



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN: CONSERVACIÓN Y MANEJO
DE RECURSOS NATURALES

CRIOCONSERVACIÓN DE SEMILLAS Y PROTOCORMOS
DE *Laelia autumnalis* Lindl.

Tesis como requisito para obtener
El grado de **Doctor en Ciencias** en la **opción**
de conservación y manejo de recursos naturales

M. C. ULICES IVÁN SANTOS PÉREZ

TUTORA: DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS



OCTUBRE 2019



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas

DRA. ESPERANZA MELÉNDEZ HERRERA
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "CRIOCONSERVACIÓN DE SEMILLAS Y PROTOCORMOS DE *Laelia autumnalis* Lindl" presentado por el M.C Ulices Ivan Santos Pérez con matrícula No. 0324318G, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctor en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Morelia, Mich., a 09 de septiembre de 2019

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

Dra. Martha Elena Pedraza Santos
Directora de Tesis

Dr. Rafael Salgado Garciglia
Vocal

Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas
Vocal

Dr. Alejandro Martínez Palacios
Vocal

Dr. María Teresa González Arnao
Vocal

c.c.p. Archivo de la O CyMRN

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO I	v
ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO II	v
ÍNDICE DE CUADROS CAPÍTULO III	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS CAPÍTULO II	vii
ÍNDICE DE FIGURAS CAPÍTULO III	viii
I. RESUMEN GENERAL	1
II. GENERAL ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
IV. Hipótesis	6
V. Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	8
VI. RESULTADOS	9
CAPITULO I. ARTÍCULO I: CRIOCONSERVACIÓN DE ORQUÍDEAS	9
CHAPTER 1. ARTICLE 1: ORCHIDS CRYO-PRESERVATION	9
Resumen	9
Abstract	10
INTRODUCCIÓN	11
Bancos de semillas	11
Conservación por crecimiento mínimo	12
Crioconservación en orquídeas	12
Inmersión directa	13
Técnicas criogénicas basadas en la deshidratación osmótica y física de los tejidos	15
Crioconservación basada en la vitrificación	15
Técnica de encapsulación-vitrificación (E-V)	19
Técnica de gota-vitrificación (Gota-V)	20
Técnicas de crioconservación basadas en la deshidratación	21
Técnica de encapsulación-deshidratación	21
Crío-lámina	22

Estabilidad del material crioconservado.....	23
Viabilidad semillas.....	24
Desinfección in vitro	25
CONCLUSIONES.....	26
LITERATURA CITADA	27
CAPITULO II. ARTÍCULO II. EFECTIVIDAD DE MÉTODOS PARA DESINFESTAR SEMILLAS DE <i>Laelia autumnalis</i> PARA LA CONSERVACIÓN EN NITRÓGENO LÍQUIDO	37
CHAPTER II. ARTICLE II. EFFECTIVENESS OF METHODS TO DISINFECT SEEDS OF <i>Laelia autumnalis</i> FOR CONSERVATION IN LIQUID NITROGEN	37
RESUMEN	37
ABSTRACT.....	37
INTRODUCCIÓN.....	39
MÉTODO.....	41
Inmersión directa de semillas sin desinfectar (E1).	41
Desinfestación de semillas antes de la inmersión en nitrógeno líquido (E2).	41
Desinfestación de semillas después de la inmersión en nitrógeno líquido (E3).	41
Variables evaluadas.....	42
Viabilidad de semillas.....	42
Germinación in vitro.	43
Análisis estadístico.	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
Inmersión directa de semillas sin desinfectar (E1).	45
Desinfestación de semillas antes de la inmersión en nitrógeno líquido (E2).	47
Semillas viables.	47
Semillas potencialmente viables.....	49
Semillas no viables.	49
Germinación in vitro.	50
Desinfestación de semillas después de la inmersión en nitrógeno líquido (E3)	53
Viabilidad de semillas.....	53
Germinación in vitro de semillas.	54
CONCLUSIONES.....	55
LITERATURA CITADA	55
CAPITULO III. ARTÍCULO III: CRIOCONSERVACIÓN DE PROTOCORMOS DE <i>Laelia</i> <i>autumnalis</i> (ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN, ENCAPSULACIÓN- VITRIFICACIÓN Y V CRÍO-LÁMINA).....	60

CHAPTER III. ARTICLE III. PROTOCOLS CRYOPRESERVATION OF <i>Laelia autumnalis</i> (ENCAPSULATION-DEHYDRATION, ENCAPSULATION-VITRIFICATION AND V CRYO-PLATE)	60
RESUMEN	60
ABSTRACT	61
INTRODUCCIÓN	63
MATERIALES Y MÉTODOS	66
Material vegetal y condiciones de cultivo.	66
E1: Curva de deshidratación de cápsulas de alginato de calcio.	67
E2: Precultivo para la deshidratación de cápsulas en sacarosa.....	68
E5: Solución de carga E-V. Determinación del t.....	69
E6: Condiciones de solución vitrificadora para la técnica de E-V.	70
E7: Solución de carga E-V. Determinación del t.....	71
E8: Condiciones de solución vitrificadora para la técnica de V C-L. Determinación del tiempo de exposición y tipo de PVS.....	72
Viabilidad de protocormos después de la crioconservación.	72
Parámetros morfológicos en protocormos crioconservados.	73
Análisis estadístico.	73
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
E1: Curva de deshidratación de cápsulas de alginato de calcio.	74
E2: Precultivo para la deshidratación de cápsulas en sacarosa.....	74
E3: Precultivo de protocormos para las técnicas de vitrificación. Determinación de la concentración de sacarosa.....	76
Efecto de la concentración de sacarosa sobre la formación de vitroplántulas.....	78
E4: Precultivo de protocormos para las técnicas de vitrificación. Determinación del tiempo de exposición a sacarosa.	79
Regeneración de protocormos.	81
E5: Solución de carga E-V. Determinación del tiempo de exposición.	82
E7: Solución de carga V C-L. Determinación del tiempo de exposición.	83
E8: Condiciones de solución vitrificadora para la técnica de V C-L. Determinación del tiempo de exposición y tipo de PVS.....	85
CONCLUSIONES	88
LITERATURA CITADA	89
CAPÍTULO IV: ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN	93
¿Por qué deberíamos preparar un arca moderna para conservar plantas?	93
¿Cómo se conserva la diversidad vegetal?	94
Parques y Áreas Naturales.	95

Jardines Botánicos.....	96
Bancos de semillas.	96
Conservación de plantas in vitro.....	99
La crioconservación: el futuro de la conservación de plantas.....	99
Pasos importantes para lograr la crioconservación de plantas.	100
Ventajas y avances de la crioconservación de plantas.	100
LITERATURA CITADA	103
VII. DISCUSIÓN GENERAL	104
VIII. CONCLUSIONES GENERALES	108
IX. LITERATURA CITADA COMPLEMENTARIA	109

ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO I

Cuadro	Página
1	Crioconservación de orquídeas por inmersión directa. 13
2	Orquídeas crioconservadas por el método de vitrificación. 17
3	Orquídeas crioconservadas por el método de encapsulación-vitrificación. 19
4	Orquídeas crioconservadas con el método de gota-vitrificación. 20
5	Orquídeas crioconservadas con la técnica de encapsulación-deshidratación. 22

ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO II

Cuadro	Página
1	Nivel de significancia para la viabilidad de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> en función del tipo de desinfectante y método de secado usado antes de la inmersión en nitrógeno líquido. 47

ÍNDICE DE CUADROS CAPÍTULO III

Cuadro	Página
1	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la concentración de sacarosa en la reacción fluorocromática de protocormos de <i>L. autumnalis</i> crioconservados por encapsulación-deshidratación. 75
2	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la concentración de sacarosa en la supervivencia de los protocormos de <i>L. autumnalis</i> 76
3	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la concentración de sacarosa en la regeneración plántulas a partir de protocormos de <i>L. autumnalis</i> 78
4	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto del tiempo de exposición a la sacarosa en la recuperación de los protocormos de <i>L. autumnalis</i> 80
5	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto del tiempo de exposición a la sacarosa en la formación de plántulas <i>in vitro</i> a partir de protocormos de <i>L. autumnalis</i> 81

6	Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del tiempo de exposición a la solución de carga y del tipo de solución PVS en la viabilidad de protocormos de <i>L. autumnalis</i> crioconservados por encapsulación-vitrificación.	82
7	Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del tiempo de exposición a la solución de carga y tipo de solución PVS en la viabilidad de protocormos de <i>L. autumnalis</i> crioconservados por crío-lámina V.....	84
8	Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del tiempo de exposición y tipo de solución PVS en la viabilidad de protocormos de <i>L. autumnalis</i> crioconservados por V crío-lámina.	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1	Ruta criogénica para la conservación de <i>Laelia autumnalis</i>8

ÍNDICE DE FIGURAS CAPÍTULO II

Figura	Página
1	Ruta criogénica en la técnica de inmersión directa para semillas maduras de <i>Laelia autumnalis</i> sin desinfectar (E1), desinfectadas antes (E2) y después (E3) de la inmersión en nitrógeno líquido. TTC = Prueba de viabilidad con sales de Cloruro de 2,3,5-Trifenil-Tetrazolio (TTC) al 1 %. 42
2	Semillas de <i>Laelia autumnalis</i> teñidas por efecto de las sales de TTC. Semillas viables (A), semillas potencialmente viables (B) y semillas no viables (C) después de la inmersión en NL. 45
3	Estructuras del hongo <i>Alternaria</i> sp. identificado como agente contaminante en cultivo <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. autumnalis</i> después de la inmersión directa en nitrógeno líquido, A) cadena de conidios y B) conidio con las células transversales y longitudinales septadas. 46
4	Viabilidad de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Las semillas fueron teñidas con las sales de TTC (E2). DMS = diferencia mínima significativa. CV = coeficiente de variación. z medias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar. 48
5	Semillas de <i>Laelia autumnalis</i> potencialmente viables en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Las semillas fueron teñidas con las sales de TTC (E2). DMS = diferencia mínima significativa. CV = coeficiente de variación. z medias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar. 50
6	Semillas no viables de <i>Laelia autumnalis</i> en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Las semillas fueron teñidas con las sales de TTC (E2). DMS = diferencia mínima significativa. CV = coeficiente de variación. z medias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar. 51
7	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido (E2). DMS = diferencia mínima significativa. CV = coeficiente de variación. z medias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar. 52

8	Modelo de regresión para estimar la relación entre el porcentaje de semillas potencialmente viables y el porcentaje de germinación in vitro (E2) de semillas de <i>L. autumnalis</i> en nueve muestras desinfectadas con CaCl ₂ O ₂ antes de la inmersión en nitrógeno líquido.....	52
9	Efecto del tipo de desinfectante en la viabilidad de las semillas de <i>L. autumnalis</i> desinfectadas después de la inmersión en NL. A) semillas viables, B) semillas no viables (E3).	54
10	Efecto del tipo de desinfectante sobre la germinación de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> después de la inmersión en nitrógeno líquido (E3).	54

