido que consiste en la inmersión rápida a nitrógeno líquido y, el lento que se basa en el descenso escalonado de la temperatura hasta 40 °C y después inmersión en nitrógeno líquido. Mediante la técnica de crioconservación los tejidos tratados pueden ser recuperados. Además, presenta ventajas frente a otras técnicas tradicionales como la conservación *in vitro o in vivo*; la principal razón es la suspensión completa del metabolismo, evitando así el deterioro del material conservado, la variabilidad en la herencia y el riesgo fitopatológico y fisiológico

(Gonzalez A. , 2001). Según la investigación realizada en Rusia por Nikishina, Popov, Kolomeitsevay, & Golovkin (2001), al efectuar la crioconservación de semillas de orquídeas tropicales no presentaron efecto negativo y las semillas después del almacenamiento germinaron con éxito, además se demostró la posibilidad de crear un banco criogenético de orquídeas.

El objetivo del presente estudio es plantear a la crioconservación, como una técnica alternativa de almacenamiento de semillas de orquídeas nativas de Ecuador en nitrógeno líquido para asegurar la conservación del material vegetal sano a largo plazo, y contribuir a la preservación de un valioso recurso fitogenético de Ecuador, como son las orquídeas pertenecientes a los géneros *Elleanthus, Epidendrum, Odontoglossum* y *Oncidium*, mediante la evaluación de tres crioprotectores (Dimetilsulfóxido, Sucrosa y Glicerol) y dos técnicas de enfriamiento (Rápido y Escalonado), para la determinación de un protocolo óptimo de almacenamiento de semillas por tiempo indefinido y que sirvan como material de estudio e investigaciones científicas en el futuro.

El material base actualmente se encuentra almacenado en el centro de investigación y valoración de biodiversidad (CIVABI) como el resultado del proyecto Banco de germoplasma de Orquídeas del Ecuador Fase I (sección Cotacachi-Cayapas) ejecutado por el Doctor Marco Fernando Cerna Cevallos, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, con Autorización de investigación científica N° 08-2013-0869-IC_FAU-FLO-DAPI-UNO-MAE emitido por el Ministerio del Ambiente.

Hipótesis

Hipótesis alternativa

Al menos uno de los crioprotectores propuestos permitirá una adecuada crioconservación de la mayoría de las semillas de orquídeas nativas de Ecuador.

Hipótesis nula

Ninguno de los crioprotectores propuestos permitirán una adecuada crioconservación de la mayoría de las semillas de orquídeas nativas de Ecuador.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar tres crioprotectores mediante la aplicación de dos técnicas de enfriamiento para la conservación de semillas de cuatro géneros de orquídeas nativas de Ecuador utilizando nitrógeno líquido.

Objetivos específicos

- Describir morfológicamente las semillas de cuatro géneros de orquídeas nativas de Ecuador para facilitar su identificación.
- Determinar la viabilidad de semillas de cuatro géneros de orquídeas sometidas a procesos de crioconservación usando dos metodologías de evaluación.
- Determinar un protocolo óptimo de almacenamiento de semillas para cuatro géneros de orquídeas, mediante la evaluación de tres crioprotectores y dos técnicas de enfriamiento, buscando obtener la mayor cantidad de semillas viables.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Orquídeas

1.1.1 Generalidades

Las orquídeas forman parte de las monocotiledóneas, herbáceas y perennes, constituyen una de las familias más numerosas, con aproximadamente 25000 especies y 800 géneros, su nombre proviene del latín *orchids* que apareció por primera vez en un manuscrito del filósofo griego *Theophrastus (371-285 a.C)* el cual significa testículo por alusión a los pseudobulbos de algunas especies (Freuler, 2007).

1.1.2. Hábitat

Las orquídeas según su hábitat se clasifican en:

-Epífitas: en su mayoría, estas crecen sobre los árboles, usándolos solo de apoyo.

-Terrestres: crecen en un compuesto de tierra y detritos vegetales.

-Litófitas: crecen sobre roca, en pequeñas cavidades donde quedan depositadas (Fischer, 2007).

1.1.3 Taxonomía

Según la clasificación taxonómica APGIII Mark y James (2009).

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

Subfamilias según Menchaca & Moreno (2011).

Epidendroideae

Orchidoideae

Vanilloideae

Cypripedioideae

Apostasioideae

1.1.4 Morfología de las orquídeas

De acuerdo con el eje de crecimiento las orquídeas suelen clasificarse en: monopodiales, el tallo crece apicalmente provisto de raíces en toda su longitud con dirección longitudinal de forma indefinida y; simpodiales, poseen tallo o pseudobulbos de crecimiento definido (Fig.1), una vez que ha florecido no pueden seguir creciendo, dan origen a nuevos brotes a partir de una yema localizada en la base del tallo (Jijón, 2007, pág. 336).

Crecimiento de las orquídeas.

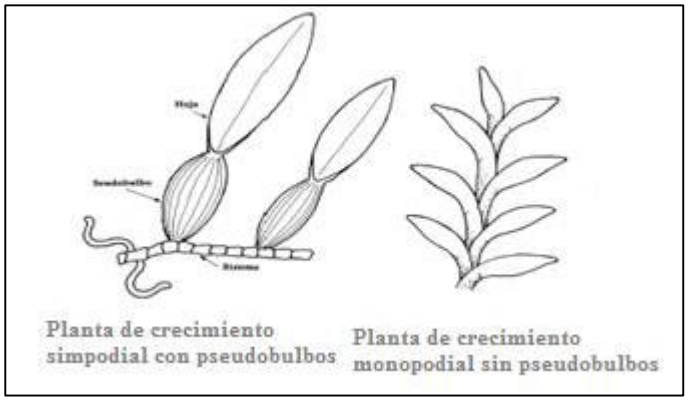


Figura 1. Crecimiento de las orquídeas según su eje de crecimiento.

Fuente: (Dodson, 1991)

Sus flores son muy características y varían de tamaño de unos pocos milímetros hasta 45 centímetros de diámetro, se encuentran de todos los colores e incluyen muchas flores multicolores. Algunas orquídeas son inodoras, mientras que otras tienen una variedad de fragancias como la *Maxillaria tennuifolia* (Larson, 1996).

Su flor es hermafrodita de simetría bilateral (zygomorfa), posee tres sépalos (cáliz) y tres pétalos (corola); uno de los pétalos (el del medio) se ha modificado y por ello recibe el nombre de labelo (Freuler, 2007). El labelo es la parte de la flor que desarrolla mayores adaptaciones con la finalidad de atraer a los insectos polinizadores de la flor, puede presentar características como callos, producir néctar, aceites o compuestos aromáticos. También envuelve a una pieza central llamada columna, es el lugar donde se produce el polen y contiene los órganos sexuales femenino y masculino, entre estas partes se encuentra el rostelo de forma puntiaguda y sirve como barrera para evitar que se autopolinice (Fig. 2) (Jijón, 2007, pág. 336).

Estructura floral de *Orchidaceae*

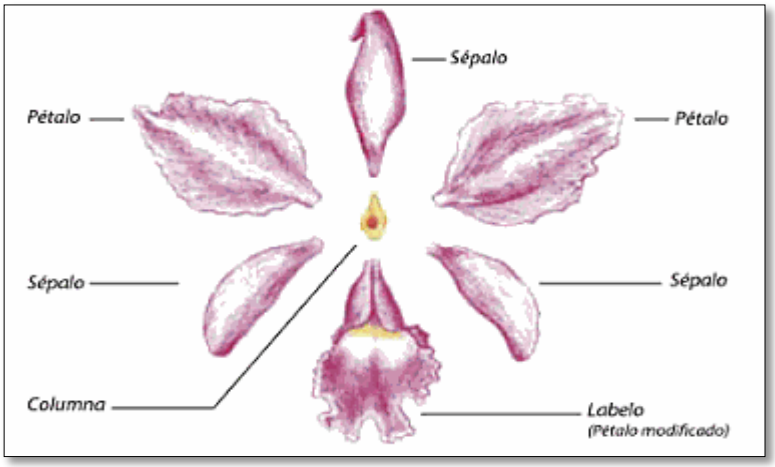


Figura 2. Partes de la flor de una orquídea.

Fuente: (Freuler, 2007)

El ovario es ínfero está situado debajo de todas las demás estructuras florales (sépalos, pétalos, estambre y estigma) y se une a la vara de floración a través de un pequeño tallo llamado pedicelo o pedúnculo, estos pueden contener miles y millones de óvulos (Jijón, 2007, pág. 336).

> El polen es una masa llamado polinio ubicada en la antera formado por dos, cuatro, seis u ocho paquetes amarillos, blancos o de otro color, en algunos casos contienen unos apéndices llamados caudículas constituidas por una sustancia elástica formada dentro de la antera o estípite como soporte celular más o menos largo. La antera y polinios

se encuentran encerrados en una especie de receptáculo de la columna llamado clinandrio (Dodson, 1991).

La inflorescencia se produce desde la axila de la hoja u opuesta a esta, en la base del pseudobulbo, en la punta del vástago. Su estructura típica es un racimo; también hay inflorescencias en panícula, espiga y umbela (Fanfani & Rosi, 1988).

El tallo de las orquídeas presenta tres tipos: tallos cilíndricos, son alargados y erectos con entrenudos de donde salen las hojas e inflorescencias; pseudobulbos son aéreos, engrosados y abultados; y, cormosubterráneos gruesos, casi esféricos con varios entrenudos (Menchaca & Moreno, 2011, pág. 48). "Presentan las hojas típicas de monocotiledóneas, con prominentes nervios paralelos y de forma alargada, algunas especies tienen hojas peninervadas o profundamente lobuladas" (Jijón, 2007), pueden ser gruesas o delgadas, suaves o frecuentemente plegadas, con variedad de formas desde lineales, ovaladas o circulares y están formadas alternadamente a lo largo del tallo (Larson, 1996).

La semillas de las orquídeas son muy pequeñas, su dimensión varía entre 0,4 y 1,25 mm de longitud, consiste de un embrión indiferenciado suspendido dentro de una estructura reticulada (la testa) y rodeado de un gran volumen de aire (Fig. 3), lo que le permite flotar por períodos largos. Algunas especies pueden producir 1300 semillas por fruto, mientras que otras pueden producir hasta 4 millones (Arditti, Fundamentals of Orchis Biology, 1992). Las semillas están desprovistas de reserva alimenticia (endospermo) por lo que para lograr su germinación necesita la presencia de un hongo (López, 2004).

Semilla de orquídea género *Epidendrum*

Figura 3. Fotografía de semilla de orquídea género *Epidendrum*,

por E. Cueva & Moya, 2014

No presentan raíz principal, su sistema radicular está formado por raíces secundarias que emergen del tallo (Jijón, 2007), están cubiertas por un velamen; una especializada epidermis de una o muchas capas de células que mueren paulatinamente a medida que la raíz madura, este actúa como esponja para tomar agua y nutrientes, las puntas de las raíces son de color verde y el resto si está en buenas condiciones son de color blanco (Fischer, 2007).

"Los frutos son nombrados botánicamente como cápsulas, divididos en tres en su interior, los hay largos y ovalados o casi redondos, y pueden tener verrugas o ser muy angulosos" (Menchaca & Moreno, 2011).

1.1.5 Orquídeas en el Ecuador

"El Ecuador se encuentra entre los 17 países con mayor diversidad de plantas en el mundo, que a pesar de representar menos del 0,2% de la superficie del planeta, alberga la mayor cantidad de especies por km^2" (Jijón, 2007) (Vasquez & Saltos, 2009).

En los últimos 13 años se han reportado 2433 especies vegetales nuevas en el país, de las cuales 1663 son nuevas para la ciencia. Actualmente se registran 18198 especies de plantas vasculares de estas 17748 son nativas. La familia Orchidaceae actualmente registra 228 géneros y 4300 especies, lo que representa que una de cada cuatro especies de plantas que crecen en los hábitats silvestres del país es una orquídea (Garcia, Parra, & Mena) (León-Yánez, Valencia, Pitman, Endara, Ulloa, & Navarrete, 2011) (Neil & Ulloa-Ulloa, 2005) (Ambiente, 2010a).

1.1.5.1 Endemismo de orquídeas en Ecuador

La Familia Orchidaceae, aporta al fitoendemismo ecuatoriano con un tercio del total de especies. En el país existen orquídeas en todos los pisos altitudinales desde los 0 hasta los 4500 msnm (Endara, 2009), sin embargo "la mayor cantidad de orquídeas se encuentran en microhábitats de los sistemas montañosos comprendidos entre los 1500-3000 msnm" (Sierra, Cerón, Palacios, & Valencia, 1999).

"El endemismo registrado en el país se debe a su posición estratégica ya que es un punto de convergencia de flora tiene presencia de la cordillera de Los Andes, corrientes

marinas como la cálida del Niño y la Fría de Humbolt" (Jijón, 2007), las orquídeas son especialistas en ambientes y espacios restringidos, los microclimas que acogen a estas especies poseen características especiales y se encuentran distribuidas a lo largo del territorio, así mismo estas especies se encuentran amenazadas por el cambio acelerado de los patrones climáticos y otros factores que pueden tener un impacto significativo en la supervivencia principalmente en algunas regiones de los bosques de la Costa, así como en los bosques de Los Andes, donde se presenta el mayor endemismo de especies (Sierra, Patrones y factores de deforestación en el Ecuador continental 1990-2010 y un acercamiento a los próximos 10 años, 2013) (León-Yánez, Valencia, Pitman, Endara, Ulloa, & Navarrete, 2011).

1.1.5.2 Distribución de orquídeas Endémicas en Ecuador

En general se puede mencionar que "la diversidad de orquídeas en el Ecuador, se encuentra en un rango de altitud entre los 1000 y 3000 msnm. Bajo este rango la diversidad representa el 22% del total de especies, en tanto que sobre los 3000 msnm el 18%" (Jijón, 2007).

Las orquídeas con su capacidad de adaptación pueden colonizar cualquier ecosistema, en nuestro país no existe región o formación vegetal en la que no hayan conquistado, se las encuentra en las cuatro regiones y en las diversas altitudes de las formaciones naturales (Jijón, 2007). "El estado de conservación de la flora en el Ecuador continúa siendo un desafío. La mayoría de especies de plantas endémicas 3504 especies – cerca del 78%, enfrenta algún grado de amenaza. Es así, que 353 especies (8%) se encuentran En Peligro Crítico de extinción (CR), 1071 (24%) están En Peligro (EN) y 2080 (46%) se consideran Vulnerables (VU) (León-Yánez, Valencia, Pitman, Endara, Ulloa, & Navarrete, 2011).

"Actualmente las actividades de conservación *ex situ* en el Ecuador tiene muchas limitaciones; la principal es la financiera dado los costos elevados que este tipo de conservación conlleva y la falta de un presupuesto pre-asignado por el Estado para estas actividades" (INIAP, 2008).
A continuación se describen los géneros evaluados en el presente estudio.

1.1.6 Género *Elleanthus*

Este género es común en bosques húmedos, bancos húmedos abiertos; pueden ser terrestres, epífitas o litófitas, crecen hasta 2400 msnm. Generalizada en las Antillas, México, América Central, Perú y el sur de Brasil. Es una planta alta de 0,6 – 0,3 m de altura, robusta con simple ramificación anterior, en grupos dispersos; tallo frondoso, de 3-5 mm de diámetro, cubierto con vainas de las hojas. Hojas cartáceas, elíptico-lanceoladas a estrechamente lanceolada, acuminadas larga, conspicuamente nervadas, 10-23 cm de largo, 2-7 cm de ancho. Presenta inflorescencias con cabezas hemisféricas de muchas flores cubiertas con líquido mucilaginoso, 3-8,5 cm de largo, 2,5-6 cm de diámetro. Brácteas florales imbricadas, ovado-triangulares, los exteriores sin flores, 2,5-6 cm de largo, 8-15cm de ancho. Flores color rosa púrpura (Fig. 4), en ovarios pedicelados que son 1-1,1cm de largo. Sépalos oblongo-elípticos, de 9-13 mm de largo, 35 mm de ancho; sépalo dorsal obtuso a subagudo, subaguda sépalos laterales a aguda, apiculados. Pétalos lineal o blanceolados, obtuso 9-12 mm largo 1,5-2,2 mm de ancho por encima de la media. Labio ampliamente emarginado, sacada y con 2,5 mm de largo y 1,5 mm de ancho. Columna ligeramente dilatada anteriormente, con un proyectar, proceso obtuso en el lado anterior justo debajo de la estigma. Cápsula elipsoide, alrededor de 1,2 cm de largo y 5 mm de diámetro. Esta especie es muy común en la mayor parte de América Central y el norte de América Sur. Alcanza su máximo desarrollo en Los Andes de Colombia y Perú (Oakes & Donovan, 1985) (Cavero, Collantes, & Patroli, 1991).

