



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
Y FORESTALES

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

LATENCIA SECUNDARIA Y VIABILIDAD DE SEMILLAS DE *Laelia speciosa* (H. B. K.) SCHLT. (ORCHIDACEAE) DURANTE SU CONSERVACIÓN

PROYECTO DE TESIS

que presenta

BIÓL. ERANDENI DURÁN MENDOZA

REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de tesis: Dr. Alejandro Martínez Palacios



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES

Morelia Michoacán, marzo de 2017

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
Y GÉNETICA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y
FORESTALES (UNIDAD SAN JUANITO ITZICUARO), BAJO LA DIRECCIÓN DEL
DR. ALEJANDRO MARTÍNEZ PALACIOS.

DEDICATORIA

A mis padres por darme la oportunidad, el apoyo y la confianza por tenerlos conmigo que son dos seres maravillosos que los amo con todo mi corazón.

A Dios por enseñarme que no hay imposibles que siempre hay que tener la mirada en el presente.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a:

En primer lugar, manifiesto mi gratitud al Dr. Alejandro Martínez Palacios, director de este trabajo, por su apoyo, tiempo de dedicación a este trabajo, paciencia y por cada una de sus enseñanzas que me han servido mucho.

Mi gratitud y afecto a los profesores sinodales: Dra. Martha Pedraza Santos, Dra. Susana Guillen Rodríguez, Dr. Martín Mata Rosas y al Dr. Philippe Lobit, por el tiempo dedicado a las aportaciones enriqueciendo este trabajo, por estar en cada uno de los tutoriales, aunque estuvieran lejos siempre estuvieron al pendiente.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en especial al Instituto de investigación Agropecuarias y Forestales y al Programa Institucional en Ciencias Biológicas por haberme aceptado en el posgrado y por las instalaciones para la realización de este trabajo.

Así mismo expreso mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo de beca nacional 572922/662152 otorgada para la realización de los estudios de posgrado, que sin esta no hubiera sido posible.

Agradezco al Dr. Nahum Sánchez Vargas por su ayuda y tiempo en la realización de los análisis estadísticos.

Agradezco sin duda a mis padres Ofelia y Lalo y mis hermanos, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, su confianza y sin ellos no podría haber llegado hasta aquí y por este logro que es también de ellos.

Gracias a mis compañeras y amigas de maestría Herme y Marisol, y todos mis amigos por ofrecerme su amistad y su apoyo condicional,

A toda mi familia, tías Male y Lala y a mi mamá Ofe que siempre están ahí para apoyarme por cada uno de sus consejos.

Y a Jonatan persona que incondicionalmente que durante nueve años está conmigo, por su gran apoyo y nunca dejarme caer.

Agradecimiento de todo corazón.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Características de la especie de estudio.....	4
2.1.1. Clasificación taxonómica.....	4
2.1.2. Descripción botánica de <i>Laelia speciosa</i> (H.B.K.) Schltr. 1914. (Tomado de Halbinger y Soto, 1997).....	5
2.1.3. Distribución y hábitat de <i>Laelia speciosa</i> (H.B.K.) Schltr. (Tomado de Halbinger y Soto, 1997).....	6
2.1.4. Nombres comunes y sinonimias.....	7
2.1.4.1. Nombres comunes.....	7
2.1.5. Usos y estatus de <i>L. speciosa</i>	7
2.2. Latencia de semillas.....	8
2.2.1. Latencia en orquídeas.....	10
2.3. Conservación de recursos fitogenéticos.....	11
2.4. Clasificación de semillas.....	12
2.5. Conservación <i>ex situ</i> de semillas de orquídeas.....	13
2.6. Crioconservación.....	14
2.6.1. Técnicas de crioconservación.....	15
2.6.1.1. Métodos clásicos de crioconservación.....	15
2.6.1.2. Métodos de vitrificación.....	16
2.6.1.2.1. <i>Deshidratación</i>	18
2.6.1.2.2. <i>Precultivo-Deshidratación</i>	18
2.6.1.2.3. <i>Encapsulamiento-deshidratación</i>	18
2.6.1.2.4. <i>Vitrificación</i>	19
2.6.1.2.5. <i>Encapsulación-vitrificación</i>	20
2.6.1.2.6. <i>Crio-lámina</i>	20
2.6.1.2.7. <i>Gota-vitrificación</i>	20

2.6.2.	Crioconservación de orquídeas.....	20
2.7.	Viabilidad de semillas de orquídeas	23
2.7.1.	Germinación asimbiótica	23
2.7.2.	Método de viabilidad por tinción con Tetrazolio.....	23
3.	JUSTIFICACIÓN.....	25
4.	OBJETIVOS	26
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1.	Material biológico.....	27
5.2.	Deshidratación de semillas	27
5.3.	Contenido de humedad	28
5.4.	Evaluación de la latencia en semillas de <i>L. speciosa</i>	28
5.5.	Evaluación de la viabilidad de las semillas a través del método de tinción con Cloruro de Trifenil Tetrazolio (CTT)	28
5.6.	Evaluación de la germinación asimbiótica de las semillas de <i>L. speciosa</i>	29
5.6.1.	Siembra y desinfección de las semillas	29
5.7.	Crioconservación de semillas de <i>L. speciosa</i>	30
5.7.1.	Adición de crioprotectores.....	30
5.7.2.	Almacenamiento en nitrógeno líquido (NL)	30
5.7.3.	Medición de la viabilidad por el método de CTT.	31
5.7.4.	Medición de la germinación.	31
5.8.	Análisis estadístico.....	31
6.	RESULTADOS Y DISUSIÓN.....	32
6.1.	Latencia secundaria de semillas de <i>Laelia speciosa</i>	32
6.1.1.	Análisis comparativo de la viabilidad por CTT y la germinación asimbiótica de semillas.....	35
6.2.	Crioconservación de semillas de <i>Laelia speciosa</i>	37
7.	CONCLUSIONES.....	41
8.	LITERATURA CITADA	42
9.	ANEXOS	55
9.1.	Anexo 1	55
9.2.	Anexo 2	56
9.3.	Anexo 3	57

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Análisis de varianza de la germinación prueba de viabilidad CTT en semillas de <i>Laelia speciosa</i> almacenadas a 25 y -196°C durante diferentes periodos.	33
Cuadro 2 Cuadrados medios del análisis de varianza del porcentaje de germinación y tinción en CTT, en semillas de <i>L. speciosa</i> crioconservadas con diferentes crioprotectores durante 1, 7, 20 y 40 días de almacenamiento en NL.	38
Cuadro 3 Efecto de los crioprotectores en la viabilidad con CTT y tasa de germinación en semillas crioconservadas de <i>L. speciosa</i> .	39

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Flor de <i>Laelia speciosa</i> (H. B. K.) Schltr.	4
Figura 2	Promedio de germinación \pm DE en semillas de <i>Laelia speciosa</i> durante su almacenamiento a 25 °C y -196 °C durante 0, 3, 6, 9 y 12 meses	35
Figura 3	Promedio de la viabilidad \pm DE en semillas de <i>Laelia speciosa</i> evaluada por el método de CTT en su almacenamiento a 25 °C y -196°C en 0, 3, 6, 9 y 12 meses.	35

RESUMEN

Laelia speciosa es una orquídea epífita endémica de México, sus poblaciones han disminuido considerablemente por colectas de plantas y deforestación de su hábitat. Se encuentra en la NOM-059-ECOL-2010 en categoría de Protección especial (Pr). Es una especie importante culturalmente hablando y su conservación *ex situ* es un factor clave para la subsistencia de esta especie. En el presente trabajo se analizó el comportamiento de latencia secundaria en semillas almacenadas a 25 y -196 °C, en evaluaciones trimestrales durante un año, además se evaluó el efecto de crioprotectores durante la crioconservación de semillas en un periodo de 40 días. Para conocer el efecto de las diferentes condiciones se realizaron pruebas de viabilidad por germinación y tinción a través del método de Cloruro Trifenil Tetrazolio (CTT). El análisis de latencia evaluado a través de los porcentajes de germinación obtenidos durante diferentes periodos de almacenamiento, usando los valores de ambas temperaturas (25 y -196 °C), registró diferencias significativas ($P < 0.0001$), se observó un patrón con alto porcentaje de germinación al inicio y a los 12 meses de almacenamiento (90.5 y 88.5, respectivamente) presentando valores bajos de a los 3,6 y 9 meses de 73.3 %, 58.4 % y 76.4 %, respectivamente. Estos valores contrastan en relación a los valores registrados en la prueba de CTT, donde no existió diferencias entre los cinco periodos evaluados y el valor más bajo de germinación registró 97.9 %. En relación al segundo objetivo, el uso de crioprotectores durante la crioconservación de semillas, fue altamente significativa ($P < 0.0001$) la interacción tiempo-tratamiento tanto en la viabilidad del CTT como

en la germinación asimbiótica. El control registró (sin la adición de crioprotectores) en el promedio de los cuatro tiempos, 98.6 % de viabilidad en CTT y 84 % en germinación, en relación al PVS2 con 89.8 % en CTT y 62.0 % en germinación, y al PVS3 con 68.5% en CTT y 49.9 % en germinación. En conclusión, las semillas de *L. speciosa* expresan latencia secundaria en los 3, 6 y 9 meses. Los crioprotectores registraron daño en la viabilidad de las semillas crioconservadas. Los valores bajos en el porcentaje de germinación en relación a los porcentajes de tinción con CTT deben estar relacionados a que la especie registra latencia secundaria.

Palabras claves: *Laelia speciosa*, Latencia, Crioconservación, Viabilidad, Crioprotectores.

SUMMARY

Laelia speciosa is an epiphyte endemic orchid of Mexico, their populations have decreased considerably by collections of plants and deforestation of its habitat. Is located in the NOM-059-ECOL-2010 in category of protection special (Pr). It is a species culturally speaking and conservation *ex situ* is a key factor for the survival of this species. This work analyzed the behavior of secondary dormancy in seeds stored at - 196 and 25 °C in quarterly evaluations a one year, also evaluated the effect of cryoprotectants during cryopreservation of seeds over a period of 40 days. To know the effect of the different conditions tested on the viability of sedes by germination and staining through the method of Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC). The analysis of dormancy evaluated through them percentages of germination obtained during different periods of storage, recorded significant differences ($P < 0.0001$), has observed a pattern with high percentage of germination at baseline and to the 12 months of storage (90.5 and 88.5 %, respectively), presenting a low values the 3, 6 and 9 months of 73.3%, 58.4% and 76.4%, respectively. These values contrast in relation to the values recorded in the TTC test, where there were not differences between the five periods evaluated and the lowest germination value was 97.9%. In relation to the second objective, the use of cryoprotectants during the cryopreservation of sedes, was highly significant ($P < 0.0001$) the time-treatment interaction in both TTC viability and asimbytic germination. In conclusion, seeds of *L. speciosa* express secondary dormancy at 3, 6 and 9 months. Cryoprotectants recorded damage to the viability of cryopreserved seeds. The low values in the percentage of germination in relation

to the percentages of staining with TTC must be related to that the species registers secondary dormancy.

Key words: *Laelia speciosa*, dormancy, cryopreservation, viability, cryoprotectants.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Orchidaceae se encuentra el género *Laelia* que es endémico de América donde tiene una amplia distribución que va desde México hasta Brasil (Rzendowski y Calderón, 2005). En México este género es considerado uno de los más importantes por producir unas de las flores más bellas y sobresalientes de la flora del país, que han sido utilizadas tradicionalmente por el pueblo mexicano con fines ornamentales y culturales (Halbinger y Soto, 1997). Dentro de este grupo encontramos a *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr., especie epífita cuyas poblaciones naturales han registrado una notable disminución por la colecta ilegal de sus individuos y por la deforestación de los bosques que constituyen sus hábitats naturales (Santos *et al.*, 2006), esta problemática la ha convertido en una especie vulnerable que se encuentra en la NOM-059-ECOL-2010, en la categoría de Protección especial (Pr) (SEMARNAT, 2010) y en el Apéndice II del CITES (CITES, 2017).