ÍNDICE DE FIGURAS CAPÍTULO III

Figura		Página
1	Ruta criogénica para la conservación a largo plazo de protocormos de <i>Laelia autumnalis</i>	67
2	Técnica de encapsulación-deshidratación utilizada para la crioconservación en protocormos de <i>Laelia autumnalis</i>	69
3	Técnica de encapsulación-vitrificación para la crioconservación en protocormos de <i>Laelia autumnalis</i>	71
4	Técnica de crío-lámina para la crioconservación en protocormos de <i>Laelia autumnalis</i>	72
5	Curva de deshidratación para cápsulas de alginato de calcio con gel de sílice (recipiente de 20 cm de altura x 12 cm de diámetro, 10 cápsulas y 400 g de gel de sílice por recipiente).	74
6	Efecto de la concentración de sacarosa sobre la fluorescencia de protocormos de <i>L. autumnalis</i> después de la crioconservación con encapsulación-deshidratación.	76
7	Efecto de la osmodeshidratación <i>in vitro</i> con diferentes niveles de sacarosa sobre protocormos verdes (A), protocormos cloróticos (B) y necróticos (C) de la orquídea <i>Laelia autumnalis</i>	78
8	Efecto de la osmodeshidratación con sacarosa en el desarrollo de vitroplántulas a partir de protocormos (A) protocormos que formaron plántulas (B) protocormos vivos que no formaron plántulas <i>L. autumnalis</i>	79
9	Efecto del tiempo de precultivo (h) en 0.2 M de sacarosa sobre la supervivencia de protocormos verdes (A) y cloróticos (B) en la orquídea <i>Laelia autumnalis</i>	81
10	Efecto del tiempo de precultivo (h) en 0.2 M de sacarosa sobre el desarrollo a vitroplántulas (A) y sin formación de vitroplántulas (B) provenientes de protocormos in vitro de <i>Laelia autumnalis</i>	82
11	Efecto del tiempo de exposición a la solución de carga y tipo de PVS en la viabilidad de protocormos de <i>L. autumnalis</i> , determinada por	

	fluorescencia, después de la crioconservación con la técnica de encapsulación-vitrificación.....	83
12	Efecto del tiempo de exposición a la solución de carga sobre la viabilidad de protocormos de <i>L. autumnalis</i> después de la crioconservación por V crío-lámina.....	85
13	Efecto del tiempo de exposición a la solución PVS sobre la viabilidad de protocormos de <i>L. autumnalis</i> después de la crioconservación por crío-lámina V.....	87

I. RESUMEN GENERAL

Para la conservación de *Laelia autumnalis*, una orquídea que es colectada y comercializada de manera ilegal lo cual, provoca la disminución en su hábitat. Para esto fue necesario determinar la efectividad de diferentes métodos de crioconservación sobre la viabilidad de semillas y protocormos. En un primer experimento se evaluó el efecto de la desinfección de semillas antes y después de la inmersión directa. Se consideró la técnica de inmersión directa en nitrógeno líquido para semillas, sin embargo, la germinación asimbiótica fue afectada por el hongo *Alternaria* sp.; esto motivó a realizar dos ensayos para evaluar la viabilidad y germinación asimbiótica de las semillas en función de los desinfectantes hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio, así como los métodos de secado con aire en la campana de flujo laminar, gel de sílice y bomba de vacío, antes y después de la inmersión en nitrógeno líquido. Los desinfectantes hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio disminuyeron la viabilidad en 49 y 37 %, respectivamente; así como los métodos de secado con aire en la campana de flujo laminar y bomba de vacío con 36 y 28 %, respectivamente. La pérdida de viabilidad fue menor cuando se desinfectó después de la inmersión en nitrógeno líquido, la germinación se estimuló (100 %) con hipoclorito de sodio. Por lo que se recomienda que las semillas de *L. autumnalis* deben desinfectarse con hipoclorito de calcio y secarse con aire de la campana de flujo laminar después de la crioconservación por inmersión directa en nitrógeno líquido, para evitar daños en los tejidos. Otra alternativa de conservación podría ser la crioconservación de protocormos por lo que el objetivo fue evaluar la efectividad de los métodos encapsulación-deshidratación (E-D), encapsulación-vitrificación (E-V) y V frío-lámina (V C-L) para la crioconservación de protocormos de *Laelia autumnalis*. Para E-D, las cápsulas de alginato (con 1 a 2 protocormos) y 20 % de humedad se precultivaron durante 24 h en medio líquido Murashige y Skoog (MS) con 0, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.25 M de sacarosa, después se sumergieron en nitrógeno líquido durante 24 h. El recalentamiento fue lento en la campana de flujo laminar (60 segundos). Para todos los tratamientos se determinó la viabilidad de protocormos con diacetato de fluoresceína (0.05 %) 30 d después de la crioconservación. Los protocormos precultivados con 1 y 1.25 M de sacarosa reflejaron 100 % de fluorescencia, mientras que los protocormos sin precultivo reflejaron fluorescencia solo en 20 % de sus tejidos. Para E-V y V-C-L, los protocormos se precultivaron en medio MS basal con sacarosa (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 M) y un tratamiento control sin sacarosa durante 24 h (16/8 h, luz/oscuridad), transcurrido el tiempo se subcultivaron en medio fresco MS basal para su recuperación. Otros protocormos se subcultivaron en medio MS basal (sacarosa 0.2 M) durante 24, 32, 48 y 72 h. En todos los tratamientos se evaluó el porcentaje de protocormos

verdes (viables), cloróticos (potencialmente viables) y necróticos (no viables) después de 15 días del subcultivo (dds), 30 dds se evaluó el número de protocormos que formaron plántulas. Una vez establecido el precultivo se optimizó el tiempo de exposición a la solución de carga, los protocormos precultivados y encapsulados se colocaron en sacarosa 0.4 y glicerol 2 M durante 15, 30 y 60 min y un tratamiento sin exposición. Después se adicionó solución vitrificadora de plantas (PVS2 o PVS3) durante 20 min e introdujeron en nitrógeno líquido durante 24 h. Para optimizar el tiempo de exposición en PVS se evaluaron cuatro tratamientos (20, 40, 60 y 120 min) y un tratamiento testigo sin PVS2 o PVS3; los criotubos se sumergieron en nitrógeno líquido durante 24 h. El calentamiento fue rápido a 40 ± 2 °C durante 60 s y solución de lavado (sacarosa 2 M y sales inorgánicas MS 50 %) durante 180 s. La adición de sacarosa en el precultivo disminuyó la viabilidad de los protocormos, los tratamientos expuestos a 0.8 M de sacarosa presentaron solo 2 % de protocormos verdes respecto al tratamiento sin sacarosa. Así mismo, la sacarosa afectó negativamente la formación de plántulas. El tiempo de exposición no influyó sobre la viabilidad y regeneración de los protocormos. Para la E-V, la exposición en la solución de carga durante 15 min y PVS3 alcanzó el mayor porcentaje de protocormos viables (74 %) después de la crioconservación; los protocormos expuestos durante 15 min a la solución de carga y PVS2 mostraron 70 % viabilidad. En la técnica V-C-L el mayor porcentaje de viabilidad (72%) de los protocormos se logró al exponerlos a la solución de carga durante 30 min más PVS2 (30 min), mientras que los protocormos sin solución de carga y PVS2 alcanzaron 20 % de viabilidad. Al exponer los protocormos a solución de carga durante 20 min y a PVS2 durante 20, 40 y 60 min, se obtuvo un promedio de 94 % de viabilidad, mientras que con la solución PVS3 se alcanzó un 100 % de viabilidad al exponerlos durante 40, 60 y 120 min. Estos resultados sugieren que para la crioconservación de protocormos de *Laelia autumnalis* debe utilizarse la técnica de V crío-lamina.

Palabras clave: Almacenamiento, conservación *ex situ*, orquídeas y métodos criogénicos.

II. GENERAL ABSTRACT

For *Laelia autumnalis* conservation, which is a collected and illegally traded orchid, thus, its habitat decreasing is caused. So, the effectiveness of preservation methods was necessary determined for seeds and protocorms viability. The effectiveness of seeds disinfection was evaluated before and after direct immersion as a first experiment. The direct immersion technic on liquid nitrogen was considered for seeds, however, asymbiotic germination was affected by *Alternaria* sp. fungi; these results were the motivation to use two assays which were used for the evaluation of asymbiotic viability and germination seeds with calcium hypochlorite and sodium hypochlorite as disinfectants, as well as laminar flow hook, silica gel and vacuum pump as drying methods, before and after liquid nitrogen immersion. The viability decreased in 49 and 37 % with calcium hypochlorite and sodium hypochlorite as disinfectants, as well as laminar flow hook and vacuum pump as drying methods with 36 and 28 %. The lack of viability was low when they were disinfected after liquid nitrogen immersion, the germination was stimulated with sodium hypochlorite (100 %). Therefore, *L. autumnalis* seeds must be disinfected with sodium hypochlorite and dried with laminar flow hook after cryopreservation with direct immersion on liquid nitrogen as a recommendation in order to avoid tissues damage. Protocorms cryo-preservation could be used as another conservation alternative, therefore, the aim was to evaluate the effectiveness of encapsulation-dehydration (E-D), encapsulation-vitrification (E-V) and V cryo-plate (V C-P) methods for *Laelia autumnalis* protocorms cryopreservation. Murashige and Skoog (MS) liquid medium with 0, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.25 M of sucrose were used for alginate capsules pre-cultivation (with 1 to 2 protocorms) and humidity of 20 % for E-D during 24 h, after that, they were immersed in liquid nitrogen during 24 h. The rewarming was slow on the laminar flow hood (60 seconds). 30 d after cryopreservation the protocorms viability of all treatments were determined with fluorescein diacetate (0.05 %). 100 % of pre-cultivated protocorms with 1.0 and 1.25 M of sucrose showed fluorescence, while just the 20 % of non-pre-cultivated protocorms showed fluorescence on their tissues. MS basal medium with sucrose (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 and 1.2 M) and a non-sucrose treatment during 24 h (16/8 h light/dark) were used for protocorms pre-cultivation for E-V and V C-P, they were subcultured on MS basal medium after the time for their recovery. Other protocorms were subcultivated on MS basal medium (0.2 M sucrose) during 24, 32, 48 and 72 h. The percentage of green (viable), chlorotic (potentially viable) and necrotic protocorms (non-viable) were evaluated at all treatments 15 days after subculture (das), the number of seedlings development from the protocorms were evaluated 30 das. The exposition time at loading solution was optimized once the pre-culture was

established, the precultivated and encapsulated protocorms were placed in 0.4 sucrose and 2 M glycerol during 15, 30 and 60 min and a treatment without exposition as control. After that, plant vitrification solution (PVS2 or PVS3) were added during 20 min and immersed in liquid nitrogen during 24 h. Four treatments (20, 40, 60 and 120 min) and a control treatment without PVS2 or PVS3 were evaluated in PVS for exposition time optimizing; cryotubes were immersed in liquid nitrogen for 24 hours. The rewarming was fast at 40 ± 2 °C during 60 s and washing solution (2 M sucrose and 50 % MS inorganic salts) during 180 s. Viability protocorms decreased by adding sucrose at pre-culture, the treatments which were exposed at 0.8 M sucrose presented just 2 % of green protocorms with respect to the treatment without sucrose. Likewise, seedlings development was affected negatively by sucrose. Viability and regeneration of protocorms were not affected by exposition time. The highest percentage of viable protocorms (74 %) after cryopreservation were obtained at the exposition of loading solution during 15 min and PVS3 for E-V; protocorms exposed at loading solution and PVS2 during 15 min showed 70 % of viability. The highest viability percentage (72 %) of protocorms were obtained at the exposition of loading solution during 30 min plus PVS2 for V C-P technique, while protocorms without loading solution and PVS2 obtained 20 % of viability. An average of 94 % of viability was obtained at the exposition of the protocorms with loading solution during 20 min and PVS2 during 20, 40 and 60 min, while 100 % of viability was obtained at the exposition of PVS3 solution during 40, 60 and 120 min. These results suggest that V cryo-plate must be used for cryopreservation of *Laelia autumnalis* protocorms.