Elleanthus capitatus

Figura 4. Flor de *Elleanthus capitatus*
Fuente: (ECUAGENERA, 2014)

1.1.7 Género *Epidendrum*

Su nombre proviene del griego *epi* que significa sobre y *dendrom* árbol, en alusión al hábito de la mayoría de las especies que viven sobre árboles. Uno de los géneros más amplios de la familia, sobrepasando las 1000 especies. Se encuentra principalmente en Centro y Sur América. Aunque la mayoría son epífitas, algunas son litófilas o terrestres, generalmente presentan un tallo en forma de caña que puede llegar a medir hasta 2 metros de longitud. La inflorescencia es un racimo terminal, con un número variable de flores según la especie. Muy escasos individuos generan su inflorescencia lateralmente. Las flores son de color, tamaño y aroma muy variados (Cavero, Collantes, & Patroli, 1991). Estas especies también son conocidas como "crucifijo" de tallo junciforme, la mayoría de especies tienen finos tallos como juncos, otras los tienen gruesos formando pseudobulbos funcionales (Fig. 5) estás catalogada en el mismo grupo de *Brassavola, Cattleya, Encyclia, Laelia Rhyncholaelia y Sophronitis* (Nash & La Croix, 2007).

***Epidendrum macrocarpum* Rich**.

Figura 5. Flor de *Epidendrum macrocarpum* Rich.
Fuente: (Aguirre, León , Yaguana, & Merino, 2011)

Debido a que la mayoría de especies proceden de diferentes altitudes, estas prefieren ambientes cálidos y luminosos. “Los tipos de Crucifijo o de tallo junciforme pueden crecer en el suelo en zonas de clima frío y sin heladas. Algunas tienen un periodo de reposo y otras crecen continuamente” (Nash & La Croix, 2007).

1.1.8 Género *Odontoglossum*

Su nombre proviene del griego *odous,* diente y *glossa,* lengua en alusión al callo del labelo.“Crece en las regiones montañosas del Centro y Sur America desde México hasta Los Andes peruanos. El mayor grupo de especies se encuentran en elevaciones entre 1500-2700 msnm, aunque algunas especies se han encontrado a 3660 msnm” (Cavero, Collantes, & Patroli, 1991).

> Es un género que cuenta con unas 60 especies, es característico de entornos fríos procedentes de las regiones montañosas de Sudamérica, se encuentra emparentado con *Oncidium y Miltoniopsis*. La mayoría de especímenes poseen espigas largas o cortas con flores grandes y

vistosas, amarillas y pardas a menudo araneiformes (Fig. 6). Las especies ornamentales más populares son las blancas y rosas, con los segmentos más anchos que hacen que parezcan redondas. En cuanto a su cultivo prefieren ambientes fríos y semisombreados, poco tolerantes a sol directo en sus hojas (Nash & La Croix, 2007) (Fischer, 2007).

***Odontoglossum halli* Elegans**

Figura 6. Flor de *Odontoglossum halli* Elegans

Fuente: (ECUAGENERA, 2014)

1.1.9 Género *Oncidium*

Etimología del griego *ankidion*, tubérculo, en alusión a las callosidades del labelo de todas las especies del género, sus especies son denominadas bailarinas, debido a la dispersión floral semejante a un conjunto de bailarinas de ballet (Nash & La Croix, 2007).

Orquídeas epífitas caracterizadas por sus flores que se presentan generalmente en varas o ramilletes, crecen a más de 2000 msnm (Fischer, 2007).

Constituyen un gran género de orquídeas simpódicas, procedentes de América tropical, este género contiene más de 650 especies diferentes,

en general se presentan con flores pardas y amarillas grandes inflorescencias ramificadas (Fig. 7). La mayoría tiene un pseudobulbo definido, 4 hojas en el ápice. Sus inflorescencias crecen normalmente en la axila de los brotes recién maduros. En muchas de las especies de este género, el labelo es el rasgo más prominente. Florecen una vez del pseudobulbo. Las necesidades de estas orquídeas son diferentes dependen del hábitat y la altitud a la que crece la especie, la mayoría prefiere ambientes intermedios (Nash & La Croix, 2007).

***Oncidium* sp**

Figura 7. Flor de *Oncidium* sp

Fuente: (Grobler, 2012)

1.2 Conservación de recursos fitogenéticos

"Los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (RFAA) son cualquier material de origen vegetal, incluido el material reproductivo y de propagación vegetativa que contiene unidades funcionales de la herencia, y que tiene valor real o potencial para la alimentación y la agricultura" *(SMICS, 2014)*.

1.2.1. Importancia de los recursos fitogenéticos

Los recursos fitogenéticos son importantes porque "permite la utilización de métodos para captar la máxima diversidad de genotipos, así como el uso de técnicas de conservación para una posterior regeneración, amortiguando las pérdidas a través del tiempo del material vegetal" (Rao N. , 2014).

Entre la conservación de los recursos genéticos de la flora se distinguen principalmente dos formas básicas de almacenamiento:

1.2.2 Conservación *in situ*

> Se basan en la conservación de las plantas en sus hábitats naturales e incluyen la conservación en Parques Nacionales y en Reservas Ecológicas, los cuales requieren un considerable espacio físico, altos costos asociados a la necesidad de mano de obra especializada, control permanente de enfermedades y malezas, a la par que las plantas están expuestas a las inclemencias del clima y de los incendios (Scocchi & Rey, 2001).

1.2.3 Conservación *ex situ*

La conservación *ex situ* complementa la conservación *in situ*, almacenando a largo plazo germoplasma representativo de las poblaciones, permitiendo un mejor conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado, y proporcionando propágulos para su utilización en programas educativos, programas de mejora genética de especies cultivadas y en planes de reforzamiento, reintroducción o introducción (Mcnelly, Miller, Reid, Mittermeier, & Werner, 1990).

Los métodos de conservación *ex situ* implican la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética de una especie y su mantenimiento fuera de las condiciones naturales en las que la especie ha evolucionado. Las ventajas que

proporcionan estos métodos son control directo sobre el material, fácil accesibilidad y disponibilidad (Mcnelly, Miller, Reid, Mittermeier, & Werner, 1990).

1.2.3.1 Tipos de conservación ex situ

1.2.3.1.1 Bancos de semillas

"Son sitios convenientes para la conservación de germoplasma *ex situ*, porque permiten almacenar una gran variabilidad genética en forma económica y práctica" (Scocchi & Rey, 2001). Este protocolo de conservación en general es más recomendado para semillas ortodoxas que resisten la desecación y almacenamiento a bajas temperaturas (entre 5°C y -20 °C) sin que ello implique pérdida de viabilidad, sin embargo es inadecuado para semillas recalcitrantes que no resisten la desecación (Abdelnour, A, 1994, pág. 38).

1.2.3.1.2 Colección de campo

Constituyen el método tradicional de conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos, existen:

Jardines Botánicos: Son instituciones que mantienen colecciones documentadas de plantas vivas con el propósito de realizar investigación científica, conservación, exhibición y educación. Los jardines botánicos y algunas colecciones afines posibilitan la conservación *ex situ* de las especies, es decir, que las plantas vivan y se preserven fuera de su ambiente original, así como también permiten la conservación *in situ*, es decir, en su propio ambiente, en los jardines que se encuentran ubicados en áreas con vegetación natural. Desempeñan un papel importante en la clasificación, evaluación y utilización sostenible de la riqueza genética vegetal del planeta (Sánchez, 2011) (Wyse & Sutherlan, 2000).

Colecciones de plantas: "constituyen el método tradicional de conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos que permiten mantener plantas vivas, se aplica en aquellas especies que permiten una reproducción vegetativa" (Abdelnour, A, 1994, pág. 38).

1.2.3.1.3 Conservación *in vitro*

“Son centros orientados al almacenamiento mediante propágulos de una parte representativa de la variabilidad genética correspondiente a una determinada especie” (Iriondo, 2001). En los mismos se busca maximizar la diversidad de ejemplares recolectados de poblaciones en campo o en su centro de origen (Wang, Fan, & Liaw, 2005).

1.2.3.1.3.1 Tipos de conservación *in vitro*

> Almacenamiento mediano plazo: consiste en mantener los cultivos (yemas, plántulas o meristemos) en condiciones físicas (factores ambientales) y químicas (composición del medio), que permita extender al máximo el intervalo de transferencia a los medios de cultivo frescos, sin afectar su viabilidad y reduciendo la posibilidad de pérdida por manipulación y contaminación. La reducción en la tasa de crecimiento se logra disminuyendo en unos grados la temperatura del ambiente o intensidad de la luz dependiendo la temperatura de almacenamiento y la especie (Abdelnour, A, 1999, pág. 870).

Almacenamiento largo plazo: **“**consiste en suprimir totalmente el crecimiento y metabolismo del material almacenándolo a ultras bajas temperaturas con nitrógeno líquido por tiempo indefinido” (Abdelnour, A, 1994).

1.3 Crioconservación

Es una técnica que consiste en llevar material biológico desde su temperatura fisiológicamente normal hasta ultra bajas temperaturas (-196 °C) y de nuevo a su temperatura normal sin causar daño (Abdelnour, A, 1994, pág. 38), para alcanzar condiciones de ausencia de agua en estado líquido, baja cinética molecular y una difusión extremadamente lenta y así lograr que las reacciones químicas se paralicen (Pritchard, Cryopreservation of seeds, 1995).

Permite el almacenamiento durante períodos prolongados (mayores a un año) utilizando nitrógeno líquido, en algunas ocasiones se puede combinar con otros gases inertes (como helio o argón) (García-Aguila, De Feria, & Acosta, 2007). El nitrógeno líquido se utiliza porque detiene todas las actividades metabólicas, inmediatamente al hacer contacto con el explante (Withers, Wheelans, & Williams) (Engelmann, 1991) y, a la vez, permite que los tejidos conserven la viabilidad sin que ocurran alteraciones fisiológicas (Benson, Johnston, Muthusamy, & Harding , 2006). El éxito de la crioconservación depende del acondicionamiento del material para que resista tanto al congelamiento como el descongelamiento (Villalobos & Engelman, 1995).

1.3.1 Ventajas de la crioconservación

El material vegetal crioconservado se puede preservar sin variabilidad genética en espacios reducidos, en condiciones seguras (Hirai & Sakai, 2000), ya que una vez almacenado no se manipula, se encuentra protegido de agentes contaminantes y en caso de necesitar una muestra específica esta puede ser descongelada y las plantas recuperadas y multiplicadas en corto tiempo. El mantenimiento requerido es mínimo solo el llenado del tanque para que permanezca a un nivel aceptable de seguridad (Abdelnour, A, 1999).

1.3.2 Métodos de crioconservación

Actualmente existen dos tipos de metodologías para llevar a cabo la crioconservación: tradicional y vitrificación.

1.3.2.1 Método tradicional

Involucra un pretratamiento con un crioprotector, que después es sometido a una congelación lenta, empleando un aparato de enfriamiento programado y su posterior inmersión en nitrógeno líquido (Engelmann, F, 2000). Se utilizan sustancias crioprotectoras para proteger al material vegetal de los daños del congelamiento y descongelamiento, los más utilizadas son DMSO (5%-15%) y glicerol; también se emplean otras sustancias como azúcares, azúcares-alcoholes, aminoácidos y polímeros de alto peso molecular (Roca & Mogrinski, 1991).

Etapas de crioconservación:

Según Abdelnour (1994), las etapas de crioconservación son cinco:

a) Selección y aislamiento del material a conservar: se debe considerar la estabilidad intrínseca.
b) Pretratamiento y crioprotección: se induce cierto grado de deshidratación en las célula y tejidos para evitar daños causados por la formación de cristales de hielo, puede mantenerse desde unos pocos minutos hasta varios días en presencia de sustancias crioprotectoras.
c) Congelamiento: puede ser ultra rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido o lento siendo necesario un congelador programable para obtener resultados precisos y reproductibles.
d) Descongelamiento: se lo realiza por inmersión de los crioviales que contienen las muestras en baño de agua a 40 °C.
e) Recuperación: consiste en el lavado o dilución de los crioprotectores y el cultivo de las muestras en condiciones óptimas para asegurar su crecimiento (pág 38).

1.3.2.1.1 Agentes crioprotectores

Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso implica que se alcanzará una concentración de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor (Ávila-Portillo, L; León, M; Acosta, L; Gómez, C; Delgado, L; Gómez, C; Lozano, J; Reguero, M, 2006).

1.3.2.2.1 Tipos de agentes crioprotectores

Crioprotectores penetrantes:

Incrementan el volumen de la solución intracelular, evita una excesiva concentración de electrólitos tóxicos en la fase no congelable o aumentan la permeabilidad de la membrana citoplasmática contribuyendo a la deshidratación. Adicionalmente, a los crioprotectores penetrantes se les atribuye la acción de disminuir el punto de fusión de la solución intracelular, factor decisivo para evitar la formación de cristales de hielo en el medio intracelular (Mazur, 1984).
Entre los crioprotectores penetrantes se pueden citar el glicerol, propanediol y el más utilizado el DMSO.

El DMSO (dimetilsulfóxido) es fácilmente miscible y rápidamente absorbido por las células, no es tóxico a bajas concentraciones y se elimina fácilmente en el lavado (Jijón, 2007). "Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular" (García, 1984).

Crioprotectores no penetrantes

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociadas a los agentes penetrantes. Los crioprotectores más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros, que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad del agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (Ávila-Portillo, L; León, M; Acosta, L; Gómez, C; Delgado, L; Gómez, C; Lozano, J; Reguero, M, 2006).

1.3.2.2 Método basado en vitrificación

"Permite la transición del agua a una fase amorfa o vítrea, en la que se impide la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación" (Villa & Sánchez, 2003), agregándole crioprotectores para luego deshidratar los tejidos con soluciones vitrificantes, la cual contiene altos niveles de sacarosa y otros crioprotectores en un medio de cultivo, que suele ser Murashige y Skoog (Pérez, 2006).

Etapas de vitrificación según Pérez (2006).

a) Tratamiento del material vegetal con crioprotectores: es similar al método tradicional se somete a pretratamientos con manitol, sorbitol, glicerol entre otros crioprotectores.
b) Deshidratación de los tejidos con soluciones vitrificantes: se colocan las muestras en la solución de vitrificación, la cual contiene altos niveles de sacarosa y otros crioprotectores en un medio de cultivo que suele ser MS.
c) Rápido enfriamiento por inmersión en nitrógeno líquido.

1.4 Métodos de congelamiento

1.4.1 Congelamiento rápido

El material genético se coloca directamente en nitrógeno líquido (NL). La velocidad de disminución de la temperatura puede ser de hasta 1000 °C /min. Uno de los riesgos de este procedimiento, es la formación de cristales intracelulares de hielo que pueden dañar el material vegetal. Este efecto se evita empleando sustancias crioprotectoras adecuadas, procurando que el congelamiento se produzca tan rápidamente como sea posible a mayor velocidad de congelamiento menor tamaño de los cristales de hielo. También es conveniente emplear un volumen pequeño de material vegetal cuyo contenido de agua sea bajo (Nitzsche, 1983).

1.4.2 Congelamiento lento

El material vegetal se congela de modo gradual. La disminución de la temperatura oscila entre 0,1 y 3 °C/ min. “Este procedimiento permite una deshidratación celular protectora, de manera que los cristales de hielo se forman extracelularmente”. Generalmente el material se congela lentamente, a una velocidad adecuada, hasta que alcance la temperatura determinada usualmente -40 °C, punto en el que la mayor parte del agua ha sido congelada extracelularmente en nitrógeno líquido. También puede mantenerse durante un periodo de tiempo a esa temperatura antes de su transferencia al nitrógeno líquido. El congelamiento lento ha sido empleado en crioconservación de materiales vegetales en numerosas especies (Roca & Mogrinski, 1991).

1.5 Nitrógeno líquido

“El nitrógeno líquido (N_2) es un gas licuado, incoloro, inodoro, no combustible, no tóxico, es un líquido no agresivo con una temperatura de ebullición de -196°C, a esta temperatura es muy útil en una amplia gama de aplicaciones especialmente como refrigerante” (Palma, 2007).

“Se usa en el ámbito sanitario como elemento de criopreservacion biológica y con fines terapéuticos, los principales peligros que presenta el nitrógeno líquido son: quemaduras frías, congelación, hipotermia, deficiencia de oxígeno en el aire, asfixia, daños a equipos, presurización y explosión” (Gonzalez, Gómez, García, & Chaves, 2007, pág. 37).

1.6 Viabilidad de semillas de orquídeas

La longevidad de las semillas de orquídeas depende de las condiciones de almacenamiento de las mismas. Muchas pierden rápidamente su viabilidad si se mantienen a temperatura ambiente (20-24°C). La viabilidad puede mantenerse por más tiempo si las semillas se guardan con un desecante apropiado (cloruro de calcio o silicagel) y a bajas temperaturas (0-10°C) (Arditti, J, 1979).