La conservación de las especies vegetales debería ser una prioridad, porque la extinción silenciosa derivada en la disminución o pérdida de la variación genética y con ello una alta incidencia de endogamia, situación que en un futuro cercano podría impedir su conservación y establecimiento en su ambiente nativo (Heywood y Dulloo, 2005). La conservación *in situ* es el sistema más recomendado, debido a que la especie se mantiene en continua interacción con su medio y los organismos con los que se relaciona. Sin embargo, en los casos

donde no es posible controlar las diversas actividades antropogénicas, la conservación *ex situ* es una buena estrategia de conservación (Maxted *et al.*, 2013).

Los bancos de germoplasma *ex situ*, de semillas ortodoxas, son una alternativa viable a considerar porque se puede preservar una alta variación genética y son fáciles de manejar con inversiones bajas y requieren de espacios reducidos por lo que han sido una herramienta exitosa para la conservación de algunas especies de orquídeas y otros grupos de plantas (Vendrame *et al.*, 2014; Popova *et al.*, 2016). Además, las semillas ortodoxas pueden soportar deshidratación por debajo de cuatro por ciento de humedad (Baccheta *et al.*, 2008; Volis y Blecher, 2010) y temperaturas de -196°C y un tiempo de hasta por cientos de años de almacenamiento (Popova *et al.*, 2016). Los métodos criogénicos han sido establecidos con éxito desde hace aproximadamente 50 años, lo que garantiza la conservación a largo plazo del germoplasma de especies en peligro de extinción, principalmente a temperaturas del nitrógeno líquido, -196°C (Cruz-Cruz *et al.*, 2013).

Muchas especies han experimentado cambios para poder sobrevivir en ambientes extremos o condiciones no óptimas, por lo que, a través de sus descendientes en forma de semillas manifiestan latencia, la cual, es la capacidad que presenta una semilla viable para no germinar durante un periodo de tiempo, aunque los factores físicos ambientales sean favorables para que ocurra la germinación (Baskin y Baskin, 2004). De acuerdo al tiempo en el que se presenta la latencia esta puede ser de dos tipos: (1) primaria, que se establece durante el

desarrollo y maduración de la semilla, y (2) secundaria, es caracterizada por presentarse en semillas maduras después de haber sido liberadas del fruto (Baskin y Baskin, 1980; Matilla, 2008). La latencia secundaria puede expresarse o no, y esto dependerá de que las condiciones para su germinación sean o no las adecuadas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

En trabajos anteriores semillas de *L. speciosa* han mostrado durante evaluaciones periódicas que bajo condiciones de almacenamiento registran descenso en el porcentaje de germinación durante su conservación (Cornejo-Gallegos, 2002; Durán-Mendoza, 2014), sin tener al momento una explicación clara de este comportamiento. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la latencia y viabilidad en semillas de *Laelia speciosa* durante su conservación a 25 y -196°C, evaluados a través de la germinación asimbiótica y prueba de tinción con cloruro de tetrazolio y evaluar el efecto de los crioprotectores en semillas crioconservadas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Características de la especie de estudio.

2.1.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *L. speciosa* según Dressler, 1982.

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Laeliinae

Género: *Laelia*

Especie: *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr.



Figura 1. Flor de *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr.

2.1.2. Descripción botánica de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. 1914.

(Tomado de Halbinger y Soto, 1997).

Es una planta epífita perenne de afinidad xerófila, presenta un rizoma con crecimiento horizontal ligeramente ascendente con relación al sustrato. Sus pseudobulbos son de globosos a ovoides, de color verde claro, cuya superficie es rugosa cuando son viejos, miden de 3-6 cm de largo y 1.5-4 cm de grosor, estrechamente agrupados, con una hoja terminal, rígida, raramente dos por pseudobulbo, lanceoladas elípticas, suculentas, verdes, en ocasiones teñidas de púrpura, ligeramente carnosas coriáceas, permanecen menos de 3 años, amplexicaules en la base, de 7.5-16 cm de longitud y 23.5 mm de ancho. La inflorescencia terminal es producida en el brote en desarrollo, racimosa, de 15-25 cm de largo, con 1-2 raramente hasta 4 flores muy grandes y vistosas que miden de 10-16 cm de diámetro, muy abiertas con pétalos y sépalos de mismo tamaño, teñidos de color rosa o rosa púrpura, raramente son totalmente blancos, son lanceolados, agudos, de 5.5-8.5 cm de largo por 1-2 cm de ancho; labelo blanco con los márgenes frecuentemente coloreados con manchas y rayas púrpura variables que va de lila claro hasta oscuro, trilobado de 4-7 cm de largo por 3-5 cm de ancho, lóbulos laterales oblongos, erectos, formando una garganta que rodea a la columna, con márgenes reflexos; los pétalos elíptico-rómbicos, agudos a subagudos, con margen ligeramente irregular frecuentemente recurvados, de 6-9 mm de largo por 7-9 mm de ancho. Clinandrio con una protuberancia en el margen superior. Antera ovoide subcuadrada, 8-locular, de 5-6 mm de largo. Polinario con 8 polinios lateralmente comprimidos, triangular, subcuadrado, unidos

a caudículas granulosas. El Róstelo está formado por una lámina transversal de 4 mm de ancho. Cavidad estigmática viscosa, brillante, de 5 mm de largo. Cápsula elipsoide, de 6 cm de largo y 2.5 cm de grosor.

Las flores tienen una tenue fragancia semejante a violetas. Al igual que muchas otras orquídeas epífitas, esta especie tiene un período de crecimiento activo durante la temporada lluviosa de junio a octubre y un periodo de reposo el resto del año (Halbinger y Soto, 1997).

La floración se presenta principalmente en mayo y junio, con el racimo emergiendo del nuevo brote en desarrollo (Halbinger y Soto, 1997). Las cápsulas tardan en madurar aproximadamente un año y las semillas se dispersan durante la temporada de secas en marzo y abril (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007).

2.1.3. Distribución y hábitat de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. (Tomado de Halbinger y Soto, 1997).

La distribución geográfica se encuentra restringida a algunas zonas de la sierra madre occidental y oriental, no presenta distribución continua, la zona más continua de distribución es la región lacustre de los estados de Michoacán, Guanajuato y Jalisco. También se han reportado poblaciones en los estados de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas.

L. speciosa se ha encontrado casi siempre en encinares achaparrados y abiertos de *Quercus deserticola*, frecuentemente monoespecíficos. Ocasionalmente se le localiza en bosques con otras especies arbóreas

mezcladas, principalmente encinos (*Q. laeta*, *Q. rugosa*), enebros y pinos. Existen reportes de su presencia en matorrales xerófilos con *Yucca*. Los bosques donde se establece son notoriamente deciduos y es probable que esta especie, que florece cuando el bosque está sin hojas, dependa de estos bosques deciduos para que sus flores sean muy visibles a los polinizadores (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007).

2.1.4. Nombres comunes y sinonimias

2.1.4.1. Nombres comunes

La orquídea *L. speciosa* es conocida comúnmente como: Flor de mayo, flor grande, flor de Corpus, tlacuxóchitl, deantzá en la lengua Purépecha, itzámahua (Purépecha), y chichiltictepetzacuxóchitl en lengua Náhuatl (Halbiger y Soto, 1997).

2.1.4.2. Sinonimias

Como sinonimias se encuentran *Bletia speciosa* H. B. K. 1816, *Bletia grandiflora* (Llave & Lex). 1825 *Laelia grandiflora* (Llave & Lex.) Lindl., 1831, *Laelia grandiflora* var. *alba* Dimmock. 1901, *Catleya grahamii* Lind. 1831, *Laelia majalis*, Lindl. 1840, *Catleya majalis* (Lindl.) Beer. 1854, *Laelia majalis alba* Hort, 1906 (Halbiger y Soto, 1997).

2.1.5. Usos y estatus de *L. speciosa*

Las flores de *L. speciosa* tienen un valor cultural importante en México, son utilizadas en celebraciones religiosas como día de “Corpus” y el día de las madres.

La venta ornamental en enormes cantidades de plantas completas son objeto de ventas ilegales en las calles y mercados de México (Halbinger y Soto, 1997; Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007).

Como la mayoría de las orquídeas en el país se encuentra en categoría de protección especial (Pr) en la NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010) y en el Apéndice II de la CITES (CITES, 2017).

2.2. Latencia de semillas

La latencia, “dormancia” o letargo es la incapacidad de una semilla para germinar durante un periodo específico de tiempo, es debido a procesos evolutivos y que sucede con la finalidad de: servir como mecanismo de supervivencia y/o adaptación frente a ciertas condiciones ambientales (Temperatura, luz o potencial hídrico) poco favorables (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La latencia puede ser de tipo primaria o secundaria, esto va a depender de la capacidad germinativa de una semilla (Matilla, 2008). La latencia primaria o innata se desarrolla durante la maduración de la semilla en la planta madre, existen diversos factores responsables de esta latencia, la cual pueden ser: exógenos, endógenos y combinados (Hartmann y Kester, 1988).

Las semillas que presentan la latencia exógena retrasan su germinación debido a ciertas propiedades físicas, químicas y mecánicas presentes en las cubiertas seminales causada por mecanismos como: la impermeabilidad al agua, impermeabilidad al intercambio de gases, resistencia mecánica o a la presencia de algunos inhibidores que se encuentran en las cubiertas (Hartmann y Kester, 1988).

La latencia endógena es determinada por las características anatómicas, morfológicas y fisiológicas del propio embrión (latencia embrionaria). En este caso, el embrión es durmiente en sí mismo, y es incapaz de germinar incluso si es aislado de la semilla y colocado en condiciones favorables (Hartmann y Kester, 1988). La latencia endógena se clasifica en: Latencia morfológica, latencia fisiológica y latencia morfofisiológica (Baskin y Baskin, 2004). La *latencia morfológica* se presenta en semillas que no han desarrollado por completo el embrión, pueden ser embriones rudimentarios o embriones subdesarrollados o no desarrollados (Varela y Aranda, 2004). La *Latencia fisiológica*, se presenta en el interior de los tejidos debido a mecanismos fisiológicos inhibidores que impiden la germinación, dividiéndose en tres niveles: (A) superficial, la germinación es impedida por mecanismos fisiológicos inhibidores, por ejemplo, el ácido giberélico no promueve la germinación, (B) intermedia, se induce en las cubiertas de las semillas y los tejidos de almacenamiento circundantes y se requiere de un periodo de 2-3 meses en frío para romper la latencia, y (C) profunda, el embrión está incapacitado para poder germinar, y para que esto suceda se requiere de un periodo de enfriamiento (Baskin y Baskin, 2004; Varela y Aranda, 2004; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). *Latencia morfofisiológica*, es la combinación de la latencia morfológica y fisiológica, y en semillas con este tipo de latencia el embrión requiere un periodo de tiempo para poderse desarrollar (Baskin y Baskin, 2004). Esta latencia sólo podría eliminarse cuando existan factores que puedan provocar cambios en las características anteriores, tales como la estratificación a ciertas temperaturas, condiciones de iluminación, administración de sustancias de crecimiento, etc. (Varela y Arana, 2011; Ruíz, 2014).

Las semillas de algunas especies registran patrones de latencia secundaria, que es inducida cuando las semillas han sido separadas de la planta madre, y no reciben las señales necesarias para germinar, vinculando este comportamiento a condiciones ambientales desfavorables como la temperatura y el potencial hídrico que son factores determinantes para que las semillas germinen en el carácter de un ciclo anual de la latencia secundaria (Matilla, 2008).