Keywords: Storage, *ex situ* conservation, orchids and cryogenic methods.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México, 188 especies de la familia Orchidaceae se encuentran amenazadas, bajo protección especial o en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010), principalmente debido a la destrucción masiva de su hábitat, así como al saqueo ilimitado e ilegal de material genético, que trae como consecuencia la reducción de la diversidad de especies silvestres. *Laelia autumnalis* es una orquídea endémica de México de uso ornamental, medicinal y artesanal (Santos *et al.*, 2006). Tradicionalmente en Michoacán, se usa durante la celebración de “Día de Muertos”, cuando se extraen de los bosques flores de diversas tonalidades, formas y tamaños, con la consecuente pérdida de germoplasma de invaluable valor científico (Hernández-Muñoz *et al.*, 2012).

Los recursos genéticos de algunas especies en peligro de extinción o protegidas se conservan *in situ* o *ex situ* bajo condiciones de campo. Este método es costoso, requiere una gran cantidad de tiempo y mano de obra para el mantenimiento de las colecciones (Seguel, 2001). En la conservación de germoplasma vegetal se han empleado técnicas como el cultivo de tejidos bajo condiciones de crecimiento mínimo, la cual puede ser eficiente en orquídeas. Sin embargo, las plantas que se mantienen en crecimiento normal o lento, requieren subcultivos periódicos que incrementan los costos y los riesgos de contaminación genética y/o modificación fenotípica durante el subcultivo (Panta *et al.*, 2014).

El método de crioconservación, consiste en llevar material biológico desde su temperatura fisiológica normal hasta temperaturas ultra-baja [generalmente en nitrógeno líquido (NL) a -196 °C] y ofrece la posibilidad de conservar germoplasma por largos periodos; además se minimizan las pérdidas por mano de obra, se reduce el espacio y se evita la variación genética (Villalobos y Engelmann, 1995). Existen diversas técnicas de crioconservación para germoplasma vegetal, la selección del método a utilizar influye en la sobrevivencia de los explantes y esto en función de la fisiología (el tejido seleccionado) y, las características de la especie (Reed, 2008). Los métodos criogénicos más aplicados para estructuras organizadas como los ápices y embriones son: encapsulación-deshidratación, vitrificación, gota-vitrificación, encapsulación-vitrificación y crio-lámina (González-Arno y Engelmann, 2013).

Existen ejemplos exitosos de crioconservación de semillas de orquídeas en el género *Oncidium* al utilizar el método de vitrificación con el que lograron 68 % de germinación después de deshidratar las semillas con la solución PVS2 + 1 % floroglucinol (Galdiano *et al.*, 2013). Con este método en semillas de *Bletilla formosa* (Hayata) Schltr. colocadas en una solución de carga (sacarosa 0.4 M + glicerol 2 M) y deshidratadas con la solución PVS2, obtuvieron 91 % de semillas germinadas después de la crioconservación (Hu *et al.*, 2013). Con el método de encapsulación-deshidratación en cuerpos parecidos a protocormos (PLBs por sus siglas en inglés *Protocorm Like Bodies*) de *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) se obtuvo 30 % de regeneración después de dos semanas de haber sido sometidos a crioconservación (Khoddamzadeh *et al.*, 2011). Con PLBs de *Dendrobium nobile*, crioconservados con el método de encapsulación-vitrificación se logró una supervivencia y regeneración de 78.1 % y 75.9 %, respectivamente, valores superiores a los obtenidos con el método de encapsulación-deshidratación que presentó 53.3 % de supervivencia y 50.2 % de regeneración, respectivamente (Mohanty *et al.*, 2012). Mohanty *et al.* (2013) al utilizar PLBs de *Dendrobium chysanthum* Wall ex Lindl. obtuvieron 63.2 % de supervivencia y 59.9 % de los PLB's lograron regenerarse después de la crioconservación. Sin embargo, el ajuste osmótico a través de la biosíntesis y/o acumulación de osmolitos es muy diverso y no se puede definir una concentración efectiva y absoluta para todas las especies (Hare *et al.*, 1998).

La crioconservación se proyecta como una herramienta biotecnológica potencial que permite almacenar gran cantidad de semillas y protocormos viables de la orquídea *L. autumnalis* para su conservación a largo plazo y su posterior propagación a gran escala. Sin embargo, la eficiencia en el proceso de crioconservación depende del acondicionamiento del material vegetal para que resista tanto el congelamiento como el descongelamiento. Por ello, en la presente investigación se planteó la hipótesis y objetivos siguientes:

IV. Hipótesis

La crioconservación de semillas y protocormos de *Laelia autumnalis* se logra mediante la optimización de protocolos criogénicos.

V. Objetivo general

Determinar la efectividad de diferentes métodos de crioconservación sobre la viabilidad de semillas y protocormos de *Laelia autumnalis*.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la desinfección de semillas antes y después de la inmersión directa en nitrógeno líquido.
2. Evaluar la efectividad de los métodos criogénicos encapsulación-deshidratación, encapsulación-vitrificación y V crío-lámina para la conservación de protocormos de *Laelia autumnalis*.
3. Definir las mejores condiciones para la crioconservación de semillas y protocormos de *Laelia autumnalis*.
4. Ruta criogénica para la conservación de *Laelia autumnalis*.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

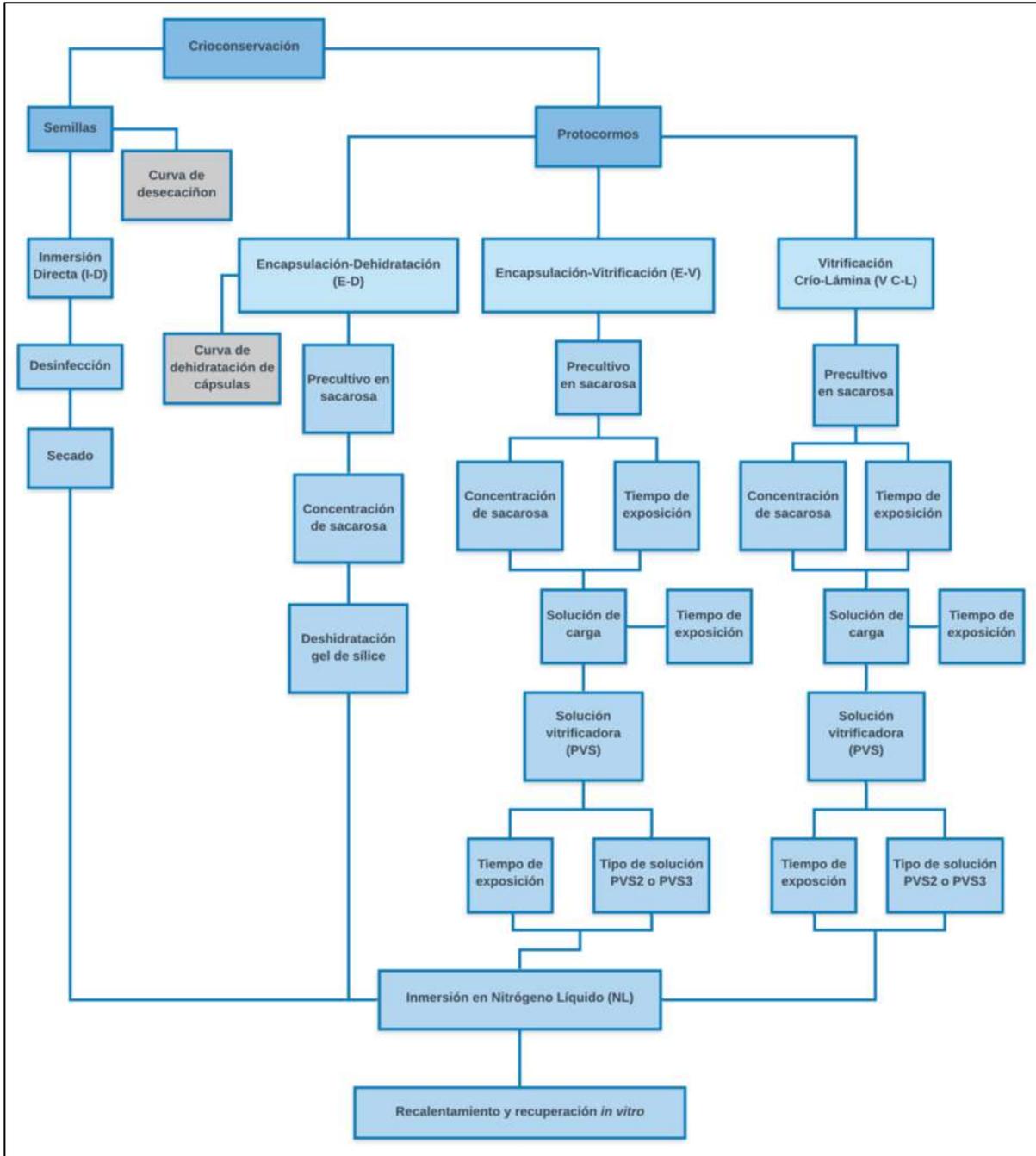


Figura 1. Ruta criogénica para la conservación de *Laelia autumnalis*.

VI. RESULTADOS

CAPITULO I. ARTÍCULO I: CRIOCONSERVACIÓN DE ORQUÍDEAS

Artículo de revisión

CHAPTER 1. ARTICLE 1: ORCHIDS CRYO-PRESERVATION

Review article

Resumen

La conservación de la biodiversidad de la orquideoflora nativa es de suma importancia por el valor científico, ornamental y ecológico que representa. Las poblaciones silvestres de orquídeas han disminuido en los ecosistemas donde habitan por el cambio de uso de suelo de bosque a zona agrícola; además de la extracción ilegal de individuos. Ante tal situación, la conservación *ex situ* puede realizarse con técnicas que pueden ser muy útiles en la preservación de las orquídeas como la crioconservación, métodos prometedores y valiosos para la conservación de germoplasma a largo plazo, por su capacidad para detener la mayoría de los procesos metabólicos de diversos tejidos vegetales. Las orquídeas presentan tolerancia a la desecación de manera común, sin embargo, su longevidad en los bancos de germoplasma es corta. Debido a esto, es necesario optimizar metodologías de crioconservación basadas en la tolerancia al estrés por baja temperatura. El objetivo de esta revisión es presentar las diferentes metodologías criogénicas que se implementan en la conservación de orquídeas.

Palabras clave: Almacenamiento, conservación *ex situ*, orquídeas y métodos criogénicos.

Abstract

The diversity preservation of native orchids-flora is important for scientific value, ornamental and ecologic. Wild populations of orchids have been decreased in the ecosystems because of land-change use from forest to agricultural area; in addition to illegal extraction of individuals. Due to this situation, *ex situ* conservation can be performed with technics which can be useful at orchids preservation like cryopreservation, due to its capacity, promising and valuable methods for long-term germplasm conservation can be stopped most of metabolic processes of various plant tissues. Orchids exhibit heat tolerance; however, their longevity is low in germplasm banks. Because of this, it is necessary to optimize cryo-preservation methodologies based on stress tolerance by low temperature. The aim of this review is to show the different cryogenic methodologies which implement on orchids cryopreservation.

Keywords: Storage, *ex situ* conservation, orchids and cryogenic methods.

INTRODUCCIÓN

La destrucción constante del hábitat natural de las orquídeas por el avance de la agricultura, el cambio climático y la extracción indiscriminada de plantas por coleccionistas y vendedores, reducen la distribución de sus poblaciones (Magrini *et al.*, 2014) y como consecuencia disminuyen su variabilidad genética (Vendrame *et al.*, 2014). Esta situación implica que la familia Orchidaceae sea una de las familias con más especies catalogadas en peligro de extinción, amenazadas o extintas de la naturaleza (Merritt *et al.*, 2014). En México hasta 2011 se reportaron 188 especies amenazadas, sujetas a protección especial, en peligro de extinción o extinta en su ambiente natural (SEMARNAT, 2011). Sin embargo, la CITES reporta que todas las especies de esta familia se ubican en el apéndice II con excepción de las enlistadas en el apéndice I (CITES, 2017).