Los test de viabilidad permiten comprobar las zonas de tejido que han muerto y cuales han sobrevivido al frío, se puede llevar a cabo la evaluación de forma visual, realizando el re-cultivo y determinando la capacidad de regeneración utilizando TTC (cloruro de 2, 3,5- trifeniltetrazolio) que colorea el tejido que ha sobrevivido o midiendo la conductividad eléctrica, que permite estimar el daño producido en las membranas celulares (Scocchi & Rey, 2001).

CAPÍTULO 2
MARCO METODOLÓGICO

2.1 Materiales

Semillas de orquídeas, espátula, portaobjetos, cubreobjetos, pinzas, criovales de 2ml, tubos eppendorf de 2ml, vacutainer, tubos de plástico de 50ml, vasos de precipitación, tubos de ensayo, cajas petri, matraz erlenmeyer, mechero, jeringuillas de 5 y 10 ml, frascos Boeco de 500 y 1000 ml, papel rollopack, servilletas esterilizadas, pinzas, gradillas, papel aluminio, guantes, gafas de seguridad, fósforos.

2.2 Reactivos

Silica gel, sacarosa 10%, agua destilada, alcohol 96%, alcohol 70%, nitrógeno líquido, tetrazolio 1%, DMSO (Dimetilsulfóxido) 1M, glicerol 1M, sucrosa 1M, Buffer 6,5, medio Comercial MS (Murashige y Skoog), agar, hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio al 3%, carbón activado, tween 20, isopropanol, agua oxigenada 10%.

2.3 Equipos

Desecador, refrigerador, balanza analítica, agitador magnético, microscopio con cámara incorporada marca Micros®, potenciómetro, autoclave, cámara de crecimiento, microondas, estufa, cámara de flujo laminar, desecador, micropipeta, tanque de nitrógeno líquido y congelador a -80 °C.

2.4 Ubicación

Las semillas de orquídeas se encuentran almacenadas en el Banco de germoplasma de Orquídeas del Ecuador Fase I (sección Cotacachi-Cayapas) ejecutado por el Doctor Marco Fernando Cerna Cevallos docente de la Universidad Politécnica Salesiana con autorización de investigación científica N° 08-2013-0869-IC_FAU-FLO-DAPI-UNO-MAE (Anexo 4).

El trabajo experimental se desarrolló en la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito, Campus El Girón, en los laboratorios del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) ubicado en: 0º12'28.34" S 78 º 29'15.09" W.
El cuarto de crecimiento se encontró a 18 °C con un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad con 50%-60% de humedad relativa.

2.5 FASE 1: Descripción morfológica de semillas de cuatro géneros de orquídeas.

2.5.1 Procedimiento

Las semillas de los cuatro géneros de orquídeas fueron sometidas a un pretratamiento, en un desecador con silica gel por un período de 15 días con el fin de reducir la humedad para su mejor conservación.

Para determinar la morfología de las semillas de orquídeas se procedió a observar 20 semillas aleatoriamente bajo el microscopio, la muestra se colocó en un portaobjetos con ayuda de un asa.

Se realizaron las observaciones de los cuatro géneros con el lente 40X, identificando el color de las semillas con la referencia de una escala colorimétrica (Anexo 1) y la forma con la ayuda de Clifford y Smith (1969) (Anexo 2) y Arditti, J (1979) (Anexo 3), para la longitud y diámetro mayor se utilizó el programa "Measure" preinstalado en el microscopio. La medición se realizó en milímetros y se tomaron fotos como soporte gráfico.

En la balanza analítica se pesó 1 mg de semillas sobre un portaobjetos, luego se procedió al conteo de las semillas bajo el microscopio, marca Micros® modelo CROCUS II, con la finalidad de determinar cuántas semillas de orquídeas hay en un miligramo.

Diseño Experimental

a) Tipo del diseño
Se utilizó el Diseño Completamente al Azar.

b) Características del experimento
Unidad experimental: una semilla por género de orquídeas.
Géneros experimentales: cuatro géneros.
Número de repeticiones por tratamiento: veinte repeticiones.

c) Análisis Estadístico

Se evaluaron los resultados a través de un análisis de varianza. Las comparaciones múltiples de medias se analizaron con la prueba de Duncan. Para la significancia se consideró $\alpha = 0,05$.

Variable independiente: cuatro géneros de semillas de orquídeas.

Variable dependiente: morfología de las semillas.

Indicadores:

Color: se determinó por observación bajo el microscopio, se otorgaron valores que fueron desde: amarilla, verde, verde claro, verde grisáceo, verde oscuro y verde amarillento, a cada color se le otorgo un código constituido por letras y números según la escala colorimétrica y un equivalente numérico (Anexo 1) (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de color en semillas de cuatro géneros de orquídeas.

Color	Equivalente Numérico	Código del Color
Amarillo	2	2A
Amarillo Verdoso	8	8AV
Verde	1	1V
Amarillo verdoso	3	3AV

Nota: Análisis, por E. Cueva & M.Moya, 2014

Forma: Se observó bajo el microscopio y se identificó la forma comparando con los gráficos descritos por Clifford y Smith (Anexo 2) y Arditti.J, 1979 (Anexo 3), los cuales muestran la diversidad de formas de las semillas de orquídeas.

Longitud y Diámetro de la semilla: se midió en mm desde el ápice hasta la base de la semilla y, el diámetro mayor de la misma (Fig. 8) con la ayuda del programa "Measure" pre instalado en el microscopio. Se eligió el lente de acuerdo al tamaño de las semillas.

Medición de longitud y diámetro de las semillas de los cuatro géneros bajo el microscopio.

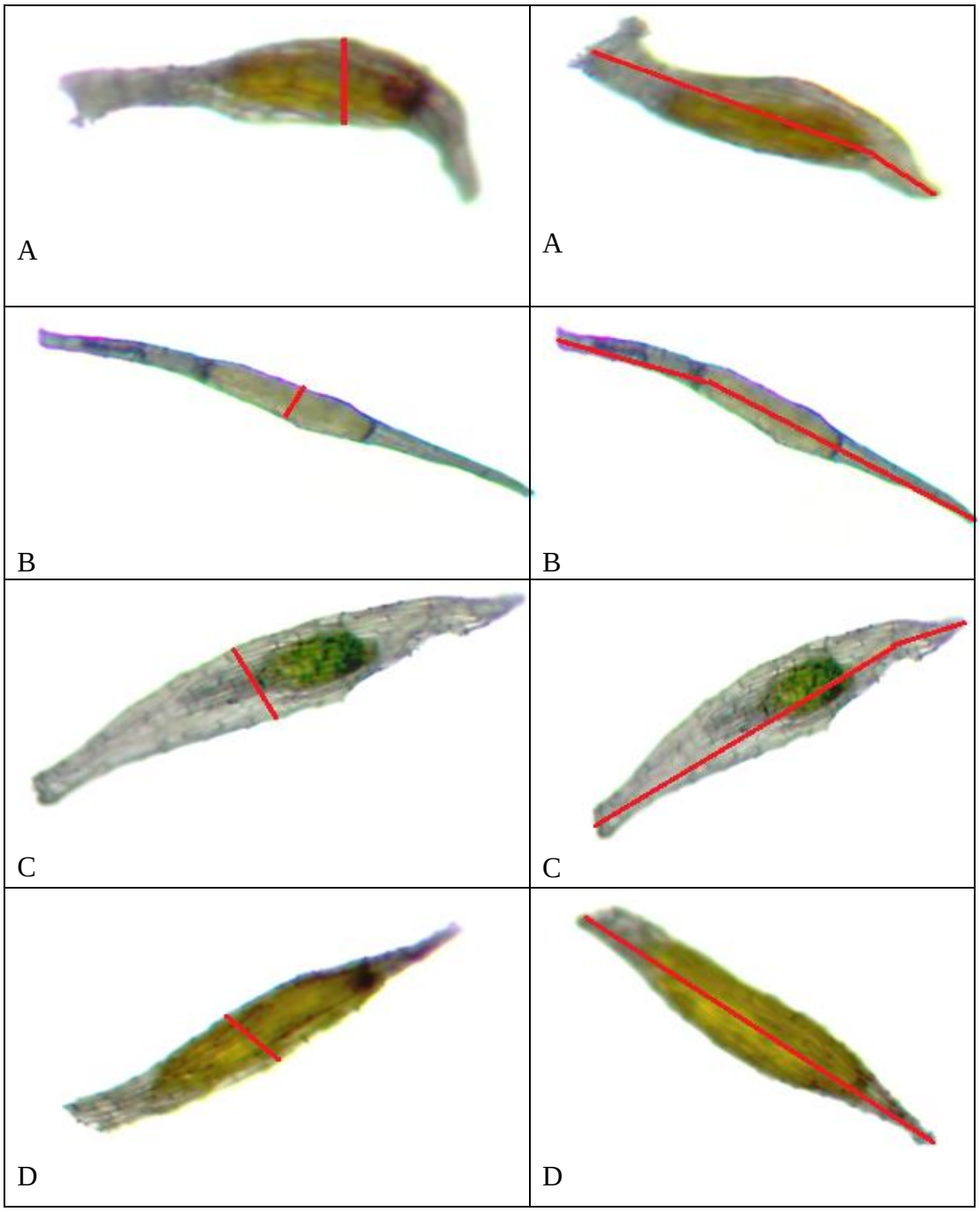


Figura 8. A género *Elleanthus, B* género *Odontoglossum*, C género *Epidendrum*, D género *Oncidium*, por

E. Cueva & M. Moya, 2014

Número de semillas de orquídeas en un miligramo: se pesó en un portaobjetos un miligramo de semillas de orquídeas, posteriormente se procedió al conteo de las semillas con la ayuda del microscopio.

Los indicadores descritos fueron evaluados antes del proceso de crioconservación.

2.6 FASE 2: Determinación de la viabilidad de semillas de orquídeas sometidas a procesos de crioconservación.

2.6.1 Procedimiento

2.6.2 Prueba de Tetrazolio

Para el desarrollo de la prueba de tetrazolio [2, 3,5- cloruro trifenil tetrazolio (CTT)] se preparó una solución buffer 6,5. Según la metodología de (INSTA, 2006), se disolvió 3,63g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) más 7,13g de fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4) en agua destilada con un pH entre 6 a 8, la solución de tetrazolio al 1% se preparó con 100ml de la solución buffer más 1g de sal de tetrazolio con pH de 5,8.

Se procedió a pesar 1mg de semillas en un tubo eppendorf, embebiéndolas en agua destilada por 24 horas a temperatura ambiente como pre acondicionamiento, con ayuda de una jeringuilla se eliminó el agua y se añadió 1,5 ml de sacarosa al 10% por 24 horas a temperatura ambiente, el líquido fue eliminado, se añadió 2ml de solución de tetrazolio. Las semillas fueron incubadas en baño María a 30ºC por 24 horas, transcurrido el tiempo se eliminó el tetrazolio y se agregó agua destilada.

Las semillas de los géneros *Epidendrum* y *Oncidium* fueron incubadas en baño María por 48 horas para que se tiñan de mejor manera.

La variable evaluada en esta fase fue la viabilidad de la semilla, para ello se preparó una placa con dos gotas de semillas en un portaobjetos, cubierta con un cubre objetos, se observó en el microscopio y se determinó su viabilidad realizando un conteo de las semillas por división de cuadrantes de acuerdo a su tinción e intensidad de coloración. Si la semilla presentó color rojo-rosa, se clasificó como viable, si no presentó color, se catalogó como no viable (Fig. 9), indicativo de la muerte o poca viabilidad de las células.

Metodología de evaluación de semillas con tetrazolio

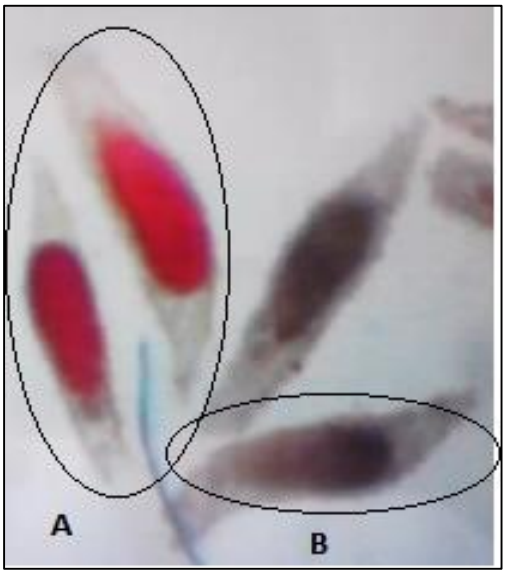


Figura 9. a)Semilla teñida con tetrazolio, b) Semilla sin teñir con tetrazolio, por E. Cueva & Moya, 2014

2.6.2 Prueba de Presencia de embrión

Sobre un portaobjetos se colocó 0,5 mg de semillas de orquídeas sumergidas en agua destilada, se observó bajo el microscopio y determinó su viabilidad realizando un conteo de acuerdo a la presencia o ausencia de embrión. Si la semilla presentó embrión, se clasificó como viable, si no presentó embrión, se catalogó como no viable (Fig. 10), se consideró el número de semillas con embrión sobre el total de semillas evaluadas por cien (Cerna, 2014).

Metodología de evaluación con presencia de embrión

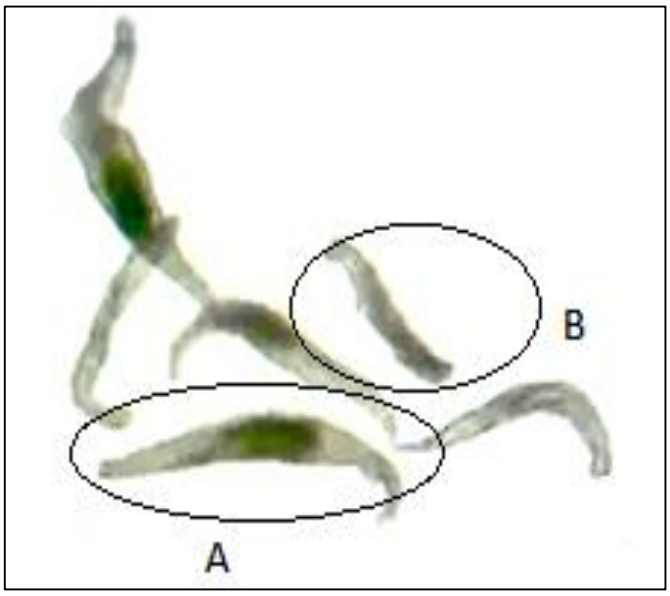


Figura 10. a) Semilla teñida con presencia de embrión, b) Semilla sin embrión, por E. Cueva & Moya, 2014

Diseño Experimental

a) Tipo del diseño

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar.

b) Características del experimento

Unidad experimental: 0,5 mg de semillas de orquídeas en un tubo eppendorf de 2ml.

Géneros experimentales: cuatro géneros.

Número de repeticiones por tratamiento: tres repeticiones.

c) Análisis Estadístico

Método de análisis:

Se evaluaron los resultados a través de un análisis de varianza confrontando las respuestas de las semillas de orquídeas en relación al tetrazolio (semillas viables versus no viables). Las comparaciones múltiples de medias se analizaron con la prueba de Duncan. Para la significancia se consideró $\alpha = 0,05$.

Variable independiente: cuatro géneros de semillas de orquídeas.

Variable dependiente: viabilidad por tetrazolio y presencia/ausencia de embrión.

Indicadores:

Porcentaje de viabilidad: se obtuvo mediante la división del número de semillas teñidas sobre el total de las semillas evaluadas por cien.

Porcentaje de semillas con presencia de embrión: se obtuvo mediante la división del número de semillas con embrión sobre el total de semillas evaluadas por cien.

Las pruebas mencionadas se realizaron a las semillas de los cuatro géneros antes y después del proceso de crioconservación.

2.7 FASE 3: Determinación de un protocolo de almacenamiento de semillas de orquídeas utilizando nitrógeno líquido.

2.7.1 Preparación de medio de cultivo

El medio utilizado para la evaluación *in vitro* fue:

M&S (Murashige y Skoog): En un vaso de precipitación con 600ml de agua destilada, se disolvieron 34,4 g de medio comercial homogenizado con agitador magnético, una vez disuelto el contenido se aforó con agua destilada hasta un litro, se ajustó el pH a 5,8 utilizando hidróxido de sodio en caso de acidez o ácido clorhídrico por alcalinidad, luego se adicionó 8g de agar, con la ayuda del microondas se homogenizó la mezcla y agregó 1g de carbón activado. El medio fue dispensado en tubos de ensayo con aproximadamente 10ml, se cubrieron con tapas de papel aluminio y rollo pack; finalmente el medio se autoclavó a 121 °C durante 40 minutos.