2.2.1. Latencia en orquídeas

Las semillas de las orquídeas para poder germinar requieren principalmente de la simbiosis que establecen con un hongo, sin embargo, existen otros factores que determinan la geminación de las semillas y que se vinculan con la latencia (Rasmussen, 1995). Las semillas de las orquídeas cuentan con un espesor de una sola célula y carecen de una capa empalizada impermeable al agua que es una característica principal de la latencia fisiológica (Kaut *et al*, 2008), pero debido a que el embrión no tiene suficiente potencial de crecimiento para romper la testa se produce una inhibición de la germinación (Kaut *et al.*, 2008). Un factor determinante en la latencia fisiológica en las semillas de las orquídeas es la temperatura y ocurre principalmente en especies epifitas de regiones templadas, esto deriva en que las semillas solo germinan hasta la estación apropiada cuando el hongo simbionte está activo (Baskin y Baskin, 1998). La latencia morfológica es difícil de caracterizar en semillas de orquídeas ya que existe un amplio desarrollo del embrión antes de la ruptura de la testa (Kaut *et al.*, 2008), pero cuando no hay un desarrollo morfológico en el embrión en las semillas la germinación es retrasada se dice que existe una latencia morfológica (Baskin y Baskin, 1998).

2.3. Conservación de recursos fitogenéticos

Los recursos fitogenéticos comprenden la diversidad genética de origen vegetal, y tienen un valor incalculable por su uso real o potencial para la alimentación, la agricultura, el uso ornamental, medicinal y forestal (FAO, 2010); sin embargo, su pérdida es un proceso irreversible que amenaza la estabilidad de los ecosistemas (Douma *et al*, 2016), por lo que la conservación de esta diversidad vegetal es esencial para el bienestar presente y futuro de la humanidad (Rao y Hodgkin, 2002).

Para la conservación y protección de los recursos fitogenéticos existen las estrategias de conservación *in situ* y *ex situ* estas dos modalidades son complementarias y no se excluyen (Volis y Blecher, 2010). Permiten garantizar la conservación del patrimonio genético de las especies y sus poblaciones (Raven, 2013) a través de la selección de la mejor estrategia tomando en cuenta la naturaleza de las especies para su protección (Cruz-Cruz *et al.*, 2013).

La conservación *in situ* implica una adecuada protección y gestión de las especies dentro de sus ecosistemas naturales (Nyadanu *et al.*, 2016), de manera que se pueden preservar los procesos ecológicos y evolutivos que ocurren dentro del hábitat, esta estrategia es importante para proteger las especies silvestres y mantener sus poblaciones (Hammer y Teklu, 2008). Para salvaguardar y conservar cada uno de los componentes del ecosistema, se han establecido áreas naturales protegidas como los parques nacionales y las reservas ecológicas, sin embargo, dentro de estos espacios naturales o en áreas aledañas se llevan a cabo diferentes actividades humanas que afectan la biodiversidad y no garantizan su

protección (Heywood y Duloo, 2005) por lo que esta medida de protección no es suficiente, debido a que en las áreas naturales protegidas se puede observar una continua destrucción y transformación de los hábitats derivada de diversos factores antropogénicos o ambientales que han reducido considerablemente las poblaciones naturales (Cruz-Cruz *et al.*, 2013).

Cuando la conservación *in situ* es difícil de realizar, la conservación *ex situ* constituye una herramienta esencial y posiblemente una última alternativa para conservar plantas en peligro de extinción fuera de sus hábitats naturales (Raven, 2013). Existen diversas estrategias *ex situ* para la conservación de los recursos fitogenéticos como los jardines botánicos, viveros, colecciones de campo (Bacchetta *et al.*, 2008), bancos de semillas, polen y almacenamiento de tejidos (Volis y Blecher, 2010) que constituyen fuentes de material vegetal utilizado para la recuperación de especies amenazadas o en peligro de extinción, rehabilitación y restauración del hábitat, mejoramiento de cultivos, desarrollo de nuevos productos y una amplia variedad de estudios de investigación (Maunder *et al.*, 2004).

2.4. Clasificación de semillas

Para una adecuada conservación de semillas, es muy importante tener en cuenta el tipo y de semillas que se quieren preservar. Las clasificaciones de las semillas dependen de la tolerancia a la pérdida de humedad, las semillas se clasifican en ortodoxas y recalcitrantes (McDonald, 2004); las ortodoxas son tolerantes a la desecación (Kelamba y Pukacka, 2012; Berjak y Pammenter, 2013), conservan su viabilidad por largo tiempo con bajos contenidos de humedad

(3-5 %) manteniendo su longevidad por largo tiempo y reduciendo su actividad metabólica (De Viana, *et al.*, 2009). Según Harrington (1963) por cada 1 % de reducción en el contenido de humedad y por cada disminución de 5 °C en la temperatura, se duplica la vida de la semilla durante su almacenamiento.

Las semillas recalcitrantes son de vida corta, no son tolerantes a la desecación ni al almacenamiento a bajas temperaturas (Walters *et al.*, 2013) debido a que se caracterizan por presentar un alto contenido de humedad (40-80 % de agua) (McDonald, 2004). La mayoría de las semillas recalcitrantes pierden su viabilidad una vez que se secan por debajo de su valor crítico (40 % de humedad) (Delahaie *et al.*, 2013), pero la sensibilidad a la desecación diferencial entre las semillas recalcitrantes de varias especies demuestra diferentes respuestas al régimen del secado, y algunas especies toleran un ligero grado de deshidratación (Pammenter y Berjak, 2013).

2.5. Conservación *ex situ* de semillas de orquídeas

La familia de las orquídeas presenta una gran diversidad de especies, se estima que existen entre 20,000 y 30,000 especies distribuyéndose alrededor del mundo con excepción de la Antártida, registrando una mayor diversidad en los trópicos (Hágsater *et al.*, 2005). A pesar de su gran diversidad, las orquídeas están sujetas a diferentes amenazas dentro de su hábitat entre las que se encuentran la colecta ilegal y la pérdida y fragmentación de su hábitat natural por el cambio de uso de suelo y el cambio climático (Seaton *et al.*, 2013; Vendrame *et al.*, 2014), ocasionando que las poblaciones naturales disminuyan drásticamente.

El manejo de semillas y la propagación de orquídeas se remonta a principios del siglo pasado estas actividades han permitido desarrollar estrategias de conservación *ex situ*, como el almacenamiento en bancos de semillas y el cultivo *in vitro* (Seaton y Pritchard, 2011; Popova *et al.*, 2016). Los bancos de semillas *ex situ* han mostrado ser un sistema de conservación eficaz y viable para las orquídeas que asegura la conservación de la diversidad genética y facilitando la supervivencia de las semillas en condiciones adecuadas (Seaton *et al.*, 2013). Para que las semillas almacenadas no pierdan su viabilidad y ésta se prolongue existen dos factores determinantes, disminución de la temperatura de almacenamiento y de la humedad de las semillas (Shoushtari *et al.*, 1994). Los contenidos de humedad por arriba del 15 % (Robert, 1972) y el almacenamiento en temperaturas altas a partir 20 °C afecta la viabilidad de las semillas (Pritchard y Seaton, 1993). La mayoría de las semillas de orquídeas tienen un comportamiento ortodoxo (Neto y Custódio, 2005) soportan niveles bajos de humedad (< 6 %) y temperatura (< 4° C) (Seaton *et al.*, 2013).

2.6. Crioconservación

La crioconservación es una estrategia de conservación *ex situ* de especies vegetales a través de tejido somático y por semilla (Engelmann, 2011), se define como el almacenamiento del material biológico a temperaturas ultra-bajas a partir de -130 °C (Engelmann, 2011; Popova *et al.*, 2016) aunque comúnmente la temperatura almacenamiento más utilizada es a -196 °C , condición proporcionada por el nitrógeno líquido (NL), porque detiene la división celular y algunas actividades metabólicas (Panis y Lambardi, 2005). Para este método se ha

reportado el uso de células, protoplastos, ápices, embriones somáticos, embriones cigóticos y semillas principalmente semillas ortodoxas (Rao, 2004; Engelmann, 2011). El proceso de crioconservación es rápido, sencillo, no altera la estabilidad genética del material y conservando por periodos ilimitados de tiempo y reduce sustancialmente el esfuerzo que representan el mantenimiento de colecciones de germoplasma vegetal *in vivo* o *in vitro* (Pritchard y Nadarajan, 2008), al eliminar casi por completo la mano de obra y evitar los riesgos fitopatológicos y fisiológicos que habitualmente aparecen en el mantenimiento de los bancos de germoplasma vegetales (Engelmann, 2011).

2.6.1. Técnicas de crioconservación

Las técnicas empleadas para la crioconservación difieren en sus mecanismos físicos; los hay de crioconservación clásicos y los basados en la vitrificación (Cruz-Cruz *et al.*, 2013).

2.6.1.1. Métodos clásicos de crioconservación

Estos métodos consisten en un proceso de congelación y deshidratación lenta el cual puede ser mediante congeladores programables, seguido por una inmersión rápida en NL. Durante el descenso lento de la temperatura la formación del hielo se genera en la zona extracelular, la cristalización externa promueve el flujo de salida de agua desde el citoplasma y vacuolas hacia el exterior de las células, donde finalmente se congelan (Engelmann, 2011), la membrana actúa como una barrera física evitando que los cristales de hielo entren al interior de la célula (Vendrame *et al.*, 2014). Por lo tanto, la deshidratación de células

dependerá del pre-enfriamiento establecido antes de la inmersión en el NL. Los métodos clásicos consisten en varias etapas: en el pretratamiento del material con sustancias crioprotectoras, seguido por un congelamiento lento y controlando (aproximadamente 0.1 a 24.0 °C/min) (Rao, 2004; Engelmann 2011), el descenso debe ser lento hasta llegar a los -40 °C, para después sumergirse en NL. Este procedimiento ha resultado más eficiente con unidades pequeñas de morfología uniforme como protoplastos, células en suspensión y callos, y menos eficiente con unidades mayores como embriones cigóticos, embriones somáticos y brotes (Abdelnour y Alvarado-Ulloa, 2013).

2.6.1.2. Métodos de vitrificación

Los procedimientos basados en la vitrificación implican eliminar de la mayor parte del agua congelable en las células mediante la deshidratación osmótica por agentes crioprotectores, seguido por un enfriamiento rápido (Engelmann, 2001; Rao, 2004), es el resultado de la vitrificación definida como la transición vítrea de la solidificación de un líquido a un sólido amorfo (Fahy *et al*, 1984). Estos procedimientos son apropiados para los órganos complejos como los meristemas apicales y los embriones, que contienen una gran variedad de tipos de células que presentan requerimientos específicos. Al excluir el uso de un régimen de enfriamiento lento, los procedimientos basados en la vitrificación son operativamente más sencillos que los clásicos y tienen, por consiguiente, un mayor potencial de uso, y solo requieren pequeñas modificaciones para los diferentes tipos de células donde se necesitan de soluciones crioprotectoras, que

inhiben la nucleación e iniciación del hielo a temperaturas bajas (Engelmann y González-Arno, 2013).