Debido a la gran cantidad de especies de orquídeas en riesgo de extinción, se requieren métodos de conservación para asegurar la preservación y el uso futuro de las especies de orquídeas sin la pérdida de variabilidad genética (Vettorazzi *et al.*, 2019). Los esfuerzos para superar este problema incluyen enfoques *ex situ* tales como los bancos de semillas y la germinación *in vitro* de manera simbiótica o asimbióticamente (Bustam *et al.*, 2015).

Bancos de semillas

La preservación de germoplasma por semillas es una estrategia eficiente para conservar la mayor variabilidad genética posible a bajo costo y en espacios reducidos (Aguilar-Morales *et al.*, 2016). La longevidad de las semillas ortodoxas es crucial para su preservación, esta determinada por el contenido de agua, de lípidos y la temperatura, factores que dependen de las condiciones de almacenamiento (Mira *et al.*, 2014).

En semillas de orquídeas, la tolerancia a la desecación es común, pero la longevidad en el almacenamiento es deficiente dada su naturaleza de vida corta (Merritt *et al.*, 2014); además, es necesario utilizar herramientas biotecnológicas de propagación como el cultivo *in vitro* para efectuar la germinación de manera asimbiótica (Cardoso *et al.*, 2016; Silveira *et al.*, 2016).

El almacenamiento convencional para un banco de semillas a -18 °C con humedad relativa de 23 % se determinó para la mayoría de las especies de orquídeas terrestres (*Caladeania arenicola*, *Caladenia*

flava, *Caladenia huegelii*, *Diuris laxiflora*, *Microtis media* ssp *Media*, *Pterostylis recurva*, *Pterostylis sanguinea*, *Thelymitra crinita*, *Thelymitra* y *Diuris fragrantissima*). Las semillas se desecaron a humedad relativa de 23 o 5 % y almacenamiento 23 y -18 °C. Sin embargo, obtuvieron variación en la germinación asimbiótica después de diferentes períodos de almacenamiento, lo que dificulta la identificación definitiva de las condiciones óptimas de almacenamiento (Hay *et al.*, 2010).

Conservación por crecimiento mínimo

En la familia Orchidaceae, se han realizado numerosas estrategias mediante la implementación de bancos de germoplasma en condiciones *in vitro* por el método de crecimiento mínimo o lento (Aguilar-Morales *et al.*, 2016). *Epidendrum chlorocorymbos* se almacenó durante 6 meses, temperatura de 23 °C al reducir el potencial hídrico con sorbitol 1 % y obtuvieron 100 % brotes (Lopez-Puc, 2013). En orquídeas mexicanas se logró optimizar el almacenamiento durante 12 o 24 meses a temperatura 10 °C de nueve especies *L. albida*, *L. autumnalis*, *L. speciosa* con medio MS 12.5 %, sacarosa 60 gL⁻¹ y ABA 0.5 gL⁻¹; *E. radicans*, *O. cavendishianum* y *O. tigrinum* en medio MS 12.5 % y sacarosa 40 gL⁻¹; *C. aurantiaca*, *E. adenocaula* y *E. citrina* en medio nutritivo MS 75 %, sacarosa 60 gL⁻¹, obtuvieron porcentajes de brotes 100 % (Ávila y Salgado-Garciglia, 2006).

A pesar de las ventajas de este método de conservación, para los bancos de germoplasma es fundamental reducir las pérdidas de material genético y reducir los costos en el mantenimiento, aumentar el tiempo de almacenamiento y optimizar las condiciones fitosanitarias (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). Sobre todo, en países como México donde sólo algunos de sus bancos de germoplasma colectan especies silvestres (Lascuráin *et al.*, 2009).

La conservación a largo plazo de los materiales vegetales requiere métodos sistemáticos de conservación *ex situ*, en donde se adaptan las técnicas para asegurar la supervivencia de genotipos de interés (Gogoi *et al.*, 2013).

Crioconservación en orquídeas

La crioconservación es buena opción para conservar semillas de orquídeas en bancos de germoplasma, porque puede mantener el material regenerativo de los tejidos embriogénicos (Merrit *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Además, cuando se almacenan tejidos vegetales a temperaturas ultra bajas

en nitrógeno líquido (NL) a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, los procesos metabólicos y de división celular se detienen y los caracteres fenotípicos y genotípicos del material vegetal se mantienen estables (Gonzalez-Arno y Engelmann, 2013).

En orquídeas se han usado con éxito la congelación programada (Pritchard y Prendergast, 1989), inmersión directa (Hirano *et al.*, 2005), precultivo-desección (Kondo *et al.*, 2001), deshidratación (Wu *et al.*, 2013), encapsulación-deshidratación (Khoddamzadeh *et al.*, 2011), precultivo-vitrificación (Galdiano *et al.*, 2013), vitrificación (Vettorazzi *et al.*, 2019), gota vitrificación (Cordova y Thammasiri, 2016) y encapsulación-vitrificación. Estas técnicas han sido útiles en diversas especies ya que se han obtenido porcentajes de regeneración de 60 a 70 % después de 30 min a 24 h de exposición a NL.

Inmersión directa

Las semillas de orquídeas crioconservadas por inmersión directa pueden ser almacenadas con alta probabilidad de germinación después de varios años, ya que el daño que se produce en las membranas favorece el acceso de los nutrientes del medio de cultivo hacia el embrión (Nikishina, 2001).

En semillas de *Bletilla formosana* (Hayata) inmersas en nitrógeno líquido durante 10 min y 1 año, observaron porcentajes de germinación de 83.7 y 90.1 %, respectivamente, que son significativamente mayores a las semillas no inmersas en con NL (79 %) (Hu *et al.*, 2013). Para semillas de *Bratonia* crioconservadas durante 1 mes en crioviales bajo la técnica de inmersión directa se evaluó la viabilidad y el desarrollo de los protocormos. Se obtuvo una tasa de germinación del 100 % en comparación con el testigo sin inmersión en NL. La formación de protocormos se observó 45 días después de la siembra en donde las semillas provenientes de la crioconservación fueron visualmente superiores al tratamiento sin inmersión en NL (Galdiano *et al.*, 2013).

La crioconservación ha sido útil aplicada en semillas de algunas especies de orquídeas como *Bratonia*, *Bletilla striata*, *Dendrobium nobile*, *Dendrobium*, *Brassidium*, *Cymbidium* y *Paphiopedilum* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Crioconservación de orquídeas por inmersión directa.

Especie	Regeneración (%)	Tiempo en NL	Referencia
<i>Bratonia</i> 'Miltonia flavescens X <i>Brassia longissima</i> '	88	1 h	Popova <i>et al.</i> , 2003
<i>Bratonia</i>	-	-	Popova <i>et al.</i> , 2004
<i>Bletilla striata</i>	82	30 m	Hirano <i>et al.</i> , 2005
<i>Dendrobium nobile</i>	-	-	Wang <i>et al.</i> , 1998
<i>Dendrobium</i>	50	1 h	Vendrame <i>et al.</i> , 2007
<i>Paphiopedilum niveum</i>	-	-	Pritchard <i>et al.</i> , 1999

- Datos no mostrados.

Una desventaja de esta técnica es el contenido de agua en las semillas recién cosechadas por la formación intracelular de cristales de hielo, como se observó en semillas de *Bletilla formosana* con 48.9 % de humedad que presentaron 1.8% viabilidad y 2.3 % germinación después de la inmersión en NL; mientras que semillas de la misma especie deshidratadas por 24 h con gel de sílice 1 h antes de la inmersión en NL incrementaron la viabilidad y germinación en 44.9 y 86.8 %, respectivamente (Rung-Yi *et al.*, 2013).

La desecación puede ser simple al exponer el material bajo una corriente de aire estéril o en desecador con gel de sílice precedido por deshidratación osmótica, antes de la inmersión rápida en NL. Este puede ser el único requisito en un protocolo de crioconservación como demostraron Geng *et al.* (2011) en polen de *Gladiolus*, Honda *et al.* (2002) en polen de *Delphinium* L. y Kim *et al.* (2006) y Seo *et al.* (2007) en embriones somáticos y ápices de *Paeonia lactiflora* Pall. Esta técnica, también fue eficaz para el almacenamiento de semillas de *Lilium ledebourii* (Baker) Bioss (Kaviani *et al.*, 2009).

Hazubska-Przybył *et al.* (2010) modificaron la técnica de desecación al precultivar tejido embriogénico de *Picea omorika* (Pančić) Purk. durante 7 días en sacarosa, secar al aire por 2 horas y colocar en NL; sin embargo, con este método se perdió el material debido a la contaminación.

El precultivo se puede tratar como una técnica de crioconservación sólo, o como la primera fase de un protocolo más complejo. En varias especies, el precultivo es la única condición necesaria para proteger los tejidos de la influencia por las bajas temperaturas. Hitmi *et al.* (2000), al cultivar ápices de *Crisantemo cinarariefolium* durante 30 días en medio MS con sacarosa 0.55 M + ABA 4 mM, obtuvieron 76 % de regeneración. Halmagyi *et al.* (2004) precultivaron ápices de crisantemo en DMSO 7.5 % durante 2 horas y obtuvieron 28 % de regeneración. Al modificar la etapa de precultivo anterior a la desecación y al

enfriamiento con mayor tiempo de exposición, se puede incrementar la regeneración de los tejidos (Pence, 1995).

Técnicas criogénicas basadas en la deshidratación osmótica y física de los tejidos

El uso de técnicas de crioconservación de estructuras organizadas como ápices y embriones requiere que los tejidos estén lo suficientemente deshidratados antes de ser sumergidos en NL, para evitar la cristalización debido a los cambios en la estructura celular, el deterioro de la membrana plasmática y la alteración de la actividad enzimática, ya que existe la posibilidad que se forme hielo intracelular (Rahmah *et al.*, 2015).

La deshidratación osmótica se efectúa a través de soluciones químicas como sacarosa, sorbitol, etilenglicol, trehalosa y glicerol, que reducen los daños a las células durante su congelamiento y/o calentamiento. Estos agentes vitrificantes protegen a las células vegetales de lesiones por congelación, al impedir la nucleación de cristales de hielo, además las células vitrificadas están libres del peligro de congelación intracelular (Reed y Uchendu, 2008).

La crioprotección está en función del tiempo de exposición por temperatura por permeabilidad del protector y la longitud de la vía de difusión que está determinada por la geometría de la muestra. Factores que proporcionan la deshidratación óptima para evitar toxicidad química. La heterogeneidad en la morfología, la fisiología y la química celular de los tejidos vegetales influyen en el éxito de la crioprotección y la conservación (Nadarajan y Pritchard, 2014).

Las técnicas criogénicas más comunes que requieren de crioprotectores son: vitrificación, encapsulación-vitrificación, gota-vitrificación y V crío-lámina; de igual forma se utilizan las técnicas con deshidratación física: deshidratación, encapsulación-deshidratación y D crío-lámina (González-Arno y Engelmann, 2013).

Crioconservación basada en la vitrificación

La vitrificación es un proceso en el que una solución acuosa concentrada se solidifica en un cristal amorfo estable cuando disminuye la temperatura y no se forman cristales de hielo que pueden causar lisis en las células (Sakai, 2004). La difusión de sustratos y productos dentro de la célula se restringen durante

este proceso, lo que lleva a la célula a un estado de quiescencia metabólica. Estas características del estado vítreo suprimen el deterioro de los sistemas biológicos (Santos, 2000).