2.7.2 Protocolo de desinfección de semillas

Para la desinfección se pesó 20 mg de semilla de orquídea por cada género, en cámara de flujo laminar las semillas fueron colocadas en una jeringuilla de 50ml, ubicando en la punta de la misma algodón como filtro. El protocolo de desinfección se llevó a cabo

con una solución de cloro al 3% más tween 20 (agente tenso-activo), se agitó constantemente por 3 minutos, se dejó sedimentar las semillas, pasado el tiempo de contacto se desechó la primera solución, posteriormente se realizó el mismo procedimiento con alcohol al 70%, seguidamente se realizó el enjuague de las semillas con agua destilada estéril por tres ocasiones con una duración de 3 minutos por enjuague para proceder al proceso de crioconservación (Anexo 5).

2.7.3 Protocolo de crioconservación

Para la crioconservación, se colocaron en los criovales 0,5 mg de semillas, posteriormente fueron refrigerados a -30 °C durante una hora. Trascurrido este tiempo, se dejó a temperatura ambiente, hasta estabilizarlos.

Una vez climatizados los criovales, se colocaron los crioprotectores según el tratamiento establecido, como se muestra en el Tabla 2.

Tabla 2. Interacción entre crioconservante, dos técnicas de enfriamiento y tres crioprotectores por género.

CRIOCONSERVANTE

Nitrógeno Líquido

Técnica	**Crioprotector**			
Rápida	Tratamiento	DMSO 1M (ml)	Sucrosa 1M(ml)	Glicerol 1M (ml)
	C1	1,5	-	-
	C2	0,75	0,75	-
	C3	0,75	-	0,75
	C4	0,5	0,5	0,5
Escalonada	Tratamiento	DMSO 1M (ml)	Sucrosa 1M(ml)	Glicerol 1M (ml)
	C1	1,5	-	-
	C2	0,75	0,75	-
	C3	0,75	-	0,75
	C4	0,5	0,5	0,5

Nota: Crioconservación, por E. Cueva & B. Moya, 2014.

En la técnica rápida los criovales son llevados directamente a nitrógeno líquido y en escalonada fueron colocados en isopropanol por 24 horas a – 80 °C, luego se trasladaron al tanque de nitrógeno líquido donde permanecieron por 3 mes.

|

2.7.4 Descongelación

Posterior al tiempo de almacenamiento, se procedió a la descongelación, retirando los crioviales del tanque de nitrógeno líquido y transfiriéndolos a baño María a 40°C durante 2-3 min hasta observar que los cristales de hielo hayan desaparecido.

2.7.5 Lavado de crioprotectores

En la cámara de flujo laminar se procedió a retirar la solución crioprotectora, se utilizó una micropipeta automática para eliminar el líquido de los criovales, luego se realizó el protocolo de desinfección antes mencionado y finalmente se colocó las semillas en agua estéril.

2.7.6 Protocolo de cultivo *in vitro*

En cámara de flujo laminar desinfectada con alcohol al 70%, sablón y 15 minutos con luz UV se procedió al protocolo de siembra, se utilizaron las semillas previamente desinfectadas, fueron tomadas con la ayuda de una micropipeta para ser sembrada en los tubos de ensayo con el medio semisólido MS comercial más carbón activado. Se colocaron 0,25 µl de semillas y agua oxigenada para evitar contaminación. Finalmente se etiquetó con el tipo de tratamiento y repetición.

2.7.7 Incubación

Los tubos de ensayo sembrados se incubaron durante 3 meses sobre anaqueles a 40 centímetros de distancia de la fuente luminosa, bajo tubos fluorescentes de 20 watts, en el cuarto de crecimiento, a 18 °C con un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad. Al final de este periodo se evaluó el estado de germinación.

Diseño Experimental

a) Tipo del diseño

Se utilizó el Diseño de Bloques Completamente al Azar.

b) Características del experimento

Crioconservación

Unidad experimental: 1 mg de semillas de un género de orquídea, embebido en una combinación de crioprotectores contenidos en criotubos de 2 ml, sumergidas en nitrógeno líquido.

Géneros experimentales: cuatro géneros.

Número de repeticiones por tratamiento: cinco repeticiones.

Cultivo *in vitro*

Unidad experimental: 0,25 µl de la suspensión de semillas sembradas en un tubo de ensayo con 10ml de medio MS más carbón activado.

Géneros experimentales: cuatro géneros.

Número de repeticiones por tratamiento: diez repeticiones.

c) Análisis Estadístico

Método de análisis:

Se evaluaron los resultados a través de un análisis de varianza confrontando las respuestas de las semillas de orquídeas en relación a los tres crioprotectores experimentados y las dos técnicas de enfriamiento. Las comparaciones múltiples de medias se analizaron con la prueba de Duncan. Para la significancia se consideró $\alpha = 0,05$.

Variable independiente: semillas de cuatro géneros de orquídeas, tres criopreservantes (DMSO 1M, Sucrosa 1M, Glicerol 1M) y dos técnicas de enfriamiento con nitrógeno líquido (rápido/escalonado).

Variable dependiente: viabilidad.

Indicadores:

Evaluación *ex vitro*

Color: se determinó por observación bajo el microscopio, se otorgaron valores que fueron desde: amarilla, verde, verde claro, verde grisáceo, verde oscuro y verde amarillento, a cada color se le otorgo un código constituido por letras y números según la escala colorimétrica y un equivalente numérico (Anexo 1) (Cuadro 1).

Forma: se observó bajo el microscopio y se identificó el número de la forma, comparando con los gráficos descritos por Clifford y Smith (Anexo 2) y Arditti.J, 1979 (Anexo 3), los cuales muestran la diversidad de formas de las semillas de orquídeas.

Longitud y Diámetro de la semilla: se midió en mm desde el ápice hasta la base de la semilla y, el diámetro mayor de la testa (Fig. 8) con la ayuda del programa "Measure" pre instalado en el microscopio, se eligió el lente de acuerdo al tamaño de las semillas.

Porcentaje de viabilidad por tetrazolio y presencia de embrión: se realizó el test de tetrazolio y presencia de embrión después de los tres meses de haber introducido las semillas de orquídeas en crioconservación.

Evaluación *in vitro*

Porcentaje de germinación de semillas crioconservadas: se tomaron 0,25 µl de la suspensión de semillas de cada código provenientes de las pruebas de crioconservación y se cultivó en medio Murashige y Skoog + carbón activado con 10 repeticiones, posteriormente se evaluó a los tres meses la respuesta de germinación.

Porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica: A los 90 días de haber sembrado las semillas de orquídeas, se contó los tubos de ensayo contaminados, tomando como indicador la presencia o ausencia de unidades formadoras de colonias tanto bacterianas como fúngicas.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS-DISCUSIÓN

3.1 FASE 1: Describir morfológicamente las semillas de cuatro géneros de orquídeas.

Las comparaciones múltiples de medias se analizaron con la prueba de Duncan. Para la significancia se consideró α = 0,05. Se realizó un análisis de los valores obtenidos para las variables longitud de semillas y número de semillas por un miligramo (Tabla 3), se encontró que existió diferencia significativa para género (p=<0,0001) con un coeficiente de variación de 8,37 y 11,47 respectivamente. Mientras que el diámetro y la forma de la semilla no presentaron diferencia significativa entre géneros.
Para la variable color de semillas se encontró que existió diferencia significativa para género (p=<0,0001) con un coeficiente de variación de 17,97.

Tabla 3. Promedio (±) el error estándar de la longitud, diámetro número de semillas en un mg, forma y color de semillas de cuatro géneros de orquídeas.

Código	Género	Longitud (mm) *	Diámetro (mm)	Semillas/mg *	Forma	Color
1	*Elleanthus*	0,28±0,01 a	0,06±0,01 a	982,5± 18,72 a	6±0,14 b	1,8±0,14 b
2	*Odontoglossum*	0,6±0,01 d	0,08±0,01a	739,7± 18,72 b	1±0,14 a	8±0,14 d
3	*Epidendrum*	0,56±0,01 c	0,07±0,01a	702,75± 18,72b	1±0,14 a	1±0,14 a
4	*Oncidium*	0,39±0,01 b	0,07±0,01a	495,1± 18,72b	1±0,14 a	3,25±0,14 c

Nota: *****Diferencia significativa, Diferentes letras presentan diferencia significativa, por E. Cueva & M. Moya, 2014.

3.1.1 Género *Elleanthus*

Para el género *Elleanthus* la semilla presentó un promedio de longitud de 0,28mm en un rango que va desde 0,231 a 0,362mm, un promedio de diámetro de 0,06 con un rango entre 0,054 a 0,079mm. El promedio de peso es el más alto de los cuatros géneros con 982,5 semillas por miligramo, lo que indica que una semilla tiene un peso aproximado de 1,017 *u*g.

La forma de la semilla es ensanchada en el centro con un extremo puntiagudo y el otro extremo cuadrado (Fig. 11), el cual fue comparado con el gráfico de formas de semillas según Arditti, J (1979) (Anexo 3), siendo la forma predominante la número 6. La variable de color vista bajo el microscopio obtuvo un promedio de color de 1,8 lo que significa que su color es amarillo (N°2).

Semillas del género *Elleanthus*

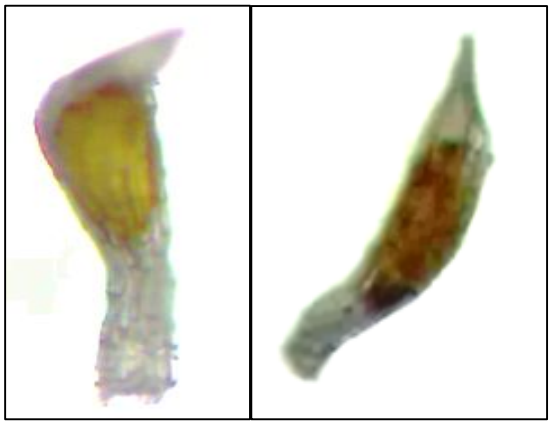


Figura 11. Semilla, por E. Cueva & M.Moya, 2014

3.1.2 Género *Odontoglossum*

En relación a la variable de longitud presentó un promedio de 0,6mm en un rango desde 0,536 a 0,702mm y un promedio de diámetro de 0,08mm en un rango desde 0,075 a 0,124mm. En miligramo se cuantificaron en promedio 739,7 semillas de orquídeas, lo que indica que una semilla tiene un peso promedio de 1,35 *u*g.

Su forma es ensanchada en el centro con sus dos extremos puntiagudos (Fig. 12) por lo que se colocó en la forma 1, según los autores Clifford y Smith (Anexo 2).

La variable de color presentó un promedio de color 8 que significa que la semillas son de color amarillo verdoso (N°8).

Semilla del género *Odontoglossum*

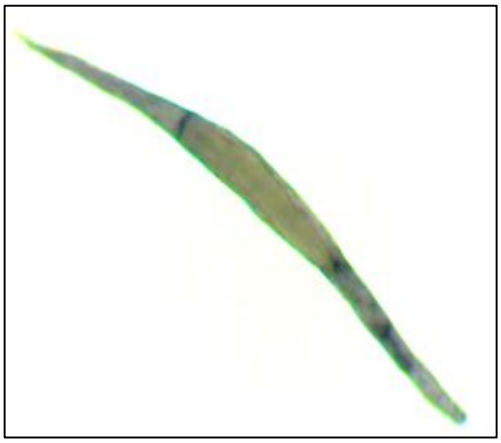


Figura 12. Semilla, por E. Cueva & M.Moya, 2014

3.1.3 Género *Epidendrum*

Con un promedio de la variable de longitud de 0,56mm en un rango entre 0,421 a 0,670mm y un promedio de diámetro de 0,07mm en un rango de 0,046 a 0,095mm Presentó un promedio de 702,75 semillas de orquídeas por cada miligramo, lo que indica que una semilla tiene un peso aproximado de 1,42 *u*g.

Su forma fue comparada según Clifford y Smith (Anexo 2) dando como resultado predominancia de la forma número 1, la semilla es elíptica con una terminación puntiaguda y la otra cuadrada (Fig. 13).

La variable de color presentó un promedio de 1 que lo que significa que su color es verde (N°1).

Semillas del género *Epidendrum*

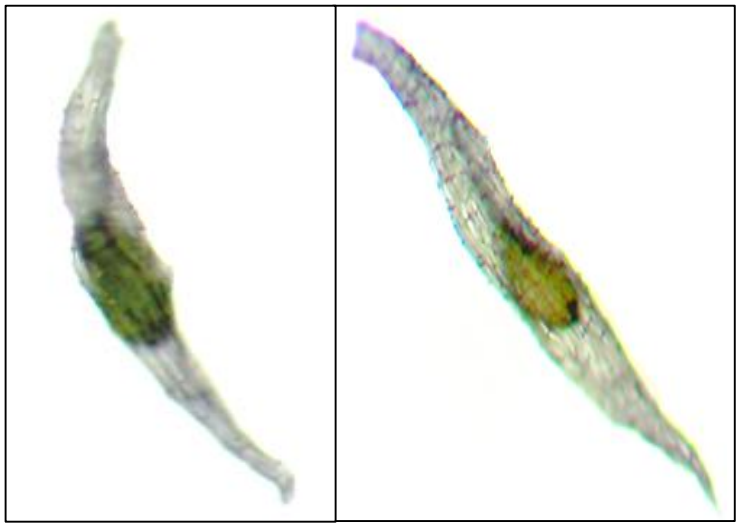


Figura 13. Semilla, por E. Cueva & M.Moya, 2014

3.1.4 Género *Oncidium*

Para el género *Oncidium* se encontró un promedio de longitud de 0,39mm en un rango entre 0,312 a 0,435mm y un promedio de diámetro de 0,07 en un rango entre 0,052 a 0,078mm. El promedio de peso es el más bajo de los cuatros géneros con 495,1 semillas de orquídeas por miligramo, lo que indica que una semilla tiene un peso promedio de 2,019 *u*g.

La forma de la semilla es ensanchada en el centro tiene una terminación puntiaguda y la otra cuadrada (Fig. 14), el cual fue comparado con Clifford y Smith (Anexo 2), siendo la forma predominante la número 1.

El promedio de la variable de color es 3,25 que significa que la semillas son de color amarillo verdoso (N°3).

Semillas del género *Oncidium*

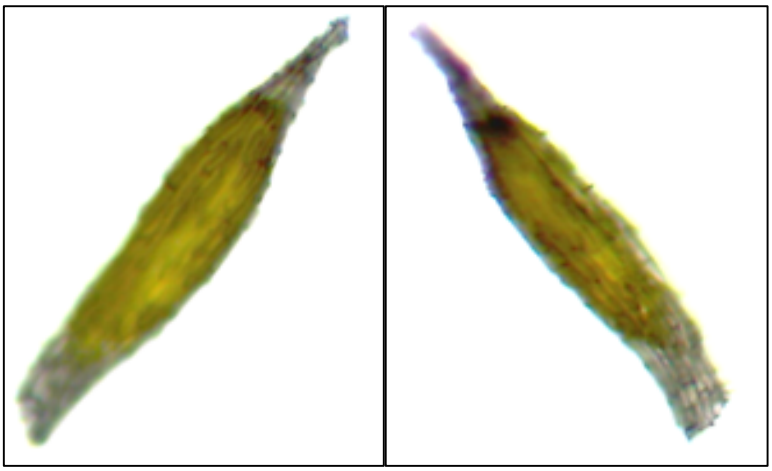


Figura 14. Semilla, por E. Cueva & M.Moya, 2014

3.2 FASE 2: Determinación de la viabilidad de semillas de orquídeas sometidas a procesos de crioconservación.

3.2.1 Prueba de Tetrazolio

La Figura 15 muestra la viabilidad de las semillas con test de tetrazolio antes y después del proceso de crioconservación. Se determinó la viabilidad de los cuatro géneros de semillas de orquídeas, mediante un conteo bajo el microscopio tomando en cuenta como parámetros el cambio de coloración de rojo – rosa que es indicadora de la presencia de células vivas del embrión, la ausencia de tinción es indicativo de la muerte o poca viabilidad de las células embrionarias (Rao, Hanson, Dullo, Ghosh, & Larinde, 2007, pág. 165).

Porcentaje de viabilidad en semillas de orquídeas en prueba de tetrazolio antes y después de crioconservación.