La clave de éxito en los procedimientos de vitrificación implica la deshidratación con mezclas de las sustancias clasificadas como crioprotectoras, que penetran las células para contribuir con en el equilibrio osmótico incrementando la viscosidad y reemplazando las moléculas de agua, estas sustancias ejercen un efecto protector que aumenta la osmolaridad celular disminuyendo el punto de congelación (Kim *et al.*, 2009). Las mezclas vitrificadoras para plantas son conocidas como PVS (por sus siglas en inglés: plant vitrification solutions), conformadas por sustancias como glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO), etilenglicol y la sacarosa (Engelmann y González-Arno, 2013). Entre estas mezclas se reportan el PVS2 (30 % de glicerol (w/v), 15 % Etilenglicol (w/v), 15 % dimetilsulfoxido (DMSO w/v) y 0.4 M sacarosa) designada por Sakai y col. en 1990 para la congelación de callos de cítricos, y el PVS3 (50 % de glicerol (w/v) y 50% de sacarosa (w / v)) descrito por Nishizawa *et al.* (1993) para la congelación de wasabi, espárragos y ápices de ajos (Kim *et al.*, 2009; Sakai *et al.*, 2008).

Existen diversos métodos a seguir para desarrollar la vitrificación los cuales han contribuido a la crioconservación exitosa de diversos tejidos en plantas: deshidratación, precultivo, precultivo-deshidratación, encapsulación-deshidratación, vitrificación, encapsulación-vitrificación, crio-lamina y gota-vitrificación (Cruz-Cruz *et al.*, 2013; Engelmann y González-Arno, 2013).

2.6.1.2.1. Deshidratación

Es el método más simple consiste en la deshidratación del explante y semillas, para después congelarlos por inmersión rápida en NL. La deshidratación generalmente se lleva a cabo en una cámara de flujo laminar con aire estéril o en sílica gel (Bajaj, 2013). Se utiliza principalmente con embriones cigóticos extraídos de semillas y es aplicado en gran número de especies recalcitrantes e intermedias. La supervivencia óptima obtenidas se presenta cuando las muestras se congelan con un contenido de agua entre el 10 y 20 % (Engelmann, 2011).

2.6.1.2.2. Precultivo-Deshidratación

Es la combinación del precultivo y la deshidratación, en este procedimiento el precultivo con crioprotectores va antes que la deshidratación y una inmersión rápida en NL, esta técnica es usada para la crioconservación de cultivos meristemáticos cultivos poliembriónicos, semillas pequeñas, embriones cigóticos o ejes embrionarios extraídos de las semillas (Cruz-Cruz *et al.*, 2013; Engelmann y González-Arno, 2013)

2.6.1.2.3. Encapsulamiento-deshidratación

Método basado en la tecnología desarrollada para la producción de semillas sintéticas, es decir, la encapsulación de los explantes en perlas de alginato de calcio, los explantes encapsulados son precultivados en medio líquido con alta concentración de sacarosa y parcialmente deshidratados en cámara de flujo

laminar o sílica gel, hasta alcanzar aproximadamente 20 % de agua, antes de la exposición en nitrógeno líquido (NL) (Bajaj, 2013).

Encapsular los explantes permite la exposición a los tratamientos extremos incluyendo el precultivo con altas concentraciones de sacarosa y la desecación a contenidos de humedad bajos que serían altamente dañinos o letales para muestras que no se han encapsulado. Debido a la extrema desecación de los explantes, la mayoría del agua congelable se elimina de las células, y la vitrificación de solutos internos se lleva a cabo durante la exposición rápida a NL, evitando así la cristalización de hielo intracelular letal (Engelmann, 1997). Este procedimiento es efectivo para la conservación de ápices de numerosas especies tropicales, células en suspensión y embriones somáticos (Engelmann, 2011).

2.6.1.2.4. Vitrificación

Esta técnica consiste en un procedimiento breve, el cual se denomina “tratamiento de carga” en donde se utiliza una mezcla de 0.4 M de sacarosa + 2 M de glicerol (González-Arno y Engelmann, 2013), seguido por la deshidratación con soluciones concentradas crioprotectoras (PVS), y congelamiento rápido en NL para alcanzar un estado de vitrificación de los solutos internos (Abdelnour y Alvarado-Ulloa, 2013), posteriormente se les da una descongelación y un lavado de los crioprotectores con una solución de sales minerales en un medio de cultivo y suplementado con 1.2 M de sacarosa (González-Arno y Engelmann, 2013). Esta técnica ha sido desarrollada para ápices, células en suspensión y embriones somáticos de diferentes especies (Cruz-Cruz *et al.*, 2013).

2.6.1.2.5. Encapsulación-vitrificación

Este método se desarrolló para tratar un gran número de especies subtropicales las cuales no respondían bien al uso de la encapsulación-deshidratación ni vitrificación por si solas (Sakai *et al.*, 2008). Es una combinación en el recubrimiento con alginato de calcio y la vitrificación. Proporciona ventajas de recuperación en comparación a la vitrificación o a la encapsulación por si solas (Scocchi y Rey, 2004).

2.6.1.2.6. Crio-lámina

Consiste en la encapsulación con una capa fina de alginato de calcio que se gelifica en una superficie de lámina de papel de aluminio inmovilizando los tejidos, seguido de una inmersión rápida en el NL (Engelmann y González-Arno, 2013).

2.6.1.2.7. Gota-vitrificación

Es un sistema reciente en crioconservación (Sakai y Engelmann, 2007), se ha aplicado con gran éxito en gran número de especies. Se utilizan principalmente en ápices que son tratados previamente con una solución vitrificadora, donde se colocan gota a gota en una lámina de aluminio y se congela rápidamente en NL (Engelmann, 2011).

2.6.2. Crioconservación de orquídeas

La crioconservación es un método adecuado para el almacenamiento a largo plazo de material genético en orquídeas, se han utilizado varios órganos de las plantas incluyendo embriones somáticos (Ishikawaa *et al.*, 1997) semillas

(Hirano *et al.*, 2009), protocormos (Thammasiri, 2008, Vendrame y Faria, 2011), polen (Vendrame *et al.*, 2008) y células suspendidas (Tsukazaki *et al.*, 2000).

Existen diferentes trabajos en crioconservación de semillas de orquídeas utilizando la técnica de deshidratación simple de semillas: Nikishina *et al.*, (2001) utilizaron esta técnica en las orquídeas tropicales: *Angraecum magdalenae*, *Trichopilia tortilis*, *Calanthe vestia*, *Calante corey*, *Encyclia cochleata* y en semillas híbridas de *Miltonia flavesvens x Brassia longissima* y después de un mes de almacenamiento en NL obtuvieron germinaciones de 80, 90, 69, 90, 100 y 100 %, respectivamente. En la especie terrestre *Bletilla formosa*, las semillas fueron deshidratadas en sílica gel y almacenadas en el nitrógeno líquido por 24 h, se registró 89.9 % de viabilidad por tinción con tetrazolio (CTT) y 76.8 % por el método de germinación, y por el método de vitrificación por 1 y 3 h con el crioprotector PVS2 con inmersión en nitrógeno líquido registraron un porcentaje de viabilidad de 58.1 y 62.4 %, respectivamente (Wu *et al.*, 2013). Hu *et al.*, (2013), almacenaron semillas en nitrógeno líquido de esta misma especie, en presencia de PVS2 registrando un 91 % de germinación al año de crioconservadas. Semillas de *Pheius tankervilleae* almacenadas en NL por el método de vitrificación durante un máximo de 12 meses registró 71 % de viabilidad por CTT y 61 % de germinación (Hirano *et al.*, 2009). Abdelnour y colaboradores (2013), crioconservaron semillas utilizando PVS2 y una inmersión en NL de 60 min, registraron germinaciones de 18.65 % en *Guarianthe skinneri*, 74% en *Sobralia* sp., 43.9% en *Warscewiczella discolor*, 0.27 % en *Epidendrum* sp. y 73.33 % en *Lycaste tricolor*. Surenaski *et al.* (2012) utilizaron el método de encapsulación-

deshidratación en semillas inmaduras de *Cyrtopodium hastchbachii* Pabst, y las sumergieron durante 120 min en NL obteniendo un 64 % de germinación.

En semillas maduras de híbridos de *Dendrobium*, por el método de vitrificación con PVS2 se obtuvieron germinaciones de 63.8% en Sena Red, 50.3% en Mini WRL, 51.2 % en Jacquelyn Thomas y 47.2 % en BFC Pink (Vendrame *et al.*, 2007). En semillas maduras de *Dendrobium* Swartz híbrido “Dong Yai” registró 79 % crioconservadas con PVS2 modificado con floriglucinol y 3.1 % en control sin presencia de crioprotectores (Galdiano *et al.*, 2012). En semillas crioconservadas de *Oncidium flexuosum* obtuvieron 91 % de germinación en el control (sin crioprotectores) y de 68 % en el PVS2 con 1 % de floriglucinol (Galdiano *et al.*, 2013).

En semillas de *Vanda coerulea* almacenadas en NL por 0 y 100 min por el método de vitrificación con PVS2 obtuvieron una germinación de 53% y 74 % respectivamente (Thammasiri y Soamkul, 2007). En *Vanda tricolor*, la germinación de las semillas criopreservadas aumentó rápidamente con el aumento del período de deshidratación y alcanzó un máximo de aproximadamente 13.6 % cuando se expuso a la solución de PVS2 durante 180 min y luego la germinación disminuyó a 7.9 % a los 210 min (Jitsopakul *et al.*, 2012). En semillas crioconservadas con un tiempo de exposición en PVS2, de 0 a 3 h, mostró un efecto positivo sobre la germinación y viabilidad de las semillas de *Coelogyne dayanum* (Hakim *et al.*, 2014).

2.7. Viabilidad de semillas de orquídeas

Existen diversos métodos para medir la viabilidad de las semillas de orquídeas y otras especies (Milošević *et al.*, 2010), pero los más utilizados son: los métodos de germinación asimbiótica y tinción con tetrazolio.

2.7.1. Germinación asimbiótica

La germinación de semillas en estado silvestre tiene algunas limitaciones como la poca reserva de nutrientes por lo cual, es necesario que se establezcan asociaciones simbióticas con micorrizas (Arditti, 2008). Noël Bernard (1904) descubrió la necesidad del establecimiento de una asociación de simbiosis de las semillas con un hongo para que ocurra su germinación (Selosse *et al.*, 2011), pero en 1922 Lewis Knudson desarrolló una técnica de germinación asimbiótica *in vitro* en semillas de orquídeas mediante la adición de azúcar y minerales al medio de cultivo (Mc Kendrick, 2000). La germinación asimbiótica representa un sistema ideal para estudiar la viabilidad de semillas, el crecimiento y desarrollo plántulas de orquídeas (Kauth *et al.*, 2008).

2.7.2. Método de viabilidad por tinción con Tetrazolio

El método de viabilidad por tetrazolio es una reacción bioquímica que diferencia las semillas vivas de las muertas basándose en la actividad de las enzimas respiratorias en las semillas. Tras la hidratación de la semilla, la actividad de las enzimas deshidrogenasas aumenta, dando como resultado la liberación de iones hidrógeno, lo que reduce la solución de sal de tetrazolio incoloro (cloruro de

2,3,5-trifenil tetrazolio) en un compuesto químico llamado formazan que tiñe las células vivas con un color rojo mientras que las células muertas permanecen incoloras (Milošević *et al.*, 2010). La viabilidad de las semillas se interpreta de acuerdo con el patrón de tinción de los tejidos de la semilla. a través de reducción en las células vivas al tomar el hidrogeno liberado por las enzimas deshidrogenasas formando una sustancia roja que tiñe las células vivas (ISTA, 1996). La tinción es utilizada con mayor frecuencia que el conteo de germinación, porque es un método más directo para medir la viabilidad (Milošević *et al.*, 2010). Este método de tinción es utilizado en semillas de orquídeas para determinar el porcentaje de semillas con embriones viables (Hasomi *et al.*, 2011; Lallana y García, 2013), y es reconocido por International Seed Testing Association (Hartman y Kester, 1983), algunas semillas de orquídea poseen algún tipo de latencia y la prueba de tetrazolio ayuda a determinar las semillas con embriones viables, aunque estos estén durmientes (Rasmussen, 1995).