Las soluciones altamente concentradas llamadas PVS (soluciones vitrificadoras de plantas por sus siglas en inglés: *Plants vitrification solution*) forman fácilmente la vitrificación al eliminar parcial o totalmente el agua congelable de la célula (Sakai, 2004; Taylor *et al.*, 2004). Estas soluciones combinan crioprotectores que varían en la permeabilidad (por ejemplo, el Dimetilsulfóxido (DMSO)) y el glicerol, de tal manera que se sustituye el agua celular, la viscosidad en las células se incrementa y el comportamiento de la congelación del agua restante se altera (Volk y Walters, 2006). Es necesario considerar que cuando el agua se elimina rápidamente del protoplasma se puede ocasionar daños celulares al no soportar la tensión osmótica (Volk y Caspersen, 2007). Estas sustancias pueden ocasionar variación somaclonal como se observó en *Dendrobium* Bobby Messina al comparar material criopreservado con PVS2 y el tratamiento sin método criogénico, por lo que se recomienda realizar análisis de ADN (Antony *et al.*, 2015 b).

En híbridos de orquídeas con importancia económica para la industria, se han conservado con éxito diversos tejidos (Rajasegar *et al.*, 2015) mediante variantes de la técnica de vitrificación (Cuadro 2). También se ha utilizado en semillas de orquídeas al ser rápida, simple, confiable y de costo bajo (Vendrame *et al.*, 2007). En semillas maduras de *Oncidium flexuosum* Sims., expuestas a la PVS2, se observó que el tiempo de exposición, puede aumentar la eficacia de los protocolos de vitrificación para la criopreservación de las semillas de esta orquídea (Galdiano *et al.*, 2013). Para semillas del híbrido de *Dendrobium*, la criopreservación se logró al combinar una baja temperatura previa a la inmersión en NL y la deshidratación con la solución vitrificadora PVS2, lo cual fue esencial para permitir el 50 % de semillas germinadas y a su vez desarrollarlas a plántulas sin cambios fenotípicos (Vendrame *et al.*, 2007).

La deshidratación con la solución vitrificadora PVS2 en cuerpos parecidos a protocormos (PLBs) del híbrido *Ascocenda Wangsa Gold* y la combinación de un descongelamiento rápido a 45 °C aumentó la formación de brotes (47 %). Además, la incubación por 7 días en oscuridad aumentó en 20 % la formación de brotes sobre los PLBs expuestos sólo a la solución PVS2. Bajo estas condiciones de criopreservación no se mostró alteración fenotípica en las plántulas formadas (Rajasegar *et al.*, 2015).

Cuadro 2. Orquídeas crioconservadas por el método de vitrificación.

Especie	Tejido	Crioprotector	Descongelamiento	NL	Crecimiento (%)	Referencia
<i>Ascocenda</i>	PLBs	PVS2 (30 min)	45 °C (85 s)	24 h	47	Rajasegar <i>et al.</i> , 2015
<i>Ascocenda</i>	PLBs	PVS2 (30 min)	45 °C (85 s)	1 h	47	Rajasegar <i>et al.</i> , 2015
<i>Bletilla formosana (Hayata) Schltr.</i>	Semilla	PVS2 (30 min)	Sin	30 min	94	Hu <i>et al.</i> , 2013
<i>Bletilla striata (Rchb. F.)</i>	Embrión cigotico	PVS2 (3 h)	ND + 1.2 M sacarosa (10 min)	30 min	60	Ishikawa <i>et al.</i> , 1997
<i>Dendrobium</i>	Polen	PVS2 (4 h)	1.0 M sacarosa (1 h)	48 h	80	Vendrame <i>et al.</i> , 2008
<i>Dendrobium</i>	Polen	PVS2 (4 h)	1.0 M sacarosa (1 h)	48 h	80	Vendrame <i>et al.</i> , 2008
<i>Dendrobium chrysotowum</i>	Semilla	PVS2 (50 min)	40 °C (2 min)	24 h	99	Thammasiri, 2016
<i>Dendrobium cruentum</i>	Semilla	PVS2 (30 min)	40 °C (2 min)	24 h	32	Thammasiri, 2016
<i>Dendrobium cruentum</i>	Protocormo	PVS2 (240 min)	40 °C (2 min)	24 h	33	Thammasiri, 2016
<i>Dendrobium draconis</i>	Semilla	PVS2 (30 min)	40 °C (2 min)	24 h	95	Thammasiri, 2016
<i>Dendrobium nobile</i>	Protocormo	PVS2 (10 min)	40 °C (1.5 min)	60 d	68	Vendrame y Faria, 2011
<i>Doritaenopsis</i>	Células suspensión	PVS2 (1 h)	35 °C (2 min)	15 min	65	Tsukazaki <i>et al.</i> , 2000
<i>Doritis pulcherrima</i>	Semilla	PVS2 (50 min)	40 °C (2 min)	24 h	62	Thammasiri, 2016
<i>Doritis pulcherrima Lindl</i>	Semilla	PVS2 (50 min)	Sacarosa 1.2 M + Vacin y Went 25 °C (20 min)	24 h	62	Thammasiri, 1999
<i>Oncidium flexuosum</i>	Semilla	PVS2 (120 min)	40 °C (90 s)	30 min	48	Galdiano <i>et al.</i> , 2013

<i>Rhynchostylis coelestis</i>		Semilla	PVS2 (50 min)	40 °C (2 min)	24 h	85	Thammasiri, 2016
<i>Rhynchostylis gigantea</i>		Protocormo	PVS2 (60 min)	40 °C (2 min)	24 h	19	Thammasiri, 2016
<i>Seidenfadenia mitrata</i>		Protocormo	PVS2 (80 min)	40 °C (2 min)	24 h	67	Thammasiri, 2016
<i>Vanda coerulea</i>		Semilla	PVS2 (70 min)	40 °C (2 min)	24 h	67	Thammasiri, 2016
<i>Brsasidium</i> Shooting Star		PLBs	PVS3 (20 min)	40 °C (90 s) Solución de lavado 10 - 40 min	24 h	17	Mubbarakh <i>et al.</i> , 2014
<i>Dendrobium</i> Bobby Messina		PLBs	PVS2 (20 min)	40 °C (90-120 s) Solución de lavado 20 min	24 h	NO	Antony <i>et al.</i> , 2010
<i>Dendrobium</i> Bobby Messina		PLBs	PVS2 (20 min)	40 °C (90 s) Solución de lavado	24 h	40	Antony <i>et al.</i> , 2013
<i>Paphiopedilum niveum</i>		PLBs	PVS2 (90 min)	40 °C (2 – 3 min)	1 h	22	Chaireok <i>et al.</i> , 2016
<i>Paphiopedilum niveum</i>		Callos	PVS2 (100 min)	40 °C (2 – 3 min)	1 h	22.22	Chaireok <i>et al.</i> , 2017

NO= resultados basados en la viabilidad con la prueba de tetrazolio.

Estos estudios confirman que la crioconservación mediante vitrificación permite la conservación *ex situ* de germoplasma vegetal (Ibrahim y Normah, 2013). Sin embargo, se deben optimizar las técnicas para cada especie. Además, el tiempo de penetración de las soluciones vitrificadoras en la membrana celular dependen del tipo de tejido y pueden ser de 20 a 70 min para asegurar una deshidratación adecuada y evitar efectos citotóxicos (Ibrahim y Normah, 2013).

Técnica de encapsulación-vitrificación (E-V)

Con esta técnica, el material vegetal es recubierto por una solución de alginato y goteado en una solución de calcio, para después exponer las cápsulas a las soluciones vitrificadoras, esto le otorga ventajas de protección física sobre los métodos tradicionales de crioconservación y puede tener amplias aplicaciones para el almacenamiento de germoplasma (Hirai y Sakai, 1999) (Cuadro 3).

La E-V se ha utilizado en PLBs de *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl., los cuales se encapsularon y deshidrataron con la solución vitrificadora PVS2 adicionada con 0.5 M de sacarosa durante 150 min y expuestos durante 1 h en NL. A los 60 días se observó 85 % de supervivencia y se regeneraron plántulas sin alteraciones morfológicas (Yin y Hong, 2009). *Caladenia latifolia* se ha establecido como modelo en especies de orquídeas terrestres debido al porcentaje alto de supervivencia después de la crioconservación, con la que se determinó la solución vitrificadora óptima para su almacenamiento a largo plazo; estos protocolos proporcionan información para avanzar en la crioconservación de otros taxones de orquídeas (Bustam *et al.*, 2015).

Cuadro 3. Orquídeas crioconservadas por el método de encapsulación-vitrificación.

Especie	Tejido	Crioprotector (min)	Descongelamiento (min)	NL (h)	Crecimiento (%)	Referencia
<i>Brassidium</i> 'Shooting Star's'	PLBs	PVS2 (40)	1.2 M sacarosa (15)	1	73	Rahmah <i>et al.</i> , 2015
<i>Dendrobium candidum</i>	PLBs	PVS2 (150)	40 °C (3)	1	85	Yin y Hong, 2009
<i>Dendrobium cariniferum</i>	Protocormo	PVS2 (60)	40 °C (2)	24	15	Thammasiri, 2016
<i>Dendrobium chrysanthum</i> (Wall. ex Lindl.)	PLBs	PVS2 (100)	38 °C (2)	1	63	Mohanty <i>et al.</i> , 2013
<i>Dendrobium cruentum</i>	Protocormo	PVS2 (50)	40 °C (2)	24	27	Thammasiri, 2016
<i>Dendrobium hercoglossum</i>	Semilla	PVS2 (80)	40 °C (2)	24	80	Thammasiri, 2016
<i>Paphiopedilum niveum</i>	Callos	PVS2 (100)	40 °C (2 – 3)	1	29.63	Chaireok <i>et al.</i> , 2017

Técnica de gota-vitrificación (Gota-V)

Consiste en exponer el tejido vegetal a las soluciones crioprotectoras. Posteriormente, se extrae la mayor cantidad de agua por exposición en una solución vitrificadora (PVS), las muestras se transfieren en gotas de PVS (5-10 µL) y se colocan en una lámina de aluminio, para finalmente ser inmersas directamente en NL. Hasta hace unos diez años, se realizaron 219 estudios en especies de orquídeas, con lo que se obtuvieron porcentajes de supervivencia entre 6 y 100 % con promedio de regeneración de plantas hasta de 40 % (Sakai y Engelmann, 2007) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Orquídeas crioconservadas con el método de gota-vitrificación.

Especie	Tejido	Crioprotector (min)	Descongelamiento	Crecimiento (%)	Referencia
<i>Caladenia latifolia</i>	Protocormo	PVS2 (20)	40 °C (10 s)	85	Bustam <i>et al.</i> , 2015
<i>Dendrobium</i>	Semilla	PVS2 + 1 % de floriglucinol (60)	MS 50 % + 1.2 M sacarosa (20 min)	79	Galdiano <i>et al.</i> , 2012

<i>Dendrobium</i>	Protocormo	PVS2 + 1 % de floroglucinol (15)	MS 50 % + 1.2 M sacarosa (20 min)	14	Galdiano <i>et al.</i> , 2012
-------------------	------------	----------------------------------	-----------------------------------	----	-------------------------------

Técnicas de crioconservación basadas en la deshidratación

La técnica de deshidratación fue reportada por primera vez por Uragami *et al.* (1990) en yemas axilares de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) cultivadas *in vitro*. En esta técnica los tejidos vegetales se colocan sobre papel filtro o malla de nylon estéril para ser deshidratados en gel de sílice (Uragami *et al.*, 1990) o en la campana de flujo laminar (Kuranuki y Yoshida, 1996), antes de la inmersión en NL. La humedad óptima de las muestras debe oscilar de 10 a 30 % para obtener una mayor supervivencia (Kuranuki y Yoshida, 1996). Después de la deshidratación, el germoplasma se coloca en un criotubo y se sumerge en NL. El material crioconservado se puede recalentar a temperatura ambiente o con agua caliente (40 ± 1 °C) durante 1 o 2 min, una vez alcanzada la temperatura ambiente las muestras deben ser recultivadas (Kami, 2012).