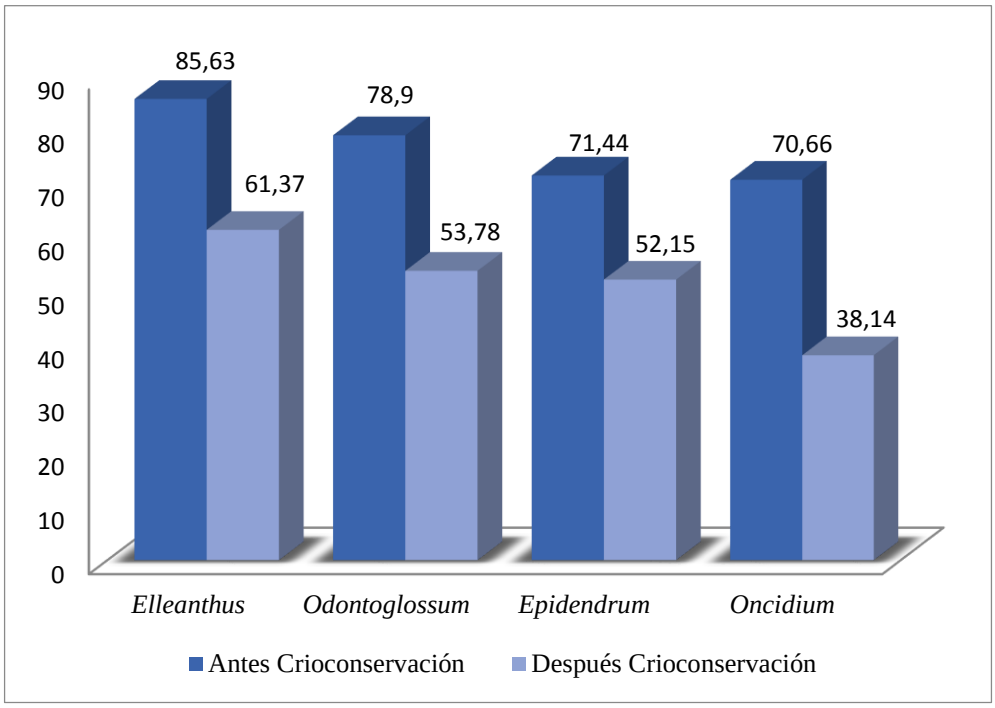


Figura 15. Test de tetrazolio en semillas de orquídeas de los cuatro géneros, por E. Cueva & M.Moya, 2014

El género *Elleanthus* presentó el porcentaje más alto de viabilidad por tetrazolio (Fig. 15) antes y después de crioconservación (Fig. 16) con el 85,63 y 61,37 % respectivamente, las semillas del género *Odontoglossum* presentaron un porcentaje de viabilidad antes de crioconservación del 78,9 % y después de crioconservación 53,78%. El porcentaje de viabilidad para el género *Epidendrum* fue 71,44%, antes de la crioconservación y 52,15% después de crioconservación. El menor porcentaje de viabilidad correspondió al género *Oncidium* con 70,66% antes de crioconservación y un 38,14% después de crioconservación (Fig. 15) (Fig. 16).

La Prueba Topográfica por Tetrazolio utiliza una solución incolora de la sal cloruro de 2, 3,5-trifenil tetrazolio como un indicador de varios procesos de reducción que ocurren en las células vivas. Luego que la solución de tetrazolio es embebida por la semilla, en las células vivas de los tejidos se lleva a cabo una reacción química de óxido-reducción en la cual participan las enzimas deshidrogenasas presentes en los

tejidos vivos. En esta reacción, los protones hidrógeno liberados en el proceso de respiración reducen a la sal de tetrazolio a formazan. El formazan es una sustancia estable, no difusible, de coloración rojiza, que permite distinguir las áreas vivas de las semillas (áreas de color rojo o rosado según la concentración empleada de la sal), de las zonas muertas (de color blanco) (Rao, Hanson, Dullo, Ghosh, & Larinde, 2007, pág. 165).

Cruz & Cardenas (2012) establecieron que el porcentaje de viabilidad para el género *Epidendrum sp.* es del 80% teniendo como resultado porcentajes similares al presente estudio. Sin embargo como muestra la (Fig. 15) (Fig. 16) los porcentajes de tetrazolio siempre fueron más bajos después de crioconservación, esto se debe a que según Sakai, Kobayashi, & Oiyama, (1990) el pretratamiento con soluciones crioprotectoras (sucrosa, glicerol y DMSO) al ser sustancias tóxicas para la célula pueden generar pérdida de viabilidad, por lo que es importante controlar el tiempo de incubación y removerlas gradualmente después de descongelar las muestras.

Positivo tetrazolio género *Elleanthus y Odontoglossum*

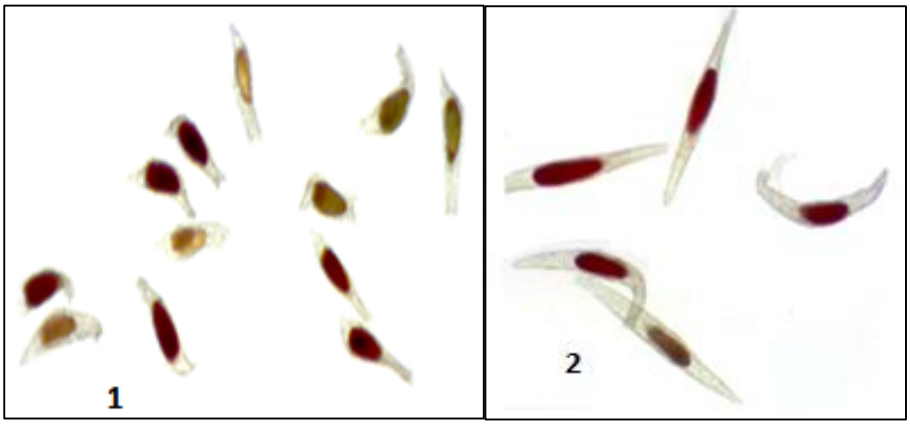


Figura 16. Género 1) *Elleanthus* 2) *Odontoglossum*, por E. Cueva & M, Moya, 2014.

3.2.2 Prueba presencia de embrión

Fotografías de semillas de los cuatro géneros de orquídeas antes y después de crioconservación

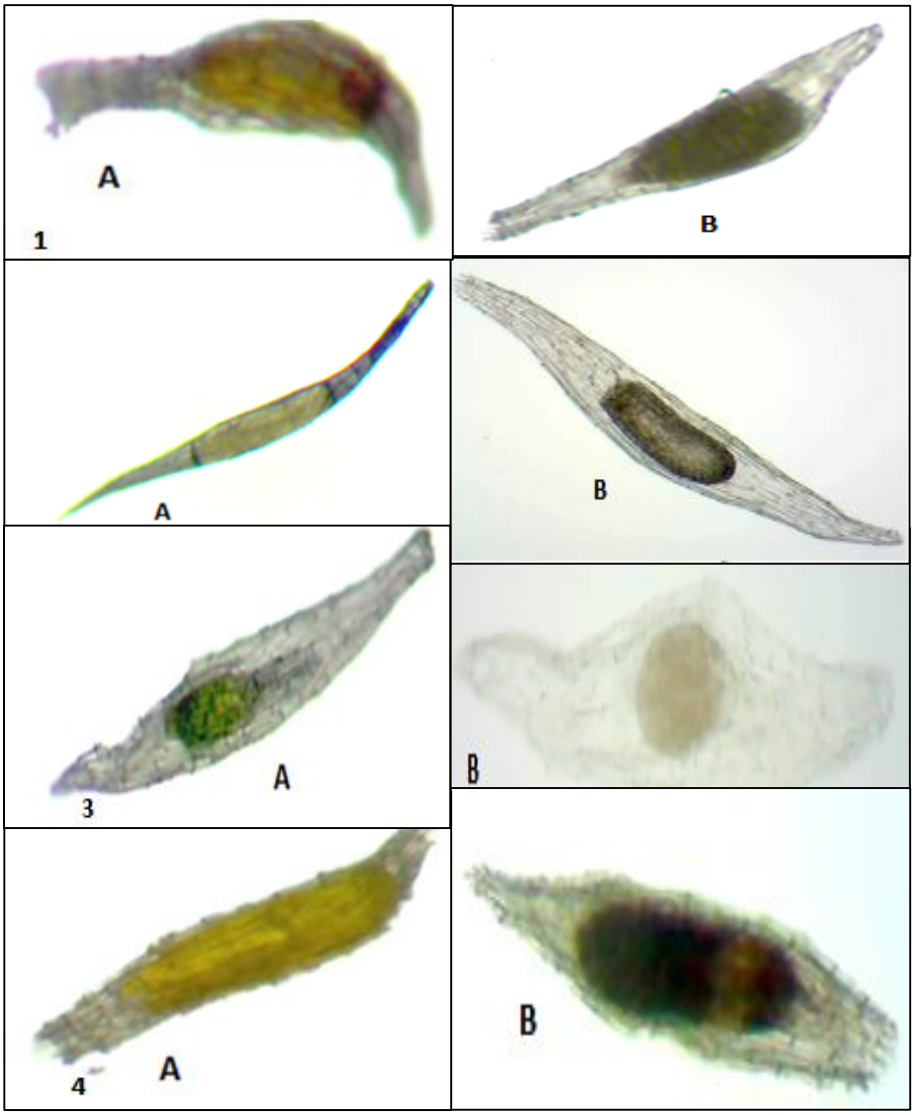


Figura 17. Género 1) *Elleanthus* 2) *Odontoglossum* 3) *Epidendrum* 4) *Oncidium* A: antes de crioconservación B: después de crioconservación, por E. Cueva & M, Moya, 2014.

En cuanto a la presencia de embrión se tomó como parámetro la verificación visual del embrión mediante la preparación de una placa con semillas sumergidas en agua destilada, se analizó mediante el uso del microscopio considerando el número total de semillas con embrión sobre el total de semillas evaluadas por cien, teniendo en cuenta que la visualización de presencia de embrión se realizó con mayor facilidad después

de crioconservación ya que la semillas se encontraba hidratadas (Fig. 17). Los resultados se detallan en las Figuras 18 y 19.

Para el porcentaje de viabilidad por test de presencia de embrión antes y después de crioconservación, se encontró que existió diferencia significativa para género (p=<0,0001) con un coeficiente de variación de 6,17 y 13,72 respectivamente (Fig. 18).

Promedio (±) el error estándar del porcentaje de viabilidad por test de presencia de embrión antes y después de crioconservación.

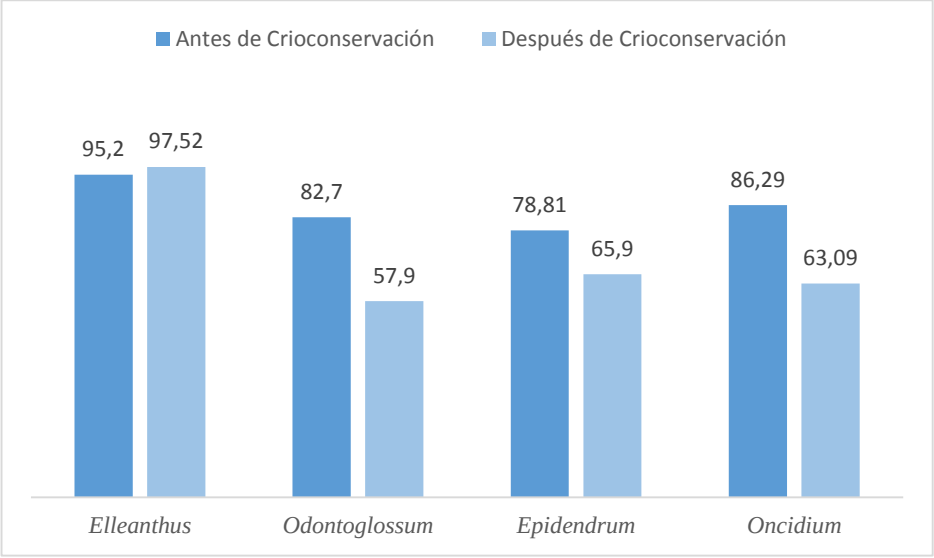


Figura 18. Test por presencia de embrión, por E. Cueva & M, Moya, 2014.

El género *Elleanthus* obtuvo el porcentaje más alto de viabilidad por presencia de embrión antes y después de crioconservación con el 95,20% y 97,52% respectivamente. El género *Odontoglossum* obtuvo un 82,70% antes de crioconservación y el promedio más bajo después de crioconservación con 57,9%, el género *Epidendrum* presentó el porcentaje más bajo antes de crioconservación con 78,81% y 65,9 % después de crioconservación y el género *Oncidium* presentó un 86,29% y 63,09% antes y después de crioconservación (Fig. 18) (Fig. 20).

Porcentaje de viabilidad en semillas de orquídeas en prueba de tetrazolio y presencia de embrión después de crioconservación.

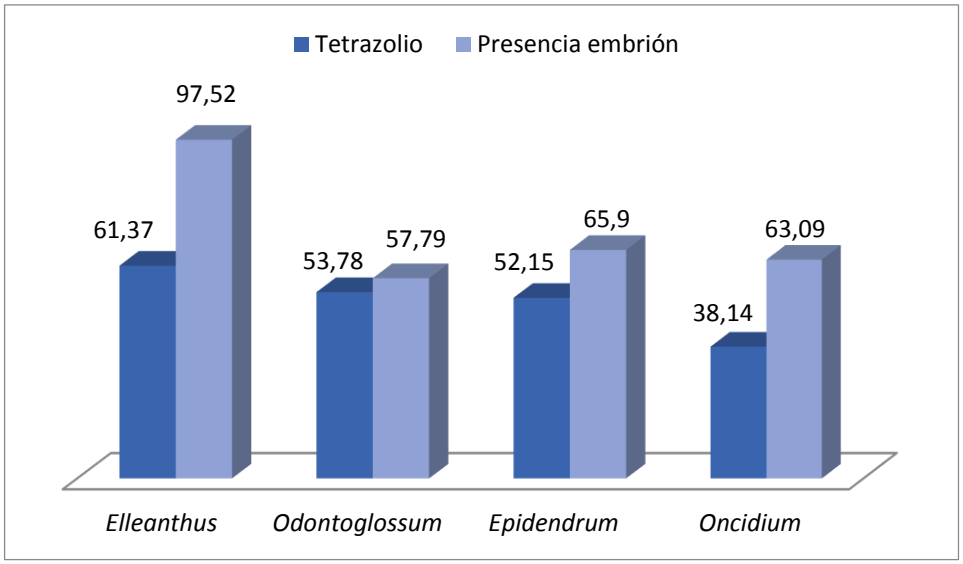


Figura 19. Test de tetrazolio y presencia de embrión, por E. Cueva & M, Moya, 2014.

El género *Elleanthus* (Fig. 20) obtuvo el porcentaje más alto de viabilidad por presencia de embrión después de crioconservación con el 97,52% y para tetrazolio 61,37% (Fig. 19). El género *Epidendrum y Oncidium* tuvieron promedios similares de viabilidad en presencia de embrión con 65,9% y 63,09% respectivamente luego de ser sometidas las semillas a crioconservación, el género *Oncidium* presentó el porcentaje más bajo en test de tetrazolio con 38,14% y el género *Odontoglossum* (Fig. 20) presentó el menor porcentaje de viabilidad por presencia de embrión con 57,79% y para tetrazolio 53,78% (Fig. 19).

Cotejando resultados entre las dos metodologías utilizadas después del proceso de crioconservación, la presencia de embrión tiene resultados más favorecedores comparado con el test de tetrazolio, sin embargo, este último es más eficaz al momento de determinar la viabilidad de las semillas de orquídeas debido a que el tetrazolio tiñe las semillas viables mostrando por su actividad bioquímica el potencial de producir una plántula normal (INSTA, 2006). La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración porque se tiñen los embriones que si presentan viabilidad (Pritchard & Prendergast, Viability testing in terrestrial orchid seed., 1990, pág. 1055), en el caso de presencia de embrión no significa que todos las semillas que presentan embrión son viables y tendrán un alto

porcentaje de germinación porque su embrión puede tener deficiencias y anormalidades de naturaleza (Salazar & Seir, 2012, pág. 78) que no se observaron con el microscopio por ende no podrá producir una plántula normal.

Además, según Howarth & Stanwood (1993), la interpretación visual de la tinción es subjetiva y requiere experiencia especialmente en semillas minúsculas como es el caso de la familia de las *Orchidaceae* que presenta semillas pequeñas, esto puede ser razón para que haya bajado la de viabilidad de los cuatro géneros después de crioconservación, como también se puede atribuir según Ferguson (1995), a que la calidad de las semillas disminuye con el transcurso del tiempo y la tasa de deterioro depende de las condiciones ambientales durante el almacenamiento y el tiempo en que estas permanecen almacenadas.

Viabilidad por presencia de embrión de los géneros *Elleanthus* y *Odontoglossum* después de crioconservación

Figura 20. Género 1) *Elleanthus* 2) *Odontoglossum*
A: Presencia de embrión B: Ausencia de embrión, por E. Cueva & M, Moya, 2014.

3.3 FASE 3 (Evaluación *ex vitro*): Determinación de un protocolo de almacenamiento de semillas de orquídeas utilizando nitrógeno líquido.