3. JUSTIFICACIÓN

Laelia speciosa (Orquídea) endémica y en peligro de extinción, ubicada bajo protección especial en la NOM 059, debido a la colecta de plantas silvestres y a la deforestación. Las semillas son una alternativa idónea para establecer líneas de conservación, sin embargo, por ser una especie poco estudiada es necesario investigar sobre su fisiología: germinación, viabilidad y latencia, además de aspectos de conservación: crioconservación, uso y efecto de los crioprotectores. Por lo anterior, el presente trabajo usó dos métodos de evaluación de viabilidad, método de Tetrazolio y el de germinación asimbiótica para conocer la latencia de semillas durante un año de conservación. También fue necesario conocer el efecto de los crioconservadores PVS2, PVS3 comparándolos con el control, en cuatro evaluaciones a lo largo de 40 días de conservación, ya que en repetidas ocasiones se reporta que los crioprotectores permiten mejorar la respuesta o soportar las bajas temperaturas, sin embargo, existen otros que indican que pueden ser tóxicos aun cuando están almacenados en nitrógeno líquido. El experimentar con la especie en cuestión puede permitir que un proceso de conservación tenga éxito o fracase con el transcurso del tiempo.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar si existe latencia secundaria en semillas de *L. speciosa* durante un año de almacenamiento a -196 y 25 °C, y evaluar la viabilidad en semillas crioconservadas (-196 °C) con y sin crioprotectores durante 40 días.

Objetivos particulares

- Evaluar la latencia secundaria en semillas de *Laelia speciosa* almacenadas por (0, 3, 6, 9 y 12 meses), bajo condiciones de dos temperaturas -196 y 25 °C a través de la prueba de viabilidad por el método de Cloruro Trifenil Tetrazolio (CTT) y germinación asimbiótica.
- Evaluar el efecto de los crioprotectores PVS2 y PVS3 en las semillas de *L. speciosa* almacenadas en nitrógeno líquido por 1, 7, 20 y 40 días, mediante pruebas de viabilidad por el método de tinción con CTT y germinación asimbiótica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Genética Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en la ciudad de Morelia Michoacán.

5.1. Material biológico

Para la obtención de semillas de *Laelia speciosa* se colectaron seis frutos de plantas diferentes y de polinización libre que estaban en poblaciones silvestres ubicadas en los alrededores del lago de Pátzcuaro, después se transportaron al laboratorio donde se procedió a la separación, limpieza, etiquetado, deshidratación y almacenamiento de semillas.

5.2. Deshidratación de semillas

Una vez obtenidas las semillas, se tomaron cuatro muestras al azar de 0.5 g para estimar el porcentaje de humedad, el resto de las semillas de cada fruto se separaron en dos unidades para iniciar la deshidratación dentro de un desecador con 500 g de sílica gel con indicador azul de ausencia de humedad y posteriormente almacenarse a 25 y -196 °C. Las semillas permanecieron en el desecador hasta alcanzar 4 % de humedad, siendo ésta valorada a través de la prueba de ISTA que se describe posteriormente.

5.3. Contenido de humedad

Las cuatro muestras de 0.5 g tomadas se deshidrataron dentro de un horno de secado (Marca, País), que se mantuvo a una temperatura de 104°C durante 24 h. El contenido de humedad de las semillas se calculó a través de la prueba de ISTA (ISTA, 2014), para la que se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100$$

5.4. Evaluación de la latencia en semillas de *L. speciosa*

La evaluación de la latencia se realizó a través de pruebas directas de germinación asimbiótica *in vitro* y de tinción con Cloruro de Trifenil Tetrazolio (CTT) donde se utilizaron las semillas que fueron previamente deshidratadas y almacenadas a 25 °C las pruebas se realizaron en los periodos de almacenamiento de 0, 3, 6, 9 y 12 meses y 3, 6, 9 y 12 meses para las de -196°C. Posteriormente se evaluó la viabilidad realizando.

5.5. Evaluación de la viabilidad de las semillas a través del método de tinción con Cloruro de Trifenil Tetrazolio (CTT)

La prueba de viabilidad realizada a través del método de tinción con CTT se aplicó por separado a muestras de semillas tomadas de los diferentes tratamientos de temperatura y almacenamiento previamente establecidos. Por cada muestra se adicionó una solución al 0.1% de CTT con dos gotas de Tween 20. Las semillas se

incubaron en la solución por 48 h a 25°C y oscuridad. Después de 48 h de cada fruto se separaron cinco submuestras de aproximadamente 100-200 semillas, y se colocaron en cajas de Petri independientes con papel milimétrico al fondo para poder contar las semillas teñidas y las no teñidas, las observaciones se hicieron con ayuda de un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss) a 2x.

5.6. Evaluación de la germinación asimbiótica de las semillas de *L. speciosa*

Para la evaluación de germinación asimbiótica *in vitro* de diferentes tratamientos de temperatura y periodo de almacenamiento se sembraron las semillas de cada uno de los frutos en cajas de Petri con medio ER (Arditti, 1982). Se realizaron cinco repeticiones por cada fruto, tiempo y temperatura de almacenamiento, haciendo un total de 45 muestras. Las cajas de Petri con semillas se incubaron con intensidad lumínica de 1,500 lux, temperatura de 25 °C y fotoperiodo de 16 h luz por un periodo de 30 días.

5.6.1. Siembra y desinfección de las semillas

Las semillas de *L. speciosa* se desinfectaron colocándolas dentro de un sobre de papel filtro que fue inmerso en una solución de 200 ml de hipoclorito de calcio al 3.5 % adicionada con dos gotas de Tween 20 durante 20 min, posteriormente, dentro de una campana de flujo laminar, las semillas se enjuagaron tres veces con agua estéril, y fueron sembradas en cajas de Petri (15 x 100 mm) estéril, con 30 ml de medio de cultivo ER (Anexo 1).

5.7. Crioconservación de semillas de *L. speciosa*.

Para la crioconservación las semillas fueron obtenidas a partir de una mezcla de cinco frutos dehiscentes, previamente deshidratadas al 4 % de humedad, utilizando aproximadamente 0.5 g de semilla por muestra y depositadas en su respectivo criovial de 2 ml. Los tratamientos utilizados para la crioconservación fueron: control (semillas únicamente deshidratadas en sílica gel sin crioprotector), PVS2 y PVS3 en diferentes días de almacenamiento (1, 7, 20, 40 días).

5.7.1. Adición de crioprotectores

A las semillas almacenadas con sustancias crioprotectoras se les adiciono 1.8 ml de solución osmoprotectora (glicerol 2M + sacarosa 0.4M) durante 20 min a 25 °C. Posteriormente la solución fue retirada y se adicionó la solución vitrificante correspondiente, PVS2 (Glicerol 30 % + Etilenglicol 15% + dimetilsulfoxido +0.4 M sacarosa) o PVS3 (Glicerol 50 % + sacarosa 50 % al 0.4 M) colocándose en hielo a 0 °C por 30 min.

5.7.2. Almacenamiento en nitrógeno líquido (NL)

Los crioviales con semillas de los tres tratamientos (Control, PVS2 y PVS3) se introdujeron por inmersión rápida en el NL, y permanecieron durante 1, 7, 20 y 40 días.

Una vez que pasó el tiempo correspondiente de almacenamiento en NL, los crioviales con semillas de los tratamientos PVS2 y PVS3 se descongelando en baño María a 40 °C por 3 minutos para poder retirar las soluciones crioprotectoras

y posteriormente se llevó a cabo el enjuague de las semillas con el medio líquido ER.

5.7.3. Medición de la viabilidad por el método de CTT.

De las semillas criocosevadas se tomaron cinco muestras por tratamiento y tiempo de almacenamiento para cuantificar la viabilidad por el método de CTT al 0.1 %, (5 muestras X 3 tratamientos X 4 tiempos = 60 muestras en total).

5.7.4. Medición de la germinación.

Para la medición de la germinación asimbiótica se tomaron muestras de las semillas crioconservadas y se sembraron en cajas de Petri con medio ER, realizando cinco repeticiones por tratamiento (Control, PVS2, PVS3) y tiempos de almacenamiento (1, 7, 20, 40 días) (5 muestras X 3 tratamientos X 4 tiempos = 60 muestras en total).

5.8. Análisis estadístico

En el análisis de las semillas almacenadas a 25 y -196° C evaluadas en los distintos tiempos a lo largo de 12 meses de almacenamiento y en la evaluación al uso y ausencia de crioprotectores en su almacenamiento en NL, los porcentajes de viabilidad por el método de CTT y germinación asimbiótica se transformaron arcsen para la realización de un análisis de varianza (ANOVA) factorial individualmente y con un diseño totalmente al azar. La separación de medias se registró a través de una prueba de Tukey al 95 % de confianza. Se usó el paquete estadístico SAS 9.1 (2006)

6. RESULTADOS Y DISUSIÓN

6.1. Latencia secundaria de semillas de *Laelia speciosa*

De acuerdo a un Análisis de Varianza donde se evaluó la viabilidad por método de tinción con CTT de las semillas de *L. speciosa*, durante su almacenamiento por 0, 3, 6 ,9 y 12 meses en 25 y -196 °C no registró diferencias significativas entre los periodos de tiempo de almacenamiento, las temperaturas y en la interacción de ambos factores. Mientras que para la germinación presentó diferencias significativas entre los periodos de tiempo de almacenamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis de varianza de la germinación prueba de viabilidad CTT en semillas de *Laelia speciosa* almacenadas a 25 y -196°C durante diferentes periodos.

Fuente	GL	Cuadrados medios	
		Germinación asimbiótica	Viabilidad CTT
Tiempo de almacenamiento	4	1.29 **	03.40 NS
Temperatura	1	0.01 NS	24.26 NS
Tiempo de almacenamiento/Temperatura	3	0.014 NS	04.30 NS

** < 0.0001

NS No significativo

El análisis de Tukey realizado entre los diferentes tiempos de almacenamiento mostró que para los tiempos de almacenamiento de 0 y 12 meses se registró un porcentaje de germinación de 90.5, y de 88.5, respectivamente, en ambas temperaturas evaluadas (25 y -196 °C), siendo estos valores superiores a los promedios registrados a 3, 6 y 9 meses, observando el mayor descenso significativo a los 6 meses con un promedio de 58.42 % de germinación de ambas temperaturas sin embargo (Figura. 2). Por lo tanto, los resultados registrados para la germinación asimbiótica en ambas temperaturas de almacenamiento no mostraron diferencia significativa (Anexo 2). El descenso del porcentaje de germinación entre los meses intermedios de un año en relación al momento de la dehiscencia y 12 meses de almacenamiento a través de la germinación asimbiótica ya había sido reportado para esta especie en temperaturas de almacenamiento de 6, -20 y -80 °C (Cornejo-Gallegos, 2002; Durán-Mendoza, 2014).