Esta técnica puede ser superior a la vitrificación debido a que no es necesario el uso de soluciones vitrificadoras que pueden ser tóxicas para los tejidos vegetales, además de su bajo costo. Sin embargo, los problemas que enfrenta la deshidratación están ligados a la influencia de la humedad en la campana de flujo laminar y las muestras secas pueden ser fácilmente aplastadas con las pinzas durante su manipulación (Zalewska y Kulus, 2014; Popova *et al.*, 2016)

Técnica de encapsulación-deshidratación

Esta técnica se basa en la tecnología desarrollada para la producción de semillas artificiales. Se modificó por primera vez para ápices de *Solanum tuberosum* por Fabre y Dereuddre (1990). Los explantes se encapsulan en perlas de alginato, posteriormente se realiza un precultivo en medio líquido enriquecido con sacarosa de 1 a 7 días, después son parcialmente desecados en la corriente de aire de la campana de flujo laminar o con gel de sílice hasta obtener 20 % de humedad en las cápsulas (base de peso en fresco), en seguida son sumergidas en NL (Dereuddre *et al.*, 1991). Esta técnica tiene como ventaja la fácil manipulación de las muestras encapsuladas, se presenta menor pérdida del material por aplastado de las pinzas en comparación con el método de deshidratación (Kami, 2012).

Se tiene una supervivencia alta y la recuperación de las muestras generalmente es rápida y directa, sin la formación de callos. Esta técnica se ha aplicado en ápices de numerosas especies de orquídeas de origen templado y tropical, así como, células en suspensión y embriones somáticos (Cuadro 5). Por la facilidad en la reproducción del protocolo, la metodología se ha extendido en todo el mundo de la misma manera que la vitrificación y la encapsulación-vitrificación, además se a estandarizado el mantener las muestras inmersas en nitrógeno líquido durante 24 h para determinar los experimentos (Engelmann y Takagi, 2000).

Cuadro 5. Orquídeas crioconservadas con la técnica de encapsulación-deshidratación.

Especie e híbridos	Tejido	Precultivo	Deshidratación (h)	Crecimiento (%)	Referencia
<i>Brasidium</i>	PLBs	0.8 M sacarosa (24 h)	Gel de sílice (3)	30	Rahmah <i>et al.</i> , 2015
<i>Brassidium</i>	PLBs	0.75 M sacarosa (24 h)	Gel de sílice (4)	Viables	Rajasegar <i>et al.</i> , 2015b
<i>Dendrobium</i>	PLBs	0.75 M sacarosa (24 h)	Gel de sílice (3)	Viables	Zainuddin <i>et al.</i> , 2011
<i>Dendrobium heterocarpum</i> (Lindl)	Protocormo	0.25 M sacarosa (1 semana)	Flujo laminar (12)	8	Pimda y Bunnag, 2010
<i>Dendrobium Walter</i>	Ápice	0.3 M sacarosa (2 d)	Flujo laminar (6-8)	13	Lurswijidjarus y Thammasiri, 2004
<i>Phalaenopsis bellina</i>	PLBs	0.75 M sacarosa (3 días)	Gel de sílice (5)	30	Khoddamzadeh <i>et al.</i> , 2011

Crío-lámina

Es una modificación reciente derivada del método de vitrificación, en el que se utiliza una lámina de aluminio (Yamamoto *et al.*, 2012; Niino *et al.*, 2013). Los explantes se colocan en los pocillos que contienen las crío-láminas de aluminio y se adhieren mediante gotas pequeñas formadas de alginato de calcio. Después se tratan con la solución de carga (sacarosa y glicerol) y son deshidratados osmóticamente con las soluciones vitrificadoras (protocolo crío-lámina V) o deshidratados de forma física cuando se colocan en la corriente de aire de la campana de flujo laminar o con el uso del gel de sílice (protocolo crío-

lámina D) antes la inmersión en NL. La principal ventaja de esta técnica radica en que facilita la manipulación de los explantes, que se adhieren a la crio-lámina (Salma *et al.*, 2014).

Se han aplicado ambos protocolos en cultivares ornamentales, con crio-lámina V se obtuvo éxito en crisantemo (*Chrysanthemum Dalmacia*) (Yamamoto *et al.* 2011) y clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) (Sekizawa *et al.*, 2011); mientras que, en crio-lámina D se estudió en crisantemo (*Chrysanthemum* sp.) (Tanaka *et al.*, 2014). Las tasas de enfriamiento y calentamiento en los explantes tratados dan como resultado, que la tasa de rebrote sea superior al 50 % para algunas de las especies mencionadas. Sin embargo, algunas especies muestran baja regeneración debido a su sensibilidad a la PVS2 (Niino *et al.*, 2013). Por tal motivo aún es necesario estandarizar este procedimiento (Niino *et al.*, 2014) en especial para orquídeas tropicales.

Estabilidad del material crioconservado

La exposición a un ambiente físico excesivo como lo son temperaturas muy bajas, la alta presión osmótica, la deshidratación y la exposición a ciertos productos químicos como los crioprotectores durante los procedimientos de crioconservación pueden causar estrés físico y, en consecuencia, provocar inestabilidad genética de los explantes (Panis y Lambardi, 2005). Esta variabilidad ha sucedido en PLBs de *Brassidium* Shooting Star donde los análisis histológicos y de microscopía revelaron cambios en su estructura, estas alteraciones pueden ser ocasionadas por el impacto por lesiones en las células durante la exposición al nitrógeno líquido, debido a que la proteína soluble aumenta por el estrés recibido durante el proceso de crioconservación. Las proteínas peroxidasa de ascorbato y catalasa mostraron actividades enzimáticas más altas durante la deshidratación, así como en la crioconservación con exposición a la solución PVS2 durante 40 min. Sin embargo, en los PLBs se observó la presencia de células intactas que indican la capacidad de recuperación de los tejidos y la posibilidad de regeneración de las muestras (Rahmah *et al.*, 2015b).

En *Dendrobium* Bobby Messina se realizaron diferentes análisis para determinar si existe una estabilidad en el material proveniente de PLBs crioconservados. El análisis morfológico de la segunda generación mostró una similitud en el diámetro y longitud de la hoja y en el tamaño de los PLBs comparados con el tratamiento control. El análisis histológico mostró células homogéneas y citoplasma más denso. El análisis RAPD basado en 10 marcadores indicó que de 20 a 39.9 % de las bandas son

polimórficas comparadas con el control que presentó variación somaclonal. Lo que muestra la estabilidad en la crioconservación al utilizar el método de vitrificación (Antony *et al.*, 2015).

De forma similar en los PLBs del híbrido de la orquídea *Brassidium* 'Shooting Star' se realizó análisis histológico después de ser tratados con la solución PVS3 durante 20 min antes de la inmersión en NL. Los análisis mostraron citoplasma más denso, así como el núcleo voluminoso y menos células dañadas por la acción del nitrógeno líquido. El núcleo mostró mayor tasa de materiales de almacenamiento y la estructura de las membranas celulares y paredes permanecieron intactas con una forma poliédrica (Mubbarakh *et al.*, 2014).

En material crioconservado las pruebas de viabilidad se deben realizar antes y después de la inmersión en NL, debido a la aplicación de los diferentes productos químicos, empleados para proteger el material vegetal de los efectos perjudiciales de la congelación, ya que pueden ser responsables de la pérdida de viabilidad (Hosomi *et al.*, 2012).

Viabilidad semillas

El almacenamiento de semillas debe estar respaldada por una prueba de viabilidad apropiada, ya que el éxito de cualquier protocolo de crioconservación está determinado por la recuperación de individuos viables (Teixeira da Silva *et al.*, 2014). La viabilidad varía entre especies y poblaciones, depende de las características físicas y fisiológicas de las semillas las cuales se ven afectadas por factores bióticos y abióticos (Long *et al.*, 2015). Por lo tanto, es importante que en las pruebas de viabilidad se determine un rango de entre 0 a 100 % de explantes supervivientes.

La prueba de viabilidad por las sales de 2, 3, 5-Trinfenil-2 H Cloruro Tetrazolio (TTC) es una técnica válida para determinar la viabilidad de las semillas de orquídeas (Aguilar-Morales *et al.*, 2016) y es de las más utilizadas debido a que es una técnica simple y de bajo costo. Esta técnica es recomendada por la Organización Internacional de Pruebas de Semillas (por sus siglas en inglés *International Seed Organization Testing* ISTA) y se utiliza para determinar la viabilidad con base en la actividad bioquímica de los tejidos vegetales (Van-Waes y Debergh, 1986).

Para algunas especies de orquídeas se reporta un aumento en la precisión de la prueba de TTC cuando se realizan pretratamientos con soluciones de sacarosa durante la imbibición de las semillas

(Teixeira da Silva *et al.*, 2014). Esto sucede porque, las deshidrogenasas a través de la respiración en las mitocondrias reducen la TTC incolora a la trifenil formarón roja o la TTC reducida (Verleysen *et al.*, 2004). La actividad de la deshidrogenasa de las semillas podría ser promovida por el NaClO, como se reportó en semillas de *Paphiopedilum* donde se obtuvo 44.1 % de semillas teñidas con TTC y de 58.1 % de germinación después de un tratamiento con NaClO (0.5 % cloro disponible) durante 60 min (Fu *et al.*, 2016).

Otras técnicas bioquímicas se basan en el seguimiento de hidrocarburos volátiles que se relacionan con el estrés (Benson y Withers, 1987), como la reacción de compuestos tóxicos (MDA) en el ADN de las células o las proteínas (formación de bases de Schiff) (Lunec y Dormandy, 1979) y la estabilidad de los grupos sulfhídrico (Chevrier *et al.*, 1988); la determinación de clorofila (Harborne, 1973) así como la tinción de los tejidos utilizando el azul de Evans (Zainuddin *et al.*, 2011).

Existen técnicas como el análisis histológico y microscopía electrónica de barrido, las cuales muestran si el proceso celular se modificó por efecto de la congelación y descongelación, o debido a la deshidratación. El resultado histológico indica el grado de plasmólisis a causa de la crioconservación. El análisis de microscopía electrónica de barrido indica que grado de plasmólisis provoca cambios en los procesos celulares de PLBs crioconservados (Antony *et al.*, 2013).

Desinfección *in vitro*

La desinfección antes de la germinación *in vitro* es muy importante porque de manera natural las orquídeas dependen de hongos micorrízicos para germinar (Chávez *et al.*, 2014). Sin embargo, en la siembra asimbiótica de semillas de orquídeas, estos hongos deben ser eliminados durante la desinfección para evitar su presencia (contaminación) en el medio de cultivo, aunque, de igual forma se busca no perder la viabilidad de los embriones por acción del agente desinfectante (Billard *et al.*, 2014; Duan *et al.*, 2016).