Tabla 4. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de viabilidad test de tetrazolio y presencia de embrión en relación a la técnica de enfriamiento (rápido-escalonado)

Técnica	Tetrazolio	Embrión
Escalonado	50,91±1,21	66,71±1,43
Rápido	51,56±1,23	75,47±1,41

Nota: Promedio, por E.Cueva & M. Moya, 2014

El la tabla 4 presenta el promedio general en cuanto a la viabilidad en las pruebas de tetrazolio y presencia de embrión, no presentan diferencia significativa para la técnica rápida y escalonada. Al analizar los resultados de las variables tetrazolio y presencia de embrión se observa que ambas presentan promedios similares. En test presencia de embrión la técnica de congelamiento rápida presentó una viabilidad de 75,47% en relación a la técnica escalonada con un promedio de 66,71%. Con respecto a la prueba de tetrazolio, se encontraron los siguientes resultados la técnica escalonada presentó una viabilidad del 50,91% y la técnica rápida un 51,56% de viabilidad.

Según Roca & Mogrinski (1991), quienes realizaron investigaciones en cinco variedades de yuca con métodos de enfriamiento rápido y lento, utilizando diversos tipos de crioprotectores, obteniendo como resultados favorables con la técnica de enfriamiento rápido que produjo tasas mucho mayor de supervivencia de los tejidos que en el enfriamiento lento. En función de los resultados se puede acotar que la técnica rápida presentó los mayores promedios de viabilidad tanto en tetrazolio como en presencia de embrión, esto puede darse debido a que esta técnica al ser empleada con crioprotectores, evita la formación de cristales intracelulares de hielo, que pueden ser los causantes del daño en el material vegetal (Roca & Mogrinski, 1991).

Al analizar los promedios de la viabilidad de semillas en test de tetrazolio y prueba de embrión en relación al crioprotector (Tabla 5), se observa que no existe diferencia significativa para los criprotectores, sin embargo el crioprotector 1 (DMSO 1M) en el test de tetrazolio presentó el mayor porcentaje de viabilidad con 54,98% mientras que

el de menor viabilidad fue el crioprotector 4 (0,5 ml de DMSO, Sucrosa y Glicerol 1M) con 46,86 %.

Tabla 5. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de viabilidad de semillas en las pruebas de tetrazolio y presencia de embrión en relación al crioprotector

Código	Crioprotector	Tetrazolio	Embrión
C1	1,5ml DMSO 1M	54,98±1,72	72,48±2,00
C2	0,75ml de DMSO 1M 0,75ml de Sucrosa 1M	53,52±1,72	72,49±2,00
C3	0,75ml de DMSO 1M 0,75ml de Glicerol 1M	49,58±1,72	68,3±2,00
C4	0,5ml de DMSO 1M 0,5ml de Sucrosa 1M 0,5ml de Glicerol 1M	46,86±1,72	71,09±2,06

Nota: Promedio, por E.Cueva & M. Moya, 2014.

En relación a la variable de presencia de embrión los crioprotectores 1 y 2 presentaron los mayores porcentajes de viabilidad con 72,48 y 72,49% respectivamente, el porcentaje más bajo presentó el crioprotector 3 con 68,3%.

Los mejores resultados en porcentajes de viabilidad de semillas de orquídeas tanto en el test de tetrazolio y presencia de embrión lo obtuvo el crioprotector 1 (DMSO 1M) lo que concuerda con los resultados de (Roca & Mogrinski, 1991), quienes realizaron investigaciones en cinco variedades de yuca con métodos de enfriamiento rápido y lento, utilizando diversos tipos de crioprotectores, obteniendo como resultados favorables con la técnica de enfriamiento rápido, que produjo tasas mucho mayor de supervivencia de los tejidos que en el enfriamiento lento, en cuanto al crioprotector en DMSO permitió un nivel de más alto de supervivencia en todas las variedades probadas. Los resultados mencionados pueden deberse a que el DMSO al ser un poderoso solvente tiene mayor capacidad de penetración pasando rápidamente a través de la membrana celular, lo que ejerce su efecto criopotector intracelular y extracelularmente disminuyendo el efecto adverso que produce la concentración de solutos (Shung-Chang, 1989).

Tabla 6. Promedio (±) el error estándar del análisis del porcentaje de viabilidad de semillas en las pruebas de tetrazolio y presencia de embrión en relación al crioprotector y la técnica de enfriamiento utilizada.

GÉNERO	TÉCNICA	CRIOPROTECTOR	TETRAZOLIO		EMBRIÓN VIABLE	
Elleanthus	Rápida	C1	64,77±3,86	hi	100±5,64	g
		C2	47,73±4,86	bcdefg	92,67±5,64	fg
		C3	64,30±4,86	ghi	88,74±5,64	efg
		C4	57,72±4,86	defghi	99,43±5,64	g
	Escalonada	C1	66,30±4,86	hi	99,32±5,64	g
		C2	61,78±4,86	fghi	100±5,64	g
		C3	58,96±4,86	efghi	100±5,64	g
		C4	50,54±4,86	cdefghi	100±5,64	g
Odontoglossum	Rápida	C1	51,13±4,86	cdefghi	52,10±5,64	ab
		C2	66,56±4,86	i	47,90±5,64	a
		C3	47,78±4,86	bcdefg	48,36±5,64	a
		C4	45,39±5,95	bcdef	57,39±6,91	abc
	Escalonada	C1	59,37±4,86	efghi	60,19±5,64	abc
		C2	59,42±4,86	fghi	69,51±5,64	bcd
		C3	57,15±4,87	defghi	66,51±5,64	abcd
		C4	58,40±4,86	defghi	60,85±5,64	abcd
Epidendrum	Rápida	C1	57,98±4,86	defghi	59,32±5,64	abc
		C2	56,72±4,86	defghi	59,54±5,64	abc
		C3	51,83±4,86	cdefghi	53,47±5,64	ab
		C4	49,54±4,86	cdefgh	53,93±5,64	abc
	Escalonada	C1	50,33±4,86	cdefghi	68,07±5,64	bcd
		C2	56,01±4,86	defghi	79,46±5,64	bef
		C3	47,28±4,86	bcdef	80±5,64	def
		C4	47,50±4,86	bcdefg	73,45±5,64	cde
Oncidium	Rápida	C1	47,58±4,86	bcdefg	71,07±5,64	bcde
		C2	41,43±4,86	bcd	64,79±5,64	abcd
		C3	32,87±4,86	ab	53,34±5,64	ab
		C4	41,61±2,86	bcd	65,31±5,54	abcd
	Escalonada	C1	42,41±4,86	bcde	69,77±5,64	bcd
		C2	38,52±4,86	abc	66,04±5,64	abcd
		C3	36,48±4,86	abc	56±5,64	abc
		C4	24,19±4,86	a	58,36±5,64	abc

Nota: Diferentes letras presentan diferencia significativa.
C1: 1,5ml DMSO 1M; C2: 0,75ml de DMSO 1M+ 0,75ml de Sucrosa 1M: C3: 0,75ml de DMSO 1M+ 0,75ml de Glicerol 1M; C4: 0,5ml de DMSO 1M+ 0,5ml de Sucrosa 1M + 0,5ml de Glicerol 1M, por E.Cueva & M. Moya, 2014.

En cuanto al género *Elleanthus* se obtuvo que el mejor tratamiento para el porcentaje de viabilidad de semillas en la prueba de tetrazolio fue el C1 con 66,30% por la técnica de enfriamiento escalonada y con un 64,7% por la técnica rápida (Tabla 6).

En el género *Odontoglossum* se registró que el mejor tratamiento para el porcentaje de viabilidad fue el C2 con 66,56% por la técnica de enfriamiento rápida, mientras que en la técnica escalonada presentó en C1 y C2 con 59,37 y 59,42%, respectivamente. En el género *Epidendrum* se registró que el mejor tratamiento fue el C1 con 57,98% por la técnica de enfriamiento rápida; mientras, que en técnica escalonada el C2 con 56,01%. En el género *Oncidium* se registró mejores resultados con el crioprotector 1 con 47,58% por la técnica de enfriamiento rápida y con un 42,41% por la técnica escalonada.

Los mejores valores de viabilidad respecto a la interacción técnica rápida más crioprotector C1; y técnica escalonada más crioprotectores C2, C3 y C4 en el test presencia de embrión, presentaron en el género *Elleanthus* porcentajes del 100%, de igual forma el género *Odontoglossum* presentó el menor porcentaje con el 47, 90% de viabilidad, en la interacción de la técnica rápida y C2.

El test de presencia de embrión presentó mayores porcentajes de viabilidad en relación al test de tetrazolio, como se mencionó anteriormente no es un test preciso para determinar la viabilidad de semillas de orquídeas, debido a que la presencia de embrión no garantiza que todos las semillas son viables y tendrán un alto porcentaje de germinación porque su embrión puede tener deficiencias y anormalidades de naturaleza (Salazar & Seir, 2012, pág. 78).

3.3.1 Turgencia (Evaluación *in vitro)*:

Tabla 7. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de turgencia de semillas después de crioconservación.

GÉNERO	TÉCNICA	CRIOPROTECTOR	%TURGENCIA
Elleanthus	Rápida	C1	82,50 ef
		C2	58,33 abcdef
		C3	70,00 cdef
		C4	47,14 abcd
	Escalonada	C1	57,50 abcdef
		C2	51,67 abcdef
		C3	53,33 abcdef
		C4	50,00 abcdef
Odontoglossum	Rápida	C1	83,33 f
		C2	70,00 cdef
		C3	72,00 cdef
		C4	65,00 bcdef
	Escalonada	C1	74,00 def
		C2	50,00 abcdef
		C3	57,00 abcdef
		C4	71,00 cdef
Epidendrum	Rápida	C1	70,00 cdef
		C2	55,00 abcdef
		C3	38,00 abc
		C4	56,00 abcdef
	Escalonada	C1	56,00 abcdf
		C2	48,00 abcde
		C3	38,00 abc
		C4	40,00 abcd
Oncidium	Rápida	C1	55,00 abcdef
		C2	53,33abcdef
		C3	42,00 abcd
		C4	35,00 ab
	Escalonada	C1	52,00 abcdf
		C2	40,00 abcd
		C3	26,25 a
		C4	46,67 abcd

Nota: Diferentes letras presentan diferencia significativa.
C1: 1,5ml DMSO 1M; C2: 0,75ml de DMSO 1M+ 0,75ml de Sucrosa 1M: C3: 0,75ml de DMSO 1M+ 0,75ml de Glicerol 1M; C4: 0,5ml de DMSO 1M+ 0,5ml de Sucrosa 1M + 0,5ml de Glicerol 1M, por E.Cueva & M. Moya, 2014.

Para el género *Elleanthus* el C4 presentó el porcentaje más bajo con 47,14% y 50% en técnica rápida y escalonada, respectivamente; el C1 obtuvo el porcentaje más alto tanto en técnica rápida como escalonada con 82,50% y 57,50%, respectivamente. El género *Odontoglossum* con el C1 obtuvo el porcentaje más alto tanto en técnica rápida como

escalonada 83,33% y 74,00% respectivamente; C4 y C2 presentaron el porcentaje más bajo, C4 con técnica rápida con 65,00% y C2 con técnica escalonada con 50,00%. El género *Epidendrum* obtuvo el porcentaje más alto tanto en técnica rápida como escalonada con C1 dando como resultado 70,00% y 56,00%, respectivamente; el porcentaje más bajo en técnica rápida y escalonada fue C3 con 38,00% en ambos casos. Y el género *Oncidium* mostró un porcentaje alto con C1 tanto en técnica rápida y escalonada con 55,00% y 52,00% y; el porcentaje más bajo, en técnica rápida con C4 con 35,00% y escalonada el C3 con 26,25% (Tabla 7). Según Cruz & Cardenas (2012), para germinación en el género *Epidendrum sp.* reportan porcentajes desde 50% al 75%, resultados similares al presente estudio.

El crioprotector con los mayores porcentajes de turgencia, tanto en técnica rápida y escalonada es el C1 (DMSO: Dimetilsulfóxido 1M), ya que es el crioprotector más utilizado por ser fácilmente miscible, absorbido por las células y no tóxico a bajas concentraciones (Bajaj, 1988) .

3.3.2 Evaluación *in vitro*: contaminación bacteriana y fúngica

Luego de haber transcurrido 90 días de la siembra de las semillas de orquídeas *in vitro* se evaluó la contaminación fúngica y bacteriana, obteniendo los siguientes resultados:

En cuanto al género *Elleanthus* se obtuvo mayor contaminación fúngica que bacteriana, llegando a obtener valores de 40 % en el crioprotector 2 (DMSO+Sucrosa 1M) por técnica de enfriamiento rápida, y en el crioprotector 4 (DMSO+Sucrosa+Glicerol al 1M) por enfriamiento escalonado. Para contaminación bacteriana tanto en enfriamiento rápido como escalonado con C1 presentaron porcentajes de 10% y 20%, respectivamente.

En el género *Odontoglossum* registró mayor contaminación bacteriana en el crioprotector 4, por las dos metodologías de enfriamiento alcanzando un 50%, los niveles de contaminación fúngica no sobrepasan el 10% solo en C1 por enfriamiento escalonado y C4 por rápido.

Tabla 8. Promedio (±) el error estándar porcentaje de contaminación *in vitro* en relación a género y crioprotector.

GÉNERO	TÉCNICA	CRIOPROTECTOR	CONTAMINACIÓN			
			BACTERIANA		FÚNGICA	
Elleanthus	Rápida	C1	10±0,10	ab	0,00	a
		C2	0,00	a	40±0,13	abcd
		C3	0,00	a	20±0,13	abc
		C4	0,00	a	30±0,13	abcd
	Escalonada	C1	20±0,10	abc	0,00	a
		C2	10±0,10	ab	30±0,13	abcd
		C3	0,00	a	0,00	a
		C4	20±0,10	abc	40±0,13	abcd
Odontoglossum	Rápida	C1	10±0,10	ab	0,00	a
		C2	0,00	a	0,00	a
		C3	0,00	a	0,00	a
		C4	50±0,10	c	10±0,13	bcd
	Escalonada	C1	10±0,10	ab	10±0,13	ab
		C2	0,00	a	0,00	a
		C3	0,00	a	0,00	a
		C4	50±0,10	c	0,00	bcd
Epidendrum	Rápida	C1	10±0,10	ab	40±0,13	abcd
		C2	20±0,10	abc	30±0,13	abcd
		C3	0,00	a	50±0,13	bcd
		C4	10±0,10	ab	40±0,13	abcd
	Escalonada	C1	20±0,10	abc	30±0,13	abcd
		C2	0,00	a	50±0,13	bcd
		C3	10±0,10	ab	40±0,13	abcd
		C4	0,00	a	70±0,13	d
Oncidium	Rápida	C1	10±0,10	ab	50±0,13	bcd
		C2	20±0,10	abc	50±0,13	bcd
		C3	10±0,10	ab	50±0,13	bcd
		C4	40±0,10	bc	30±0,13	abcd
	Escalonada	C1	10±0,10	ab	40±0,13	abcd
		C2	0,00	a	60±0,13	cd
		C3	0,00	a	50±0,13	bcd
		C4	20±0,10	abc	50±0,13	bcd

Nota: * Diferencia significativa.
Diferencia de letras significativas, por E.Cueva & M. Moya, 2014.

En el género *Epidendrum* los niveles de contaminación bacteriana registrados fueron en un rango de 0 a 20% en todas las interacciones de crioprotectores y técnicas, mientras que en contaminación fúngica con la técnica rápida el menor porcentaje es el C2 con 30% y el mayor porcentaje es del C3 con 50%; mientras que por la técnica escalonada el menor porcentaje es el C1 con 30% y el mayor porcentaje es de 70% del C4.

En el género *Oncidium* los niveles de contaminación fúngica independientemente de la técnica de enfriamiento utilizada van desde el 30% al 60%, en cuanto a contaminación bacteriana el crioprotector 4 presentó mayor porcentaje con 40% en la técnica de enfriamiento rápido y el menor porcentaje presentaron los crioprotectores 1 y 3 con el 10% de contaminación. Por técnica de enfriamiento escalonada solo presentó contaminación el C1 y C4 con 10 y 20% respectivamente.

En forma general se puede mencionar que los géneros *Elleanthus y Odontoglossum* son los géneros que menor contaminación fúngica y bacteriana registraron en la evaluación *in vitro,* mientras que los géneros *Epidendrum y Oncidium* presentaron mayores niveles de contaminación pese que a los cuatro géneros se aplicó el mismo protocolo de desinfección, los dos últimos géneros presentaban mayor tiempo de colección al vacío, mientras que los dos primeros géneros se obtuvieron de colecciones recientes, con lo que fueron menos manipulados y por lo tanto expuestos a menor contaminación.

Los contaminantes fúngicos fueron fácilmente detectables en los medios de cultivo debido a que su crecimiento es visible en forma de colonias aisladas o alrededor de los explantes y su origen puede ser multicasual, la determinación de la fuente puede ser dificultosa por que los microorganismos pueden ser introducidos en varios puntos del proceso, principalmente, por ineficiente desinfección de los explantes primarios utilizados, por inadecuada manipulación del material vegetal, deficientes técnicas de asepsia, incompleta esterilización del medio de cultivo, por fallos en el funcionamiento del flujo laminar, o a través del ambiente del laboratorio (EcuRed, 2014). Por otro lado las bacterias son consideradas como los contaminantes comunes y las que ocasionan los problemas más serios, porque pueden ser sistémicas, y su detección es más difícil debido a que escapan a los efectos de los esterilizantes superficiales y pueden ser inter o intracelulares (Digonzelli, Diaz, & Carrizo de Bellone, 2005).