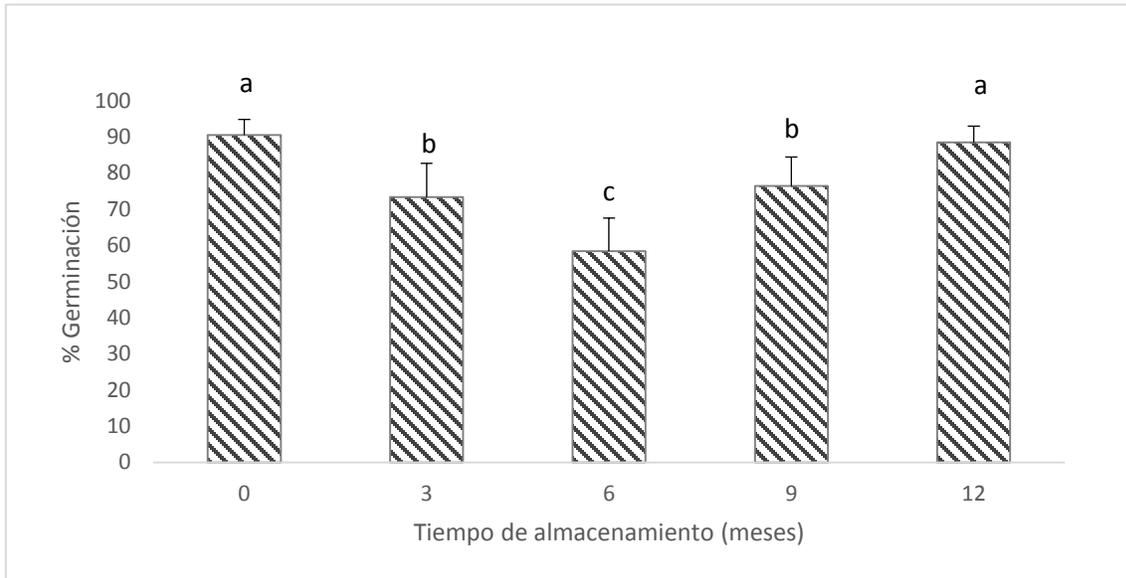


Figura 2. Promedio de germinación \pm DE en semillas de *Laelia speciosa* durante su almacenamiento a 25 °C y -196 °C durante 0, 3, 6, 9 y 12 meses.

*Letras iguales significan sin diferencia significativa con un 5% de confiabilidad por análisis de Tukey.
DE=desviación estándar

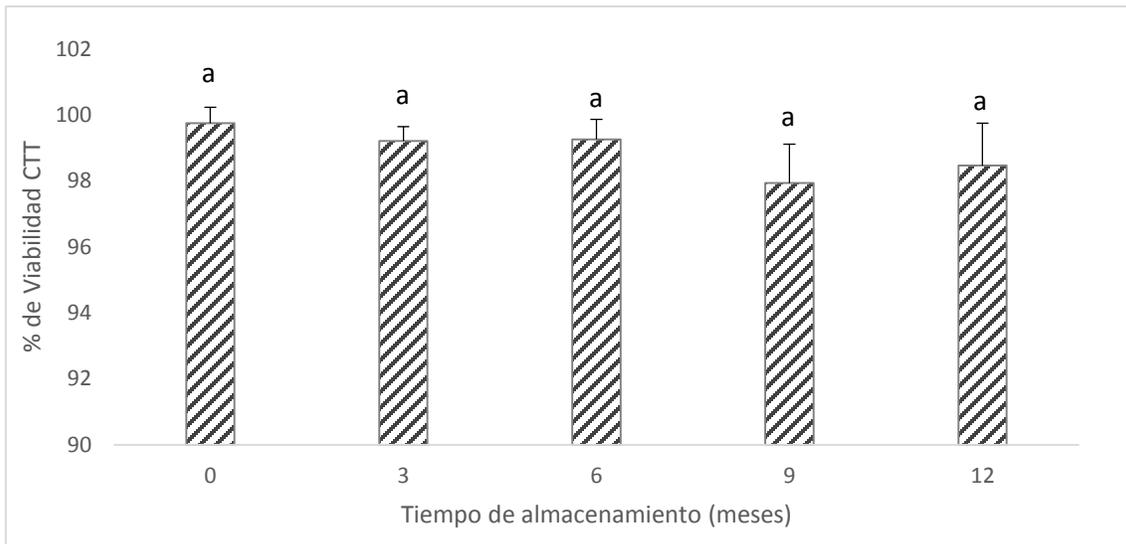


Figura 3. Promedio de la viabilidad \pm DE en semillas de *L. speciosa* evaluada por el método de CTT en su almacenamiento a 25 °C y -196°C en 0, 3, 6, 9 y 12 meses.

*Letras iguales sin diferencia significativa con un 5% de confiabilidad por análisis de Tukey
DE=desviación estándar

6.1.1. Análisis comparativo de la viabilidad por CTT y la germinación asimbiótica de semillas.

La respuesta registrada por ambos métodos; viabilidad por CTT y germinación asimbiótica muestran una clara diferencia en la variación en los porcentajes de germinación en relación a los valores constantes y altos por el método de tinción, lo cual permite distinguir entre semillas vivas mediante la coloración roja por una reacción de oxidación y reducción que realizan las células vivas (Poulsen *et al.*, 2006) y que al no germinar pueden estar mostrando un comportamiento de latencia secundaria en relación a lo registrado por el método de tinción (Figura.3). Hay que considerar que la prueba de CTT se ha utilizado con éxito para la evaluación de la viabilidad a través de la tinción de los embriones, correlacionando éstos con porcentajes de germinación después del almacenamiento (Singh, 1981; Shoushtari *et al.*, 1994). Comportamiento similar se reportó en semillas de *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae) almacenadas a 4 °C durante seis meses, registrando 69 % de viabilidad con el CTT, en relación a los 7.9 % en el proceso de germinación, donde atribuyeron la latencia secundaria a cambios fisiológicos como acumulación de sustancias inhibitoras (Hirano *et al.*, 2009). En semillas de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) donde la latencia secundaria la reportan en ciclos estacionales, la atribuyen a la relación ácido giberelico y ácido abscisico (Auge, *et al.*, 2015; Ibarra *et al.*, 2015).

En semillas de *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asteraceae) se registró latencia secundaria en observaciones *in situ* en ciclos anuales de verano (Baskin y Baskin, 1980), atribuyéndolo esto a la temperatura, la luz y, posiblemente el potencial hídrico del suelo entre los factores más importantes (Matilla, 2008). En relación a nuestra especie en estudio, las semillas de *L. speciosa* muestran una latencia secundaria bajo condiciones controladas, en dos lotes de temperatura (25 y -196°C) y 4% de humedad dentro de las semillas, factores que permanecieron constantes y no afectó su viabilidad al finalizar el año, la activación de la latencia puede estarse dando desde inicio de la colecta y su proceso de deshidratación hasta antes de su almacenamiento, con la posible activación de los fitocromos responsables en regular la germinación de las semillas cuando las condiciones naturales no son adversas (Fankhauser, 2001). Este fenómeno que no se ha estudiado en ciclos de un año y que puede ser un comportamiento innato de esta y otras especies al permanecer latente si las condiciones de germinación no son las idóneas. En su ambiente *L. speciosa* se caracteriza por ser de condición xerófila y que las semillas se liberan al inicio de las lluvias, con un descenso de la temperatura y la humedad en el periodo invernal (Halbinger y Soto 1997).

Los resultados se fortalecen con los trabajos previos en esta misma especie, en relación al comportamiento similar sobre el descenso del porcentaje de germinación en los meses 3 a 9 meses en semillas almacenadas a 25, 6, -20 y -80 °C (Cornejo-Gallegos, 2002; Durán-Mendoza, 2014).

6.2. Crioconservación de semillas de *Laelia speciosa*

En las semillas crioconservadas de *L. speciosa* el tiempo de almacenamiento, el tipo de crioprotector y la interacción de ambos influyeron significativamente ($P < 0.0001$) en la viabilidad por CTT y germinación asimbiótica de semillas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza del porcentaje de germinación y tinción en CTT en semillas de *L. speciosa* crioconservadas con diferentes crioprotectores durante 1, 7, 20 y 40 días de almacenamiento en NL.

Fuente	G.L	Cuadrados medios	
		Viabilidad CTT	Germinación asimbiótica
Tiempo	3	0.04 **	0.37 **
Crioprotectores ^a	2	1.14 **	1.19 **
Tiempo/Crioprotectores	6	0.05 **	0.07 **

** < 0.0001

^a Tratamientos de almacenamiento (PVS2, PVS3 y Control)

Las semillas del tratamiento control registraron un 98.4 % de viabilidad con CTT para el día 1, estadísticamente similares a las almacenadas los días 7, 20 y 40 días, valores estadísticamente superiores a los tratamientos con solución crioprotectora (Cuadro 3). El uso del PVS2 mostró una reducción estadísticamente significativa de 88.3 % de viabilidad con CTT para el día 1 en comparación al control, sin diferencias entre los 7, 20 y 40 días de almacenamiento. Para las semillas que se les adicionó PVS3 registraron una reducción significativa de 39 % en la viabilidad del día 1 una en comparación con el día 40 encontrando

diferencias entre cada uno de los días de almacenamiento 1, 7, y 20 (Cuadro. 3, Anexo. 3).

Cuadro 3. Efecto de los crioprotectores en la viabilidad con CTT y tasa de germinación en semillas crioconservadas de *L. speciosa*.

Tratamiento	Almacenamiento (días)	Viabilidad (CTT %) ± d.e.	Germinación asimbiótica (%) ± d.e.
Control	1	98.4 ± 0.6 a	90.9 ± 4.2 a
	7	99.3 ± 0.4 a	76.9 ± 3.8 de
	20	98.5 ± 0.6 a	82.7 ± 6.0 ab
	40	98.8 ± 0.9 a	88.0 ± 4.5 ab
PVS2	1	88.3 ± 2.6 bc	72.8 ± 2.5 e
	7	92.0 ± 1.6 b	62.7 ± 7.2 f
	20	88.6 ± 2.2 bc	53.8 ± 2.7 gh
	40	90.2 ± 4.1 bc	58.8 ± 5.7 gh
PVS3	1	87.2 ± 1.0 c	79.9 ± 4.0 cd
	7	72.2 ± 2.3 d	45.9 ± 7.4 i
	20	66.3 ± 6.1 e	24.6 ± 1.9 j
	40	48.3 ± 6.1 f	49.1 ± 4.0 hi

^a CTT (Cloruro de Trifenil Tetrazolio)

d.e. = desviación estándar

Letras iguales dentro de la misma columna indican sin diferencia significativa con un 5% de confiabilidad por análisis de (Tukey. p=0.05).

Análisis individuales para Viabilidad con CTT y germinación asimbiótica.

El análisis independiente para ambos métodos, por germinación asimbiótica y viabilidad por CTT en el tratamiento control no registró diferencias entre el tiempo día 1 con 90.9% en germinación y 98.4 en CTT, en relación a la última evaluación hecha el día 40 con 88% en germinación y 98.8 % en CTT, sin embargo, es notable la diferencia de porcentajes entre ambos métodos (Cuadro 4) El uso del PVS2 registró una reducción en la germinación de 72.8 % el día 1 y descendió a 58.8 % a los 40 días y fue significativo en comparación con el control.

En relación al Método de viabilidad por CTT no registró diferencias entre el día 1 (88.3 %) y día 40 90.2%) (Cuadro 4). En relación al uso del crioprotector PVS3, por el método de germinación asimbiótica registró 79.9 % y por el de viabilidad 87.2% en el día 1, reduciéndose en ambos casos en el día 40 de conservación, hasta 49.1 % en germinación y a 48.3 en viabilidad por CTT (Cuadro 3).