El hipoclorito de sodio (NaClO) se utiliza como desinfectante en cultivo *in vitro* porque es efectivo para eliminar la mayor parte de los contaminantes; además, se ha observado que en semillas inmaduras de *Calanthe discolor* Lindl. promueve la imbibición de los embriones hasta en 82 % en comparación con las semillas no tratadas (Bae *et al.*, 2015). En semillas inmaduras de *Oreorchis patens* (Lindl) Lindl. tratadas con NaClO se registró un aumento significativo en el grado de imbibición en los embriones, y la formación de protocormos en comparación con el control sin NaClO (29.1 y 90.7 %; 10.8 y 58.8 %, respectivamente) (Bae *et al.*, 2014). Mientras que, en *Byrsonima intermedia* se reporta que la variación del pH y los periodos

de exposición al NaClO afectan de manera positiva el porcentaje de plántulas normales (26 %), la longitud del brote (2.7 mm) y el número de hojas (1.8) (Silva *et al.*, 2015).

El hipoclorito de calcio y el peróxido de hidrógeno se utilizan como desinfectante tópico en semillas, para mejorar la germinación y acelerar la aparición de plántulas sanas. Se cree que la liberación de oxígeno molecular, conduce a un metabolismo aeróbico mejorado en los embriones y las plántulas jóvenes. El hipoclorito de calcio y sodio son alcalino y pierden cloruro, el ion oxidante activo, que captura oxígeno, matando los microorganismos aeróbicos y las esporas de hongos (Álvarez-Pardo *et al.*, 2006).

Otros desinfectantes como acetato cúprico reducen la contaminación, pero no es económicamente aceptable. La desinfección de los explantes pueden lograrse mediante el uso de cloruro de mercurio (Pernezny *et al.*, 2002), sin embargo, es un compuesto altamente tóxico.

CONCLUSIONES

Debido al comportamiento semiortodoxo que presentan las orquídeas, es necesario optimizar las herramientas biotecnológicas como la crioconservación *in vitro* para el almacenamiento, propagación y reintroducción en los hábitats correspondientes. En orquídeas silvestres es necesario optimizar o definir las técnicas criogenicas para lograr almacenar gran parte de la biodiversidad ya que, la aceleración que presenta el cambio climático junto con el desarrollo de las orquídeas es un desafío que debemos superar.

LITERATURA CITADA

- ABae K. H., K. H. Oh and S. Y. Kim. 2014. **Sodium hypochlorite treatment and light-emitting diode (LED) irradiation effect on *in vitro* germination of *Oreorchis patens* (Lindl.) Lindl.** *Journal of Plant Biotechnology* 41(1): 44-49.
- Aguilar-Morales M. A., A. Laguna-Cerda, C. Vences-Contreras y H. E. Lee-Espinosa. 2016. **Análisis de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) para su conservación *ex situ*.** *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(7): 1741-1747.
- Álvarez-Pardo V. M., A. G. Ferreira and V. F. Nunes. 2006. **Seed desinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil.** *Horticultura Brasileira* 24: 217-220.
- Antony J. J. J., C. L. Keng, X. Rathinam, U. R. Sinniah and S. Subramaniam. 2010. **Preliminary study on cryopreservation of *Dendrobium Bobby Messina* protocorm-like bodies by vitrification.** *African Journal of Biotechnology* 9(42): 7063-7070.
- Antony J. J. J., L. K. Wai, Y. Oyunbileg and S. Subramaniam. 2015. **Characterization of the second generation cryopreserved *Dendrobium Bobby Messina* using histological and RAPD analyses.** *Mongolian Journal of Biological Sciences*. 13(1-2): 13-18.
- Antony J. J. J., R. A. Shamshir, R. Poobathy, B. L. Chew and S. Subramaniam. 2015. **Somaclonal variations were not induced by the cryopreservation: levels of somaclonal variations of *in vitro* and thawed protocorms of *Dendrobium Bobby Messina* analysed by SCoT and TRAP DNA markers.** *South African Journal of Botany* 100(2015): 148–157.
- Antony J. J. J., S. A. Mubbarakh, M. Mahmood and S. Subramaniam. 2013. **Effect of plasmolysis on Protocorm-Like Bodies of *Dendrobium Bobby Messina* orchid following cryopreservation with encapsulation-dehydration method.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172: 1433-1444.
- Ávila D. I. y R. Salgado-Garciglia. 2006. **Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación.** *Biológicas* 8: 138-149.
- Bae K. H., K. H. Oh and S. Y. Kim. 2015. ***In vitro* seed germination and seedling growth of *Calanthe discolor* Lindl.** *Plant Breeding and Seed Science* 71(1): 109-119.
- Benson E. E. and L. A. Withers. 1987. **Gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbon production by cryopreserved plant tissue cultures: a non-destructive method for assessing stability.** *CryoLetters* 8: 35–46.
- Billard C. E., C. A. Dalzotto and V. H. Lallana. 2014. **Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*.** *Polibotánica* 38: 145-157.

- Bukhov N. G., E. V. Popova and A. S. Popov. 2006. **Photochemical activities of two photosystems in *Bratonia* orchid protocorms cryopreserved by vitrification method.** *Russian Journal of Plant Physiology* 53(6): 793-799.
- Bustam B. M., K. Dixon and E. Bunn. 2015. **A cryopreservation protocol for *ex situ* conservation of terrestrial orchids using asymbiotic primary and secondary (adventitious) protocorms.** *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 52(2): 185-195.
- Cardoso J. C., J. A. Teixeira da Silva y A. W. Vendrame. 2016. **Impacts of deforestation on some orchids of São Paulo State, Brazil.** *Natureza & Conservação* 14(1): 28-32.
- Chaireok S., K. Thammasiri and U. Meesawat. 2016. **Vitrification-based cryopreservation of Protocorm-Like Bodies of an endangered lady's slipper orchid: *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Stein.** *CryoLetters* 37(3): 154-162.
- Chaireok S., K. Thammasiri and U. Meesawat. 2017. **Cryopreservation of *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Stein calli using encapsulation-vitrification and vitrification methods.** *Acta Horticulture In I International Symposium on Tropical and Subtropical Ornamentals* 1167 p 55 – 62.
- Chávez H. K., A. T. Mosquera-Espinosa y J. T. O. Ospina. 2014. **Propagación *in vitro* de semillas de la orquídea *Comporettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas.** *Acta Agronomia* 64(2): 125-133.
- Chevrier N., F. Sarhan and Y. S. Chung. 1988. **Oxydative damage and repair in *Euglena gracilis* exposed to ozone I SH groups and lipids.** *Plant and Cell Physiology* 29: 321–327.
- Chugh S., S. Guha and U. I. Rao. 2009. **Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants.** *Scientia Horticulturae* 122: 507–520.
- Cordova II. L. B. and K. Thammasiri. 2016. **Cryopreservation on a cryo-plate of *Arundina graminifolia* protocorms, dehydrated with silica gel and drhying beads.** *CryoLetters* 37(2): 68-76.
- Dereuddre, J., M. Hassen, S. Blandin, and M. Kaminski. 1991. **Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 2. thermal analysis.** *CryoLetters* 12: 135–148.
- Duan Y., F. Zhao, H. Li, Y. Zhou, X. Zhu, F. Li, W. Chen and J. Xue. 2016. **Evaluation of aqueous chlorine dioxide for disinfecting plant explants.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52(1): 38-44.
- Engelmann F. 1991. ***In Vitro* Conservation of Tropical Plant Germplasm Review.** *Euphytica* 57: 227-243.
- Engelmann F. 1997. ***In vitro* conservation methods.** *In: Ford-Lloyd B. V., J. H. Newbury and J. A. Callow eds. Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use. Wallingford: CABI.* pp: 119–162.

- Engelmann F. 2011. **Use of biotechnology for the conservation of plant biodiversity.** *In Vitro Cell and Developmental Biology Plant* 47(1): 5–16.
- Engelmann F. and H. Takagi. 2000. **Cryopreservation of tropical plant germplasm-current research progress and applications.** *Tsukuba: JIRCAS International Agriculture Series; Rome: IPGRI* 496p.
- Fabre J. and J. Dereuddre. 1990. **Encapsulation Dehydration – A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips.** *Cryo-Letters* 11(5): 413-426.
- Fu Y. Y., N. Jiang, J. X. Zhang, J. A. Teixeira da Silva, J. Duan, H. T. Liu, and S. J. Zeng. 2016. **Stimulatory effects of sodium hypochlorite and ultrasonic treatments on tetrazolium staining and seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum* SCBG Red Jewel.** *Seed Science and Technology* 44(1): 77-90.
- Galdiano R. F., E. G. L. De Macedo and W. A. Vendrame. 2013. **Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flexuosum* Sims.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 114(1): 139-148.
- Galdiano R. F., E. G. Lemos, R. T. Faria and W. A. Vendrame. 2012. **Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000.** *Scientia Horticulturae* 148: 154-160.
- Geng X., B. Huang, F. Luo, Z. Wu and J. Qiu. 2011. **A study on cryopreservation of *Gladiolus* pollen.** *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science edition)* 35: 7-12.
- Gogoi K., S. Kumaria and P. Tandon. 2013. **Cryopreservation of *Cymbidium eburneum* Lindl. and *C. hookerianum* Rchb. f., two threatened and vulnerable orchids via encapsulation-dehydration.** *In vitro Cellular Developmental Biology – Plant* 49(3): 248-254.
- González-Arno M. T. and F. Engelmann. 2006. **Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane.** *Cryo Letters* 27(3): 155-168.
- González-Arno M. T. y F. Engelmann. 2013. **Consideraciones teóricas y prácticas para la crioconservación de germoplasma vegetal.** *In: Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe.* M. T. González-Arno y F. Engelmann (eds). *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José* pp37- 64.
- Halmagyi A., G. Fischer-Kluver, G. Mix-Wagner and H. M. Schumacher. 2004. **Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat) using different approaches.** *Plant Cell Report* 22: 371–375.
- Harborne J. B. 1973. **Phenolic compounds.** *In Phytochemical methods.* Springer Netherlands pp 33-88.

- Hay F. R., D. J. Merritt, J. A. Soanes and K. W. Dixon. 2010. **Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions.** *Botanical Journal of the Linnean Society* 164(1): 26-41.
- Hazubska-Przybył T., P. Chmielarz, M. Michalak and K. Bojarczuk 2010. **Cryopreservation of Embryogenic tissues of *Picea omorika* (Serbia spruce).** *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 102(1): 35–44.
- Hirai D. and A. Sakai. 1999. **Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification.** *Plant Cell Reports* 19(2): 150-155.
- Hitmi A., C. Barthomeuf and H. Sallanon. 2000. **Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips.** *Journal Plant Physiology* 156(3): 408–412
- Honda K., H. Watanabe and K. Tsutsui. 2002. **Cryopreservation of *Delphinium* pollen at –30 ° C.** *Euphytica* 126: 315–320
- Hosomi S. T., C. C. Custódio, P. T. Seaton, T. R. Marks and N. B. Machado-Neto. 2012. **Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage.** *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 48: 127-136.
- Hu W. H., Y. H. Yang, S. I. Liaw and C. Chang. 2013. **Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. by vitrification.** *Botanical Studies* 54 (33): 1-7.
- Ibrahim S. and M. N. Normah. 2013. **The survival of *in vitro* shoot tips of *Garcinia mangostana* L. after cryopreservation by vitrification.** *Plant Growth Regulation* 70(3): 237-246.
- Ishikawa K., K. Harata, M. Mii, A. Sakai, K. Yoshimatsu and K. Shimomura. 1997. **Cryopreservation of zygotic embryos of Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification.** *Plant Cell Report* 16: 754–757.
- Kami D. 2012. **Cryopreservation of plant genetic resources In: Currente Frontiers in Cryobiology.** I. Katkov (ed). *InTech* pp 574.
- Kaviani B., D. H. Abadi, A. M. Torkashvand and S. S. Hoor. 2009. **Cryopreservation of seeds of lily (*Lilium ledebourii* Baker Bioss): use of sucrose and dehydration.** *African Journal Biotechnology* 8(16): 3809–3810.
- Khoddamzadeh A. A., U. R. Sinniah, P. Lynch, M. A. Kadir, S. B. Kadzimin and M. Mahmood. 2011. **Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) christenson by encapsulation-dehydration.** *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 107(3): 471–481.
- Kim, H.M., J. H. Shin and J. K. Sohn. 2006. **Cryopreservation of somatic embryos of the herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by air drying.** *Cryobiology* 1(53): 69–74.

- Kondo K., I. V. Tatarenko, S. B. Varghese, Y. Iwai and K. Matsumoto. 2001. **Orchid cryopreservation using induced shoot primordia and protocorm-like bodies.** In P. Pathak, R. N. Sehgal, N. Shekhar, M. Sharma and A. Sood (Eds.). *Orchid: Science and Commerce. Dehra Dun* pp. 397-412.
- Kuranuki Y. and S. Yoshida. 1996. **Differential responses of embryogenic axes and cotyledons from tea seeds to desiccation and cryoexposure.** *Breeding Science* 46(2): 149-154.
- 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.
- Lascuráin M., R. List, L. Barraza, P. E. Díaz, S. F. Gual, M. Maunder, J. Dorantes and V. E. Luna. 2009. **Conservación de especies *ex situ*, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio.** *CONABIO, México* pp 517-544.
- Liu H., C. L. Feng, Y. B. Luo, B. S. Chen, Z. S. Wang and H. Y. Gu. 2010. **Potential challenges of climate change to orchid conservation in a wild orchid hotspot in southwestern China.** *Botanical Review* 76: 174–192.
- Long R. L., M. J. Gorecki, M. Renton, J. K. Scott, L. Colville, D. E. Goggin, L. E. Commander, D. A. Westcott, H. Cherry and W. E. Finch-Savage. 2015. **The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise.** *Biological Reviews* 90(1): 31-59.
- Lopez-Puc G. 2013. **An effective *in vitro* slow growth protocol for conservation of the orchid *Epidendrum chlorocorymgos* Schltr.** *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 16(1): 61-68.
- Lunec J. and T. L. Dormandy. 1979. **Fluorescent lipid-peroxydation products in synovial fluid.** *Clinical Science* 56: 53–59.
- Lurswijidjarusa W. and K. Thammasiri. 2004. **Cryopreservation of shoot tips of *Dendrobium Walter Oumae* by encapsulation/dehydration.** *Science Asia* 30: 293-299.
- Magrini S., S. Buono, M. De Vitis, G. Haile, M. Rempicci, E. Gransinigh, E. Scarici and M. Fonck. 2014. **Conservation of endemic, rare and threatened Italian orchids in Tuscia Germplasm Bank and Botanical Garden (Viterbo, Central Italy).** *Journal Europäischer Orchideen* 46(1): 103-114.
- Merritt D. J., F. R. Hay, N. D. Swarts, K. D. Sommerville and K. W. Dixon. 2014. ***Ex situ* conservation and cryopreservation of orchid germplasm.** *International Journal of Plant Sciences* 175(1): 46-58.
- Mira S., E. Estrelles and M. E. González-Benito. 2014. **Effect of water content and temperature on seed longevity of seven *Brassicaceae* species after 5 years of storage.** *Plant Biology* 17(1): 153-162.
- Mohanty P. M. C. Das, S. Kumaria and P. Tandon. 2012. **High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl.** *Plant Cell Tissue Organ Culture* 109: 297-305.
- Mohanty P., M. C. Das, S. Kumaria and P. Tandon. 2013. **Cryopreservation of pharmaceutically important orchid *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. using vitrification-based method.** *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 1373-1379.

- Mubbarakh S. A., S. Rahmah, Z. A. Rahman, N. N. M. Sah and S. Subramaniam. 2014. **Cryopreservation of *Brassidium* Shooting Star orchid using the PVS3 method supported with preliminary histological analysis.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172: 1131-1145.
- Muldrew K., J. P. Acker, J. A. W. Elliott and L. E. McGann. 2004. **The water to ice transition: implications for living cells.** In: Fuller B. J., N. Lane, E. E. Benson, (editors). *Life In The Frozen State. Florida: EE CRC Press LLC.* pp 67–108.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures.** *Physiologi Plantarum* 15: 473-497.
- Nadarajan J. and H. W. Pritchard. 2014. **Biophysical characteristics of successful oilseed embryo cryoprotection and cryopreservation using vacuum infiltration vitrification: and innovation in plant cell preservation.** *Plos one* 9(5): 1-11.
- Niino T, S. Yamamoto, K. Fukui, C. R. Castillo-Martínez, M. Valle-Arizaga, T. Matsumoto and F. Engelmann. 2013. **Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plates.** *CryoLett* 34: 549–560.
- Niino T., Wunna, K. Watanabe, N. Nohara, T. Rafique, S. Yamamonot, K. Fukui, M. V. Arizaga, C. R. C. Martínez, T. Matsumoto and F. Engelmann. 2014. **Cryopreservation of mat rush lateral buds by air dehydration using aluminum cryo-plate.** *Plant Biotechnology* 31(3): 281-287.
- Nikishina, T. V., A. S. Popov, G. L. Kolomeitseva, B. N. Golovkin. 2001. **Effect of cryopreservation on seed germination of rare tropical orchids.** *Russian Journal of Plant Physiology* 48: 810-815.
- Ogawa Y., N. Sakurai, A. Oikawa, K. Kai, Y. Morishita, K. Mori, K. Moriya, F. Fujii, K. Aoki, H. Suzuki, D. Ohta, K. Saito and D. Shibata. 2012. **Hightthroughput cryopreservation of plant cell cultures for functional genomics.** *Plant Cell Physiology* 53: 943–952.
- Panis B. and M. Lambardi. 2005. In Ruane J. and A. Sonnino (Eds.). **The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forest, animal and fishery genetic resources in developing countries.** *Turin: FAO* pp 61-78
- Pence V. C. 1995. **Cryopreservation of recalcitrant seeds.** In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 32, Cryopreservation of plant germplasm Bajaj I., YPS. Ed Berlin D. E. *Springer Verlag* 29-52.
- Pernezny K., R. Nagata, R. N. Raid, J. Collins and A, Carroll. 2002. **Investigation of seed treatments for management of bacterial leaf spot of lettuce.** *Plant Disease* 86(2): 151-155.
- Pimda W. and S. Bunnag. 2010. **Cryopreservation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl. via encapsulation-dehydration method.** *Extreme Life, Biospeology & Astrobiology International Journal of the Bioflux Society* 2(1): 7-14.

- Popova E. V., T. V. Nikishina, G. L. Kolomeitseva and A. S. Popov. 2003. **The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia***. *Russian Journal of Plant Physiology* 50(5): 672-677.
- Pritchard H. W. and F. G. Prendergast. 1989. **Factors influencing the germination and storage characteristics of orchid pollen**. *Modern Methods in Orchid Conservation*. p 1-16.
- Pritchard H. W., A. C. Poynter and P. T. Seaton. 1999. **Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-drying and cryopreservation**. *Lindleyana* 14:92-101.
- Rahmah S., S. A. Mubbarakh, K. S. Ping and S. Subramaniam. 2015b. **Effects of droplet-vitrification cryopreservation based on physiological and antioxidant enzyme activities of *Brassidium Shooting Star Orchid***. *The Scientific World Journal* 2015: 1-10.
- Rahmah S., S. A. Mubbarakha, U. R. Sinniahb and S. Subramaniam. 2015a. **Effects of droplet-vitrification on *Brassidium Shooting Star's* orchid protocorm-like bodies (PLBs)**. *Scientia Horticulturae* 197: 254–260.
- Rajasegar A., A. Mansor, R. Poobathy, E. Sivalingam, U. R. Sinniah and S. Subramaniam. 2015a. **An improved PVS2 cryopreservation technique for *Ascocenda Wangsa Gold* orchid using protocorm-like bodies**. *Turkish Journal of Biology* 39: 202-209.
- Rajasegar A., R. Poobathy, X. Rathinam, Y. Oyunbileg and S. Subramaniam. 2015b. **Cryopreservation of PLBs of *Brassidium Fly Away* using encapsulation-dehydration technique**. *Mongolian Journal of Biological Sciences* 13(1-2): 19-23.
- Reed B. M. and E. Uchendu. 2008. Controlled rate cooling. In: Reed B. M. (ed) **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, Berlin p 77– 92.
- Reyes-López D., C. H. A. Avendaño, R. A. Menchaca-García., M. T. González-Arnao, A. Pérez-Silva y M. Huerta-Lara. 2009. **Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Colecta, conservación *in vitro*, crioconservación y precursores aromáticos en la vainilla**. *Resúmenes Ejecutivos Ejercicio Fiscal 2009*, Semarnat, México pp 31.
- Rung-Yi W., C. Shao-Yu, H. Ting-Fang and C. Yu-Sen. 2013. **Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation**. *Scientia Horticulturae* 157: 108-112.
- Sakai A. 2004. **Plant cryopreservation**. In: B. J. Fuller, N. Lane, E. E. Benson, (editors). *Life In The Frozen State*. Florida: EE CRC Press LLC pp 329–346.
- Sakai A. and F. Engelmann. 2007. **Vitrification, Encapsulation-Vitrification and Droplet-Vitrification: A review**. *CryoLetters* 28(3): 151-172.
- Sakai A., S. Kobayashi and I. Oiyama. 1990. **Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification**. *Plant Cell Report* 9: 30–33.

- Salma M., I. Engelmann-Sylvestre, M. Collin, J. Escoute, M. Lartaud, Y. Jung-Yoon, K. Haeng-Hoon, V. Jean-Luc and F. Engelmann. 2014. **Effect of the successive steps of a cryopreservation protocol on the structural integrity of *Rubia akane* Nakai hairy roots.** *Protoplasma*. 251(3): 649-659.
- Sánchez-Chiang y V. M. Jiménez. 2010. **Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales.** *Agronomía Mesoamericana* 21(1): 193-205.
- Santos I. R. I. 2000. **Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal.** *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal* 12: 70-84.
- Sekizawa K., S. Yamamoto, T. Ra que, K. Fukui, T. Niino. 2011. **Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates.** *Plant Biotechnol* 28: 401–405.
- SEMARNAT. 2010. **Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio.** In: Lista de especies en riesgo. Instituto Nacional de Ecología. Disponible en: DIALOG. http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/normas/rec_nat/no_59.html *Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio.* Consultado el 25 de enero de 2017.
- Seo M. J., J. H. Shin and J. K. Sohn. 2007. **Cryopreservation of dormant herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) shoot-tips by desiccation.** *Cryo Letters* 28(3): 207–213.
- Shimonishi M., M. Ishikawa, S. Suzuki and K. Oosawa. 1991. **Cryopreservation of melon somatic embryos by desiccation method.** *Japanese Journal of Breeding* 41(2): 347-351.
- Silva L. C., R. Paiva, D. P. Vargas, D. P. Corrêa da Silva, S. Barbosa and R. C. Herrera. 2015. **Decontaminant solution on *in vitro* growth of *Byrsonima intermedia* seedlings.** *Ciência Rural* 45(4): 674-679.
- Silveira S. S., J. Degenhardt-Goldbach and M. Quoirin. 2016. ***In vitro* seed germination and multiplication of *Calophyllum brasiliense*.** *Pesquisa Florestal Brasileira. Colombo* 36(87): 185-193.
- Singh F. 1981. **Differential staining of orchid seeds for viability testing.** *American Orchid Society Bulletin* 