Para la presente investigación se acepta la hipótesis alternativa “al menos uno de los crioprotectores propuestos permitirá una adecuada crioconservación de la mayoría de las semillas de orquídeas nativas de Ecuador”; el C1 (DMSO 1M), permitió los mayores valores de viabilidad de semillas de orquídea de los cuatro géneros.

CONCLUSIONES

Las semillas del género *Elleanthus* presentaron un promedio de longitud de 0,28mm, diámetro de 0,06mm, un peso promedio de 982,5 semillas/mg. La forma de la semilla es ensanchada en el centro con un extremo puntiagudo y el otro extremo cuadrado, de color amarillo.

En cuanto al género *Odontoglossum*, su longitud promedio fue de 0,6mm, diámetro de 0,08mm, pesó 739,7 semillas/mg. Forma ensanchada en el centro con sus dos extremos puntiagudos, de color amarillo verdoso.

El género *Epidendrum* con un promedio de longitud de 0,56mm, diámetro de 0,07mm, peso 702,75 semillas/mg. La semilla es elíptica con una terminación puntiaguda y la otra cuadrada, de color verde.

El género *Oncidium* presentó un promedio de longitud y diámetro de 0,39mm y 0,07mm respectivamente. Su peso fue de 495,1 semillas/mg. La forma de la semilla es ensanchada en el centro tiene una terminación puntiaguda y la otra cuadrada, de color amarillo verdoso.

El género *Elleanthus* presentó el porcentaje más alto de viabilidad por tetrazolio antes y después de crioconservación con el 85,63 y 61,37 % respectivamente; de igual forma obtuvo el porcentaje más alto de viabilidad por presencia de embrión antes y después de crioconservación con el 95,2 y 97,52 %, respectivamente.

El género *Odontoglossum* presentó el porcentaje más alto de viabilidad por tetrazolio antes y después de crioconservación con el 78,9 y 53,78% respectivamente; de igual forma obtuvo el porcentaje más alto de viabilidad por presencia de embrión antes y después de crioconservación con el 82,7 y 57,79 %, respectivamente.

El género *Epidendrum* presentó el porcentaje más alto de viabilidad por tetrazolio antes y después de crioconservación con el 71,44 y 52,15% respectivamente; de igual forma obtuvo el porcentaje más alto de viabilidad por presencia de embrión antes y después de crioconservación con el 78,81 y 65,9 %, respectivamente.

El género *Oncidium* presentó el porcentaje más alto de viabilidad por tetrazolio antes y después de crioconservación con el 70,66 y 38,14% respectivamente; de igual forma

obtuvo el porcentaje más alto de viabilidad por presencia de embrión antes y después de crioconservación con el 86,29 y 63,9 %, respectivamente.

Para la variable porcentaje de viabilidad en la prueba de tetrazolio (evaluación *ex vitro*), el protocolo óptimo de almacenamiento de semillas para el género *Elleanthus*, fue la técnica escalonada con C1 (1,5ml de DMSO 1M), con un 66,3% de viabilidad. Para el género *Odontoglossum*, fue la técnica rápida con C2 (0,75ml de DMSO 1M+ 0,75ml de Sucrosa 1M), con un 66,5% de viabilidad en la prueba de tetrazolio. El protocolo óptimo de almacenamiento de semillas para el género *Epidendrum*, fue la técnica rápida con C1 (1,5ml de DMSO 1M), con un 57,9% de viabilidad en la prueba de tetrazolio. Y para el almacenamiento de semillas del género *Oncidium*, fue la técnica rápida con C1 (1,5ml de DMSO 1M), con un 47,5% de viabilidad en la prueba de tetrazolio.

Para la variable porcentaje de turgencia (evaluación *in vitro*), el protocolo óptimo de almacenamiento de semillas para todos los géneros fue la técnica rápida más C1 (1,5ml de DMSO 1M). Presentando una turgencia de 82,5% para *Elleanthus*, 83,3% para *Odontoglossum*, 70% para *Epidendrum* y para *Oncidium* un 55%.

RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de las descripciones morfológicas de la presente investigación para poder identificar con mayor precisión las semillas de los géneros *Elleanthus, Epidendrum, Odontoglossum* y *Oncidium*.

Se recomienda efectuar la prueba de tetrazolio para todos los géneros, debido a que tiene multiples ventajas como: tiñe embriones viables, permite conocer la capacidad de producir una plantula normal con el fin de realizar una estimación rápida de la viabilidad de las semillas de orquídeas.

Para la crioconservación *ex vitro* de semillas de orquídea, se recomienda para el género *Elleanthus*, usar la técnica escalonada con C1 (1,5ml de DMSO 1M). Para el género *Odontoglossum*, la técnica rápida con C2 (0,75ml de DMSO 1M+ 0,75ml de Sucrosa 1M). Para el género *Epidendrum*, fue la técnica rápida con C1 (1,5ml de DMSO 1M). Y para el almacenamiento de semillas del género *Oncidium*, la técnica rápida con C1 (1,5ml de DMSO 1M).

Se recomienda a la crioconservación como método para almacenar las semillas de orquídeas por tiempos prolongados con altas tasas de viabilidad y germinación.

LISTA DE REFERENCIAS

Abdelnour, A. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales.*

Abdelnour, A. (1999). *Situación actual y perspectivas de las aplicaciones biotecnológicas en la conservación y uso de los recursos fitogenéticos*, 299-306. Costa Rica.

Aguirre, Z., León , N., Yaguana, C., & Merino, B. (2011). Catálogo de las Orquídeas del Jardín Botánico el PADMI. Zamora Chinchipe, Ecuador.

Ambiente, M. d. (2010a). *Cuarto Informe Nacional para Convenio sobre la Diversidad Biológica.* Quito: Global Enviroment Facility.

An introduction to seed vigour testing. (1995). *Internacional Seed Testing Seminar*, 1-9. Copenhagen.

Arditti, J. (1979). *Aspects of the Physiology of Orchids.*

Arditti, J. (1992). *Fundamentals of Orchis Biology.* New York: John Wiley & Sons.

Arditti, J., Clements, M., Fast, G., Hadley, G., Nishimura, G., & Ernest, R. (1982). *Orchid seed germination and seedling culture- a manual.* Ithaca: Cornell University.

Ávila, I. (2012). *Programa de la materia optativa: Biología de la conservación de Orchidaceae I.* Recuperado el 17 de 7 de 2014, de bios.biologia.umich.mx.

Ávila-Portillo, L; León, M; Acosta, L; Gómez, C; Delgado, L; Gómez, C; Lozano, J; Reguero, M. (2006). Fundamentos de Criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 291-300.

Bajaj, Y. (1988). *Cryopreservation and the retention of biosynthetic potencial in cell cultures of medicinal and alkaloid producing plants.* Berlin.

Benson, E., Johnston, J., Muthusamy, J., & Harding , K. (2006). *Physical and engineering perspectives of in vitro plant cryopreservation.* Holanda: Springer.

Bridgewater, G. (2005). *The Orchids Specialist.* Londres: New Holland Publisher.

Cavero, M., Collantes, B., & Patroli, C. (1991). *Orquídeas del Perú.* Perú.

Centro Internacional de Agricultura Tropical, C. (1991). Fundamentos y Aplicaciones. En W. Roca, & M. Mogrinski, *Cultivo de tejidos en la Agricultura* (págs. 721-723). Cali, Colombia.

Cerna, M. (26 de Agosto de 2014). Las Orquídeas y la Crioconservación. (E. Cueva, & M. Moya, Entrevistadores).

Chase , M., Freudenstein, W., Cameron, Y., & Barrett, A. (2011). DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. 69-89.

Clifford, & Smith. (1969). *Basic shapes of seed found 49 orchids species belonging to the tribes Epidendreae and Neotticae.*

Cruz, A., & Cardenas, N. (10 de 2012). *Colección de germoplasma de especies de la familia Orchidaceae del Cantón Santiago de Méndes- Morona Santiago*. Quito, Pichincha, Ecuador.

Digonzelli, P., Diaz, L., & Carrizo de Bellone, S. (01 de 2005). *Uso de PPM Plant Preservative Mixture para controlar contaminantes bacterianos en la multiplicación in vitro de caña de azúcar.* Recuperado el 18 de 12 de 2014, de Scielo Venezuela: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182005000100003&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0378-7818.

Dodson, C. H. (1991). *Orquídeas nativas de Colombia Vol 1 Acallis-Dryadella*. Medellin: Colina.

Dressler, L. (2005). How Many orchid species. *Selbyana*, 155-158.

Ecuagenera. (2011). *Orquídeas Manual de Cultivo* (Vol. 1). Quito, Pichincha, Ecuador.

ECUAGENERA. (2014). *Orquídeas del Ecuador*. Recuperado el 18 de 8 de 2014, de http://www.ecuagenera.com/epages/whitelabel4.sf/es_ES/?ObjectPath=/Shops/ecuagenera/Products/PRS1264-002.

ECUAGENERA. (2014). *Orquídeas del Ecuador*. Recuperado el 18 de 8 de 2014, de http://www.ecuagenera.com/epages/whitelabel4.sf/es_ES/?ObjectPath=/Shops/ecuagenera/Products/PRS0348.

EcuRed. (2014). *Contaminación microbiana in vitro (Tejidos vegetales).* Recuperado el 12 de 10 de 2014, de http://www.ecured.cu/index.php/Contaminaci%C3%B3n_microbiana_in_vitro_%28Tejidos_vegetales%29.

Endara, L. (2009). *Florida Museum of Natural History.* Recuperado el 16 de 10 de 2014, de http://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/Patrones_endemismo.htm.

Engelmann, F. (2000). *Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources.* Roma.

Engelmann, F. (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germplasm-a review. Euphytica.

Fanfani, A., & Rosi, W. (1988).

Ferguson, J. (1995). *An introduction to seed vigour testing.* Zurich: Internacional Seed Testing Association.

Fischer, A. (2007). *Cultivo de Orquídeas.* Buenos Aires: Albatros.

Freuler, M. (2007). *Orquídeas* (Primera ed.). Buenos Aires: Albatros.

García, J. (1984). En C. c. manejo.

Garcia, M., Parra, D., & Mena, P. (s.f.). El País de la Biodoversidad.

García-Aguila, L., De Feria, M., & Acosta, K. (2007). Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. En *Biotecnología Vegetal* (págs. 7:67-79).

Gonzalez, A. (2001). *Crioconservación y Caraterización de Recursos Fitogenéticos* (1 ed.). Madrid: Monte Casino.

Gonzalez, S., Gómez, F., García, I., & Chaves, A. (Marzo-Abril de 2007). *Técnica Industrial.* Recuperado el 17 de Octubre de 2014, de http://www.tecnicaindustrial.es/tiadmin/numeros/28/35/a35.pdf

Grobler, L. (28 de Febrero de 2012). *Flickr*. Recuperado el 16 de 10 de 2014, de http://www.flickr.com/photos/afriorchids/4395997598/in/photostream/

Hirai, D., & Sakai, A. (2000). Roma.

Howarth, M., & Stanwood, P. (1993). Tetrazolium staining viability test using color image processing. En *Transactions of the American Society of Agricultira Engineers* (págs. 36:1937-1940).

INIAP, I. N. (2008). *Informe Nacional sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación*. Recuperado el 21 de 10 de 2014, de http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/Ecuador.pdf

INSTA, I. r. (2006). Italia.

Iriondo, A. (2001). *Conservación de especies raras y amenzadas (Revisión).*

Jijón, C. y. (2007). Quito: Jardín Botánico de Quito y Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Larson, A. (1996). *Introducción a la floricultura.* México: Departamento de ciencias hortícolas de la universidad de estado de Carolina del norte.

León-Yánez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro rojo de las especies endémicas del Ecuador* (Segunda ed.). Quito: Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Lider Cosmetica. (12 de 08 de 2014). Obtenido de http://lidercosmetica.com/bellezanatural/?p=96

López, A. (2004). *Simposio de biodiversidad y conservación de algunos recursos florísticos en el estado de Hidalgo.*

Mark , W., & James, L. (2009). A phylogenetic classification of the land plants to a company APGII. *Botanical Journal of the Linnean Society*, págs. 122-127.

Mayo, A., Cazares, J., Lazaro, E., & Flores, A. (2010). *Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plantúlas de Orquídeas Silvestres de Tabasco.* Villahermosa: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Mazur, P. (1984). *Freezing of living cells: Mechanims and implications.*

Mcnelly, J. A., Miller, K. R., Reid, W. V., Mittermeier, R. A., & Werner, T. B. (1990). *Conserving the World Biologycal Diversity.* Suiza.

Menchaca, A., & Moreno, J. (2011). *Conservación de orquídeas una tarea de todos.* México.

Mundiflora. (s.f.). Recuperado el 16 de 10 de 2014, de http://www.mundiflora.com/detalles-726-odontoglossum-halli%20elegans

Nash, N., & La Croix, I. (2007). *Orquídeas.* Barcelona: Omega.

Neil, D., & Ulloa-Ulloa, C. (2005). *Adiciones a la Flora del Ecuador*. (Vol. Segundo Suplemento). Quito: Fundación Jatun Sacha.

Nikishina , T., Popov, A., Kolomeitsevay, G., & Golovkin, B. (2001). Effect of cryoconservation on seed germination of rare tropical orchids. *Russian Academy of Sciences*, 810-811.

Nitzsche, W. (1983). *Germoplasm preservation* (Vol. 1). Nueva York, E.U.: McMillan Publishing.

Oakes , A., & Donovan, S. (1985). *Orchids of Guatemala and Belize.* Guatemala.

Palma, G. (2007). *Reprobiotec*. Recuperado el 26 de Octubre de 2014, de http://www.reprobiotec.com/nitrogeno_liquido_uso.html

Pérez, J. (2006). Cultivo *in vitro* de plantas y sus aplicaciones en la agricultura (Primera ed.). España: 302-305.

Pritchard, H. (1995). *Cryopreservation of seeds* (Vol. 38). (J. Day, & M. McLellan, Edits.) Totawa, N.J: Humana Press Inc.

Pritchard, H., & Prendergast, F. (1990). *Viability testing in terrestrial orchid seed.* Acta Universitatis Wratislaviensis.

Rao, N. (2014). Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, págs. 3:136-145.

Rao, N., Hanson, M., Dullo, E., Ghosh, D., & Larinde, M. (2007). *Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma.* Roma, Italia.

Rasmussen , H. (1995). *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plants.* Cambridge: Cambridge University Press.

Roca, W., & Mogrinski, M. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura. Cali, Colombia.

Sakai , A., Kobayashi, S., & Oiyama, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Orb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. En *Plants Cell Reports* (pág. 30).

Salazar, & Seir, A. (2012). Germinación asimbiotica de semillas y desarrollo *in vitro* de plantas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Red de Revistas Cientificas de America Latina, el Caribe, España y Portugal*, 69-78.

Sánchez, A. (2011). *Conceptos básicos de gestión ambiental y desarrollo sustentable.* México.

Scocchi, A., & Rey, H. (2001). *Conservación de germoplasma vegetal.*

Shung-Chang, J. (1989). Biotic diversity and germoplasm preservation global imperatives. En *Betsville Symposia in Agricultural Research* (págs. 241-271). Netherlands: Kluger academy publishers.

Sierra, R. (2013). *Patrones y factores de deforestación en el Ecuador continental 1990-2010 y un acercamiento a los próximos 10 años.* Quito: Conservación Internacional Ecuador y Forest Trends.

Sierra, R., Cerón, C., Palacios, W., & Valencia, R. (1999). *Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de la vegetación para el Ecuador continental.* Quito: Proyecto INEFAN/GEF-BIRF, Wildlife Conservation Society and Ecociencia.

SMICS, S. N. (8 de 10 de 2014). *Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas- SMIC.* Recuperado el 23 de Octubre de 2014, de http://snics.sagarpa.gob.mx/rfaa/Paginas/recursos-fitogeneticos.aspx

Tellez, M., Hernandez, A., & Hernandez, A. (2007). Orquídeas Terrestres de la Sierra Las Navajas. *Simposio de biodiversidad y conservación de algunos recursos florísticos en el Estado de Hidalgo*, 28. Mexico.

Valencia, R., Pitman, N., León-Yánez, & Jorgensen, M. (2000). *Libro Rojo de las Especies Endémicas del Ecuador.* Quito: Publicaciones Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Vaquez, F., Rincon, S., & Ramos , S. (2008). *Anotaciones cronológicas a la Flora de Extremadura.*

Vasquez, L., & Saltos, N. (2009). Ecuador su realidad. Quito, Ecuador: Fundación de Investigación y Promoción Social "José Peralta".