Las sustancias crioprotectoras PVS2 y PVS3 registraron un efecto negativo en la viabilidad de las semillas de *L. speciosa* crioconservadas en diferentes tiempos (1, 7, 20 y 40 días), es necesario considerar que las sustancias crioprotectoras PVS son formulados para la vitrificación en la crioconservación de tejidos y órganos con el fin de evitar el enfriamiento de las células y la formación de cristales de hielo reduciendo el daño por desecación (Ozden-Tokatli *et al.*, 2007), sin embargo, debido a que las células son permeables al glicerol y dimetilsulfoxido de los crioprotectores (Pegg, 2007), la duración de la exposición prolongada en estas sustancias en las células vegetales puede ser crítica para su supervivencia, debido que en la deshidratación causan lesiones celulares por la toxicidad química, además de provocar estrés osmótico (Galdiano *et al.*, 2013). El PVS2 contiene dimetilsufoxido y glicerol, los cuales ejercen un efecto toxico químico y estrés osmótico en los embriones en semillas (Panis *et al.*, 2001). En semillas de *Vanda tricolor* crioconservadas por un periodo de 210 min en presencia de PVS2 registraron una disminución de 6.1 % germinación causada por la toxicidad por el tiempo de exposición al crioprotector (Jitsopakul *et al.*, 2012).

El crioprotector PVS3 ha mostrado menor toxicidad que el PVS2 y es utilizado en muestras grandes de tejidos o semillas que son sensibles al PVS2 (Kim *et al.*, 2009). Lo anterior difiere con los resultados del presente estudio donde el uso del PVS3 mostró mayor toxicidad que el PVS2, esto puede ser debidos a que el PVS3 presenta mayor porcentaje de glicerol, el cual en concentraciones altas y periodos prolongados de almacenamiento en NL ocasionan toxicidad en las células (Fahy, 1986; Volk y Walters, 2006).

En semillas de *Oncidium flexuosum* crioconservadas por 60 min en presencia de PVS2 registro un 41.5 % de germinación en comparación con el control que generó 91.4 % de germinación (Galdiano, *et al.*, 2013). Resultados similares se reportaron en semillas de *Bletilla striata*, registrando 78.7 % en presencia de PVS2, en relación al 98.7% reportado en ausencia de crioprotectores, después de tres días de crioconsevadas (Hirano *et al.*, 2005). En semillas de *Bletilla formosana*, el PVS2 también tuvo un efecto inhibitor al reportar 62.4 % de viabilidad, en relación al 91.8% reportado para el control, después de 3 h crioconsevadas en NL (Wu *et al.*, 2013).

7. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este trabajo de investigación nos permiten concluir que:

- Las semillas de *Laelia speciosa* registraron latencia secundaria, debido a que el método de viabilidad de CTT presentó valores mayores a 97 % en ambas temperaturas (25 y -196 °C) en los diferentes tiempos de almacenamiento (0, 3, 6, 9 y 12 meses), lo anterior contrasta con los valores significativamente menores obtenidos en el porcentaje de germinación en las evaluaciones intermedias de almacenamiento (3, 6 y 9 meses) en ambas temperaturas, mostrando que existe un efecto de latencia secundaria en las semillas de *L. speciosa*.
- Las semillas de *L. speciosa* criocosevadas sin sustancia crioprotectora presentaron mejores respuestas tanto en germinación como viabilidad con CTT.
- El almacenamiento de semillas de *L. speciosa* en tiempo prolongado con soluciones crioprotectora PVS2 y PVS3, afecta la viabilidad y germinación de las semillas durante su crioconservación.

8. LITERATURA CITADA

- Abedelnour E. A y C. Alvarado-Ulloa. 2013. Crioconservación de semillas y protocormos de especie de la familia Orchidaceae en peligro de extinción. Instituto Tecnológico de Costa Rica Vicerrectoría de Investigación y Extensión Dirección de Proyectos. 98 p.
- Arditti, J. 1982. Orchid biology, reviews and perspectives, II. Cornell University Press, Ithaca, New York
- Arditti, J. 2008. Micropropagation of Orchids, Second Edition, Volume I y II. Blackwell Publishing. 1523 pp.
- Auge, G. A., L. K. Blair, L. T Burghardt, J Coughlan, B Edwards, L. D. Leverett y Donohue, K. 2015. Secondary dormancy dynamics depends on primary dormancy status in *Arabidopsis thaliana*. Seed Science Research, 25(02), 230-246.
- Bacchetta G., A. Bueno-Sánchez, G. Fenu, B. Jiménez-Alfaro, E. Mattana, B. Piotto y M. Virevaire. 2008. Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias / La Caixa. 378 p.
- Bajaj, Y. P. S. 2013. Cryopreservation of plant germplasm I. Vol. 32. Springer Science & Business Media, 515 p.
- Baskin, J. M. y C. C. Baskin. 1980. Ecophysiology of secondary dormancy in seeds of *Ambrosia artemisiifolia*. Ecology, 61(3), 475-480.
- Baskin, C. C. y J. M. Baskin. 1998. Seeds: ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination. Academic Press. New York. 666 p.

- Baskin, J. M. y C. C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. 14, 1-163.
- Berjak, P., y N. W. Pammenter. 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in plant science*, 4, 478.
- CITES. 2017. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, Apéndices I, II y III. Consultado el 23 febrero 2017 en <https://cites.org/esp/app/appendices.php>
- Cornejo G. M. 2002. Preservación y germinación asimbiótica de *Laelia speciosa* (H. B. K) Schlechter. (Orchidaceaea) para su conservación. Tesis profesional. Facultad de Biología. UMSNH. Michoacán. México. 49 p.
- Cruz-Cruz, C. A., M. T. González-Arno y F. Engelmann. 2013. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*, 2(2), 73-95.
- Delahaie, J., M. Hundertmark, J. Bove, O. Leprince, H. Rogniaux y J. Buitink. 2013. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. *Journal of experimental botany*, 64(14), 4559-4573.
- De Viana, M.L., J. Mosciaro & M.N. Morandini. 2009. Tolerancia a la desecación de semillas de dos especies arbóreas nativas del Chaco (Salta, Argentina). *Revista Científica UDO Agrícola* 9: 590-594.
- Douma, C., K. Koutis, R. Thanopoulos, R. Tsigou, A. Galanidis y P. J. Bebeli. 2016. Diversity of agricultural plants on Lesbos island (Northeast Aegean, Greece) with emphasis on fruit trees. *Scientia Horticulturae*, 210, 65-84.

- Dressler L. R. 1982. *The Orchids, Natural History and Classification*. Harvard University Press 324 p.
- Durán M. E. 2014. Germinación asimbiótica, viabilidad de semillas y desarrollo de plántulas de *Laelia* spp (Orchidaceae) almacenadas para su conservación. Tesis profesional. Facultad de Biología. UMSNH. Michoacán. México. 44 p.
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40(5), 427-433.
- Engelmann, F. 1997. In vitro germplasm conservation. *Acta Hort.* 461, 41-48.
- Engelmann F. 2011. Used of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 47,5-16.
- Engelmann, F., y M. T. González-Arno. 2013. Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. En: Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe, 25-35.
- Fahy, G. M., D. Macfarlane. R., A. Angell. G. y H. T. Meriman. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21, 407-426.
- Fahy, G. M. 1986. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, 23(1), 1-13.
- Fankhauser, C. 2001. The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11453-11456.

- FAO. 2010. Commission on Genetic Resources for Food, & Agriculture. The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Food & Agriculture Org.
- Finch-Savage, W. E., y G Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501-523.
- Galdiano, R. F., E. G. Lemos, R. T. Faria y W. A. Vendrame. 2012. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. *Scientia Horticulturae*, 148, 154-160.
- Galdiano, Jr, R. F., E. G. de Macedo Lemos y W. A. Vendrame. 2013. Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flexuosum* Sims. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 114(1), 139-148.
- Hágsater, E., Soto Arenas, M. A., Salazar Chávez, G. A., Jimenez Machorro, M. A., López Rosas, M. A., & Dressler, R. L. 2005. *Orchids of Mexico*. Mexico City: Chinoin Productos Farmaceuticos. 302p.
- Hakim, M. H., C. A. Elwon, M. N. Norzahan, R. Ripin y Z. A. Aziz. 2014. Cryopreservation of *Coelogyne dayanum* Seeds by Vitrification. In II International Orchid Symposium 1078 (pp. 53-60).
- Halbinger, F. y M. Soto-Arenas. 1997. *Laelias of Mexico*. Mexico, D. F. *Revista Herbario AMO*. 15, 1-160.

- Hammer, K. y Y. Teklu. 2008 Plant Genetic Resources: Selected Issues from Genetic Erosion to Genetic Engineering. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics* 109, 15–50.
- Harrington, J. F. 1963. Practical instructions and device on seed storage. In *Proceedings of the International Seed Testing Association*. Vol. 4: 989-994.
- Hartmann H. y D. Kester. 1988. *Propagación de plantas, principios y prácticas*. CECSA. México pp 760.
- Heywood, V. H., y M. E. Dulloo. 2005. In situ conservation of wild plant species: a critical global review of best practices. *IPGRI Technical Bulletin*, 11, 5.
- Hirano, T., T. Godo, M. Mii y K. Ishikawa. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports*, 23(8), 534-539.
- Hirano, T., K. Ishikawa y M. Mii. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis graminifolia* var. *suzukiana* by vitrification. *CryoLetters*, 26(3), 139-146.
- Hirano, T., T. Godo, K. Miyoshi, K. Ishikawa, M. Ishikawa y M. Mii. 2009. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. *Plant Biotechnology Reports*, 3(1), 103-109.
- Hosomi, S. T., R. B. Santos, C. C. Custodio, P. T. Seaton, T. R. Marks y N. B. Machado-Neto. 2011. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Science and Technology*, 39(1), 178-189.

- Hu, W. H., Yang, Y. H., Liaw, S. I., & Chang, C. 2013. Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. by vitrification. *Botanical Studies*, 54(1), 33.
- Ibarra, S. E., R. S. Tognacca, A. Dave, I. A. Graham, R. A. Sánchez y J. F. Botto. 2016. Molecular mechanisms underlying the entrance in secondary dormancy of *Arabidopsis* seeds. *Plant, cell & environment*, 39(1), 213-221.
- Ishikawa, K., K. Harata, M. Mii, A. Sakai, K. Yoshimatsu y K. Shimomura. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 16(11), 754-757.
- ISTA (International Seed Testing Association). 1996. International Rules for Seed Testing. *Seed Science & Technology*, v. 24, supplement. 335 p.
- ISTA. (International Seed Testing Association). 2014. <http://www.seedtest.org> (accesada en noviembre 2014).
- Jitsopakul N., K. Thammassiri., T. Yukawa y K. Ishikawa. 2012. Effect of cryopreservation on seed germination and protocorm development of *Vanda tricolor*. *ScienceAsia* 38, 244-249.
- Kalemba, E. M., y S. Pukacka. 2012. Association of protective proteins with dehydration and desiccation of orthodox and recalcitrant category seeds of three *Acer* genus species. *Journal of plant growth regulation*, 31(3), 351-362.
- Kauth, P. J., D. Dutra, T. R. Johnson, S. L. Stewart, M. E. Kane y W. Vendrame. 2008. Techniques and applications of in vitro orchid seed germination.

- Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical, (1st), 375-391.
- Kim, H. H., Y. G. Lee, D. J. Shin, H. C. Ko, J. G. Gwag, E. G. Cho y F. Engelmann. 2009. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters*, 30(5), 320-334.
- Knudson L. 1922. Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. *Botanical Gazette*. 73 (1), 1-25.
- Lallana, V. H. y L. F. García. 2013. Efecto de pretratamientos en la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). *Investigación Agraria*, 15(2), 129-132.
- Matilla A. J. 2008. Desarrollo y germinación de las semillas. En: J. Azcon-Biero y M. Talón (Eds). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana. 27, 537-558.
- Maunder M., K. Harens., E. O. Guerrant y D. A. Falk. 2004. *Ex situ* Methods. A vital but underused set conservation resource. En: Maunder M., K. Harens., E. O. Guerrant (Eds). *Ex situ* plant conservation supportin species survival in the wild. Society ecological Restauration. International 3-20.
- Maxted, N., Ford-Lloyd, B. V., y J. G. Hawkes. 2013. Plant genetic conservation: the *in situ* approach. Springer Science y Business Media. 446 p.

- McDonald, M. B. 2004. Orthodox seed deterioration and its repair. En: Benech-Arnold, R. L. y R. A. Sanchez (Eds). Handbook of seed physiology: applications to agriculture. Food Products Press. Binghamton USA.
- Mc Kendrick, S. 2000. Manual para la germinación in vitro de Orquídeas. Ceiba Fundación para la Conservación Tropical. Universidad San Francisco de Quito. 17 pp.
- Milošević, M., M. Vujaković y Đ. Karagić. 2010. Vigour tests as indicators of seed viability. Genetika, 42(1), 103-118.
- Neto, N. B. M. y C. C. Custódio. 2005. Orchid conservation through seed banking: ins and outs. Selbyana, Vol 26, 229-235.
- Nikishina, T. V., A. S. Popov, G. L. Kolomeitseva y B. N. Golovkin. 2001. Cryopreservation of seeds of some tropical orchids. In Doklady Biochemistry and Biophysics. MAIK Nauka/Interperiodica. Vol. 378(1), 231-233
- Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano y T. Matsuzawa. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. Plant Science, 91(1), 67-73.
- Nyadanu, D., L. M. Aboagye, R. Akromah y A. Dansi. 2016). Agro-biodiversity and challenges of on-farm conservation: the case of plant genetic resources of neglected and underutilized crop species in Ghana. Genetic Resources and Crop Evolution, 63(8), 1397-1409.

- Ozden-Tokatli, Y., E. A. Ozudogru, F. Gumusel y Lambardi, M. 2007. Cryopreservation of Pistacia spp. seeds by dehydration and one-step freezing. *CryoLetters*, 28(2), 83-94.
- Pammenter, N. W. y P. Berjak, P. 2013. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. *International Journal of Plant Sciences*, 175(1), 21-28.
- Panis. B. y M. Lombardi. 2005. Status of cripreservation technologies in plant (crops and forest trees). En: Ruane. J. y A. Sonnino (Eds). *The role of biotechnology the caraterization and conservation of crop, forest, animals and fishery genetic resource in developing contries turin FAO*. Pp 61-78.
- Panis B., R. Swennen y F. Engelmann. 2001. Cryopreservation of plant germplasm. *Acta Horticulturae* 560:79–86.
- Pegg, D. E. 2007. Principles of cryopreservation. *Cryopreservation and freeze-drying protocols. Methods Mol Biol* 368: 39–57.
- Popova, E., Kim, H. H., P. K. Saxena, F. Engelmann y H. W. Pritchard. 2016. Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. *Biotechnology advances*, 34(4), 380-403.
- Poulsen, G., C. Holten y R. von Bothmer, R. 2006. Identification and revival of low viability seed samples. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(4), 675-678.

- Pritchard, H. W., y P. T. Seaton. 1993. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana*, 14, 89-104.
- Pritchard, H. W. y J. Nadarajan. 2008. Cryopreservation of orthodox (desiccation tolerant) seeds. In *Plant Cryopreservation: A Practical Guide* (485-501). Springer New York.
- Rao, V. R. y T Hodgkin, T. 2004. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant cell, tissue and organ culture*, 68(1), 1-19.
- Rasmussen, H. N. 1995. *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press.
- Raven, P. H. 2013. *Ex situ* plant conservation: supporting species survival in the wild (Vol. 3). E. O. Guerrant, K. Havens, y M. Maunder (Eds.). Island Press. 536 p.
- Ruíz, P. A. 2014. Latencia: cuando las semillas duermen. Extraído el 14 de enero 2014. En www.revista-mm.com/ediciones/rev67/forestal_latencia.pdf
- Rzedowski J. y G. Calderón. 2005. *Flora fanerogámica del Valle de México*. Segunda edición. CONABIO e Instituto de Ecología A.C. Pátzcuaro Michoacán. 1406p.
- Sakai, A., y F. Engelmann. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters*, 28(3), 151-172.

- Sakai, A.; Hirai, D. y Niino, T. 2008. Development of PVS-Based Vitrification and encapsulation Protocols. En Reed, B. M. (Ed). Plant Cryopreservation; A practical Guide. Springer. USA. 501 p
- Santos M., L. Aguirre, C. Campos y G. Martínez. 2006. Conservación *in situ* de la flora mexicana: La orquídea *Laelia albida*, en una reserva de la biosfera. Ciencia y Desarrollo Vol. 1-10.
- SAS Institute 2006. SAS/STAT Guide for personal computers. Version 9.1. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, U.S.A. 1028 p
- Scocchi AM, Rey HY. 2004. Conservación de germoplasma *in vitro*. In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. V. Echenique, C. Rubinstein and L. Mroginski, Eds. INTA, Buenos Aires, Argentina. 179-185.
- Seaton, P. T. y H. W. Pritchard. 2011. Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seed-banking activities. Lankesteriana International Journal on Orchidology, 11(3), 349-353.
- Seaton P., J. P. Kendon., H.W Pritchard., D. Puspitaningtyas y T. Mark. 2013. Orchids conservation: The next ten years. Lankesteriana 13(1-2), 93-101.
- Selosse M., B. Boullard y D. Richardson. 2011. Noël Bernard (1874–1911): orchids to symbiosis in a dozen years. Journal Symbiosis. 54(2), 61-68.
- Semarnat 2010. (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF), jueves 17 de diciembre d 2015.

- Shoushtari, B.D., R. Heydari, G.L. Johnson y J. Arditti. 1994. Germination and viability staining of orchid seeds following prolonged storage. *Lindleyana* 9(2), 77-84.
- Singh, F. 1981. Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin* 50, 416-418.
- Soto-Arenas, M. A. y A. R. Solano-Gómez. 2007. Ficha técnica de *Laelia speciosa*. En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F.
- Thammasiri, K. 1999. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* lindl.) by vitrification. *Cryo letters*, 21(4), 237-244.
- Thammasiri, K. y L. Soamkul. 2007. Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. seeds by vitrification. *ScienceAsia*, 33(4), 223-227.
- Tsukazaki, H., M. Mii, K. Tokuhara Y K. Ishikawa. 2000. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. *Plant Cell Reports*, 19(12), 1160-1164.
- Varela A.S., Arana V. 2011. Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Serie técnica: "Sistemas Forestales Integrados" Sección: "Silvicultura en vivero" INTA EEA Bariloche Cuadernillo N° 3. 10 p.

- Vendrame, W. A., V. S. Carvalho y J. M. M. Dias. 2007. In vitro germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Scientia Horticulturae*, 114(3), 188-193.
- Vendrame, W. A., V. S. Carvalho, J. M. Dias y I. Maguire. 2008. Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. *HortScience*, 43(1), 264-267.
- Vendrame, W. A., y R. T. Faria. 2011. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. *Scientia Horticulturae*, 128(2), 131-135.
- Vendrame W. A, R. Tadeu de Faria, M. Sorace y S. A. Sahyun. 2014. Orchid Cryopreservation. *Ciência. Agrotecnologia.*, Lavras, 38(3), 213-229.
- Volis, S., & M. Blecher, M. 2010. Quasi *in situ*: a bridge between *ex situ* and *in situ* conservation of plants. *Biodiversity and Conservation*, 19(9), 2441-2454.
- Volk, G. M., y C. Walters. 2006. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*, 52(1), 48-61.
- Walters, C., P. Berjak, N. Pammenter, K. Kennedy y P. Raven. 2013. Preservation of recalcitrant seeds. *Science*, 339(6122), 915-916.
- Wu, R. Y., S. Y. Chang, T. F. Hsieh y Y. S. Chang. 2013. Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation. *Scientia Horticulturae*, 157, 108-112.

9. ANEXOS

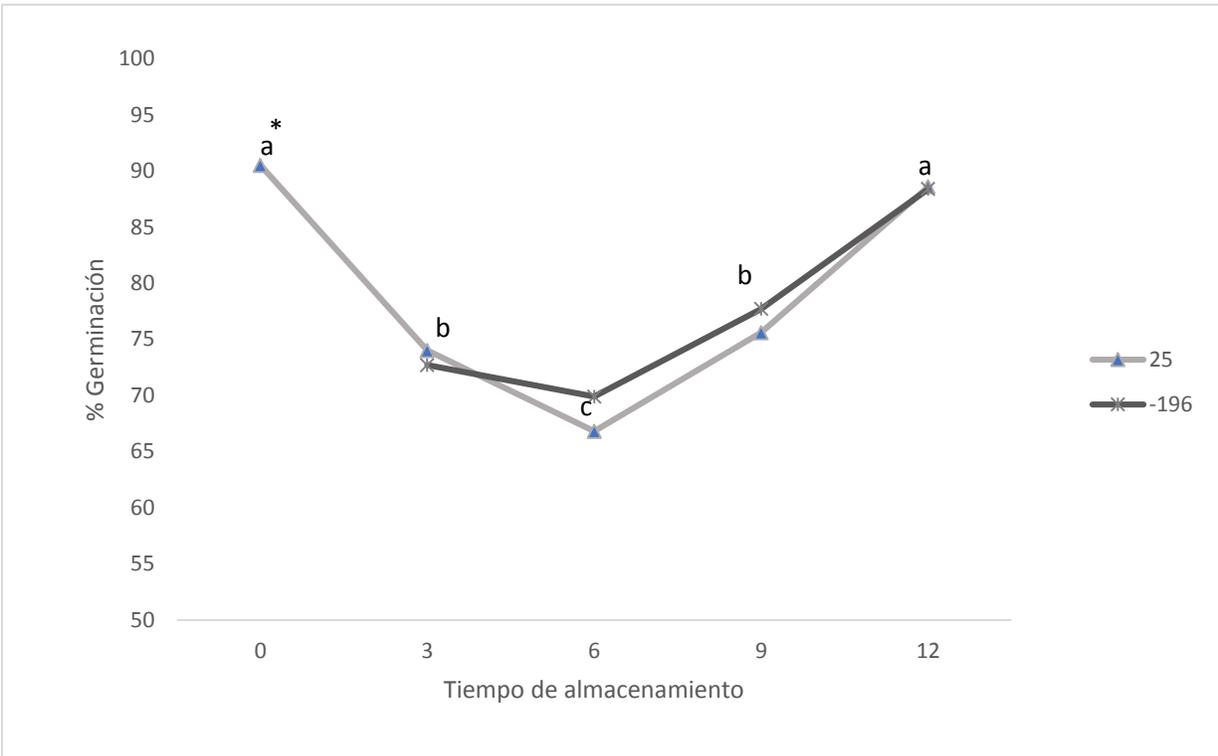
9.1. Anexo 1

Formulación del medio de cultivo ER (Arditti, 1982).

Ingredientes	ER Cantidad en mg L ⁻¹
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	150
KH ₂ PO ₄	300
(NH ₄) ₂ SO ₄	150
FeSO ₄ .7H ₂ O	25
NH ₄ NO ₃	400
KNO ₃	400
Mg (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	100
Sacarosa	20000
Agar	8000
pH se ajusta con KOH y/o HCl	
0.5N	5.2

9.2. Anexo 2

Germinación asimbiótica de *L. speciosa*, durante cinco periodos de tiempo en 12 meses en 25 y -196 °C de almacenamiento.



*Letras iguales significan sin diferencia significativa con un 5% de confiabilidad por análisis de Tukey.

9.3. Anexo 3

Viabilidad de semilla de *L. speciosa* después de crioconservación por el método de tinción con CTT, un ejemplo de respuesta entre los diferentes tratamientos de crioprotectores y los tiempos de almacenamiento A) Semillas viables; B) Semillas no viables.