Villa, A., & Sánchez, A. (2003). 55. Crioconservación de una sección de *Solanum phureja* (Tesis de Grado), Universidad de Tolima.

Villalobos, & Engelman. (1995). *Ex situ* conservation of plants gemrplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, pág. 375.

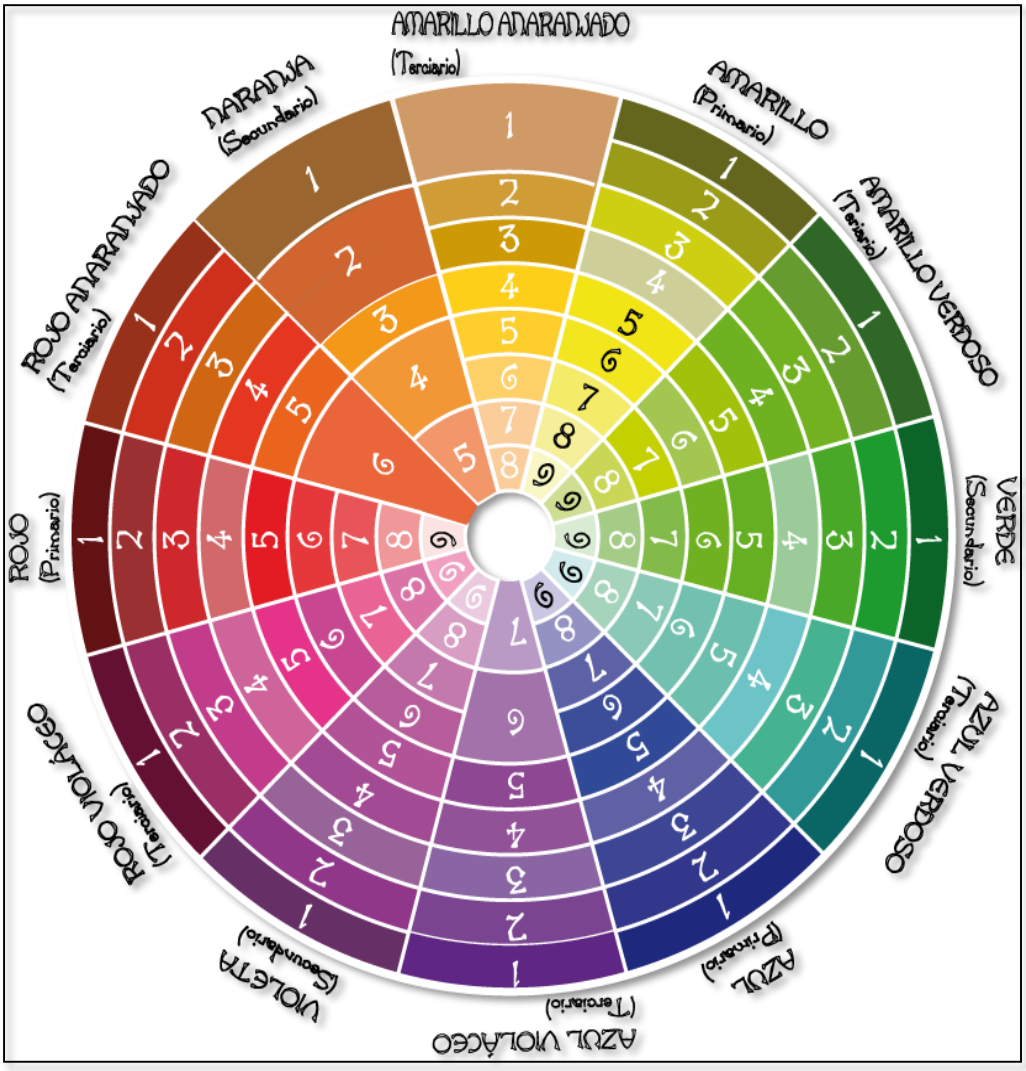
Wang, Y., Fan, M., & Liaw, S. (2005). *Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of papaya (Carica papaya L.) by vitrification.* Botanical Bulletin of the Academia Sinica.

Withers, L., Wheelans, S., & Williams, J. (s.f.). *In vitro* conservation of crop germoplasm and the IBPGR databases. Euphytica.

Wyse, J., & Sutherlan, L. (2000). *Agenda Internacional para la Conservación en Jardines Botánicos.* Kew, Inglaterra: Richmond.

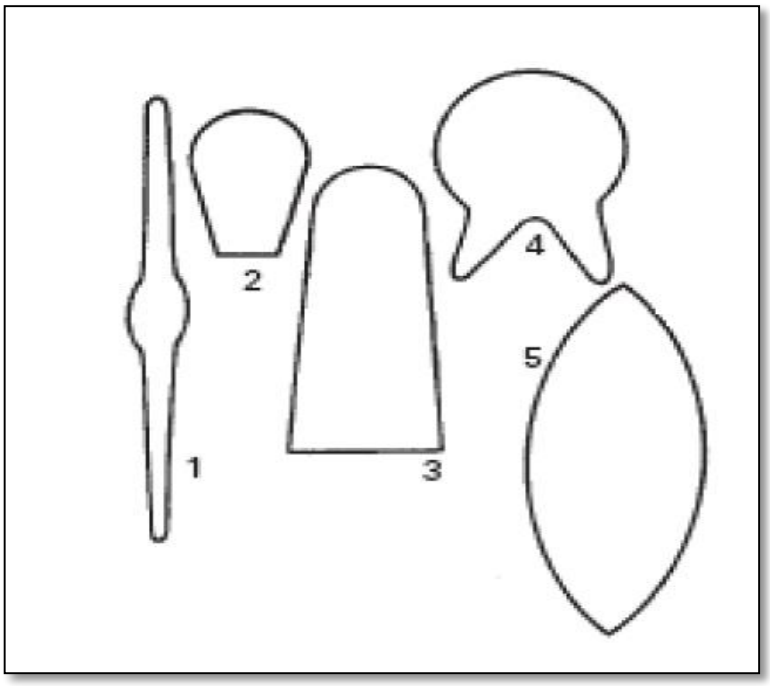
ANEXOS

Anexo 1. Escala Colorimétrica



Fuente: (Lider Cosmetica, 2014)

Anexo 2. Formas generales de semillas



Fuente: (Clifford & Smith, 1969).

Anexo 3. Formas de semillas según Arditti

Fuente: (Arditti, J, 1979)

Anexo 4. Informe final Ministerio de Ambiente

Ibarra, 8 de septiembre del 2014

Ing. Segundo Fuentes

DIRECTOR PROVINCIAL DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE IMBABURA

Presente.-

De mis consideraciones:

Yo, Marco Fernando Cerna Cevallos C.I.: 0501872071; domiciliado en la ciudad de Quito, me permito poner a su consideración el INFORME FINAL del proyecto: **Banco de germoplasma de Orquídeas del Ecuador Fase I (sección Cotacachi-Cayapas)**, con Autorización de investigación científica N° 08-2013-0869-IC_FAU-FLO-DAPI-UNO-MAE. para su análisis y aprobación.

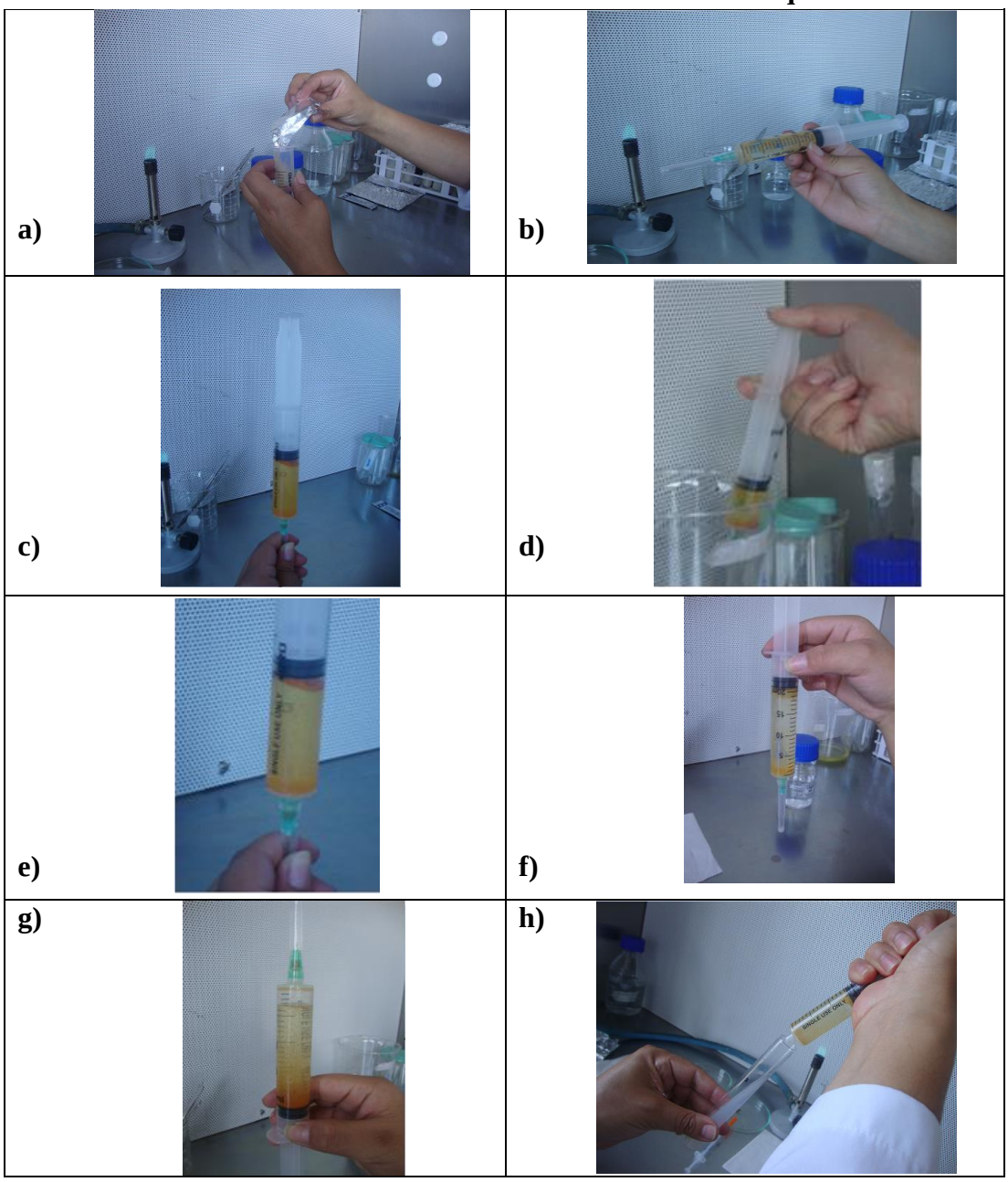
Nota se adjunta un CD con la información y fotografías de este proyecto.

Agradezco de antemano por su atención.

Atentamente

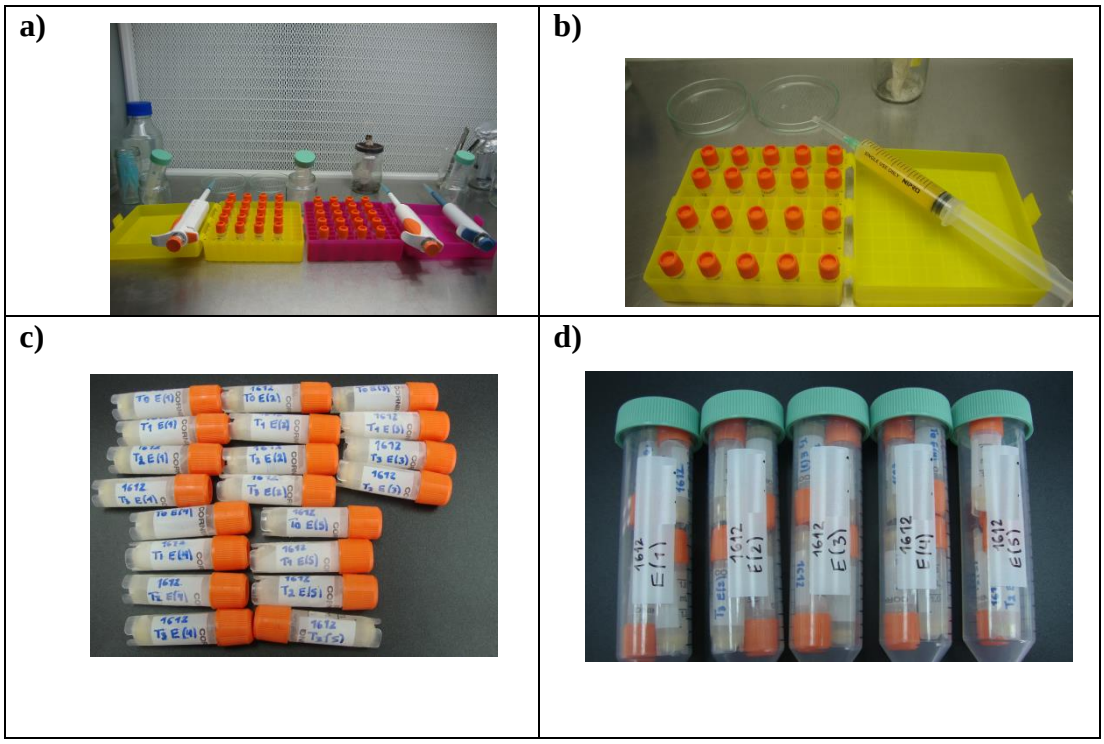
Dr. Marco Cerna
DOCENTE INVESTIGADOR
UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA
TLF 0997659069
mcerna@ups.edu.ec

Anexo 5. Protocolo de desinfección de semillas de orquídeas



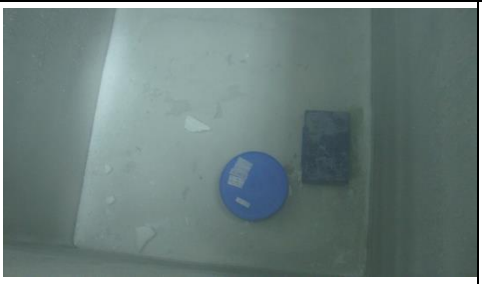
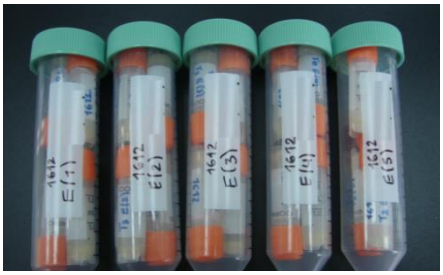
Anexo 5. a) Introducción de semillas en jeringuilla b) Semillas embebidas en solución de cloro+Tween 20 c) Sedimentación de semillas d) Desecho de solución de cloro e) Semillas embebidas en solución de alcohol al 70% f y g) Semillas embebidas en agua destilada estéril h) Siembra en tubos de ensayo.

Anexo 6. Procedimiento preparación de crioviales (crioprotector + semillas estériles)



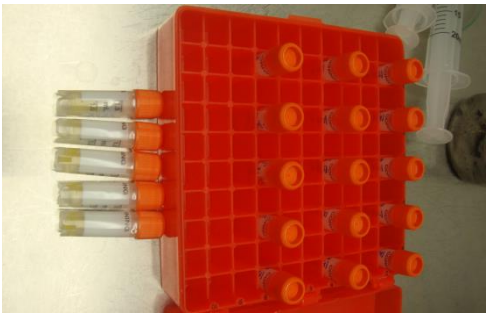
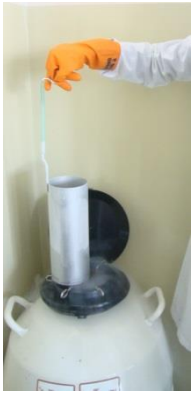
Anexo 6. a) Materiales en cámara de flujo laminar; b) Semillas estériles y crioviales c) Crioviales con crioprotectores y semillas d) Tubos de plástico de 50 ml con crioviales.

Anexo 7. Procedimiento: Método de enfriamiento escalonado

a)	b)
c) 	d)
e)	f) 
g)	h)

Anexo 7. a) Colocación de viales en Cryo 1 ºC "Mr.Frosty" Frezing Container Rack; b) y c) Colocación en congelador de – 80 ºC, d) Retiro de Freezing Container Rack del congelador, e) Viales después de enfriamiento, d) Colocación en tubos de plástico, e) y f) Introducción en nitrógeno líquido.

Anexo 8. Procedimiento: Método de enfriamiento rápido

a) 	**b)**
c)	**d)** 

Anexo 8. a) Crioviales con semillas + crioprotectores; b) Viales en tubos plásticos; c) y d) Introducción en nitrógeno líquido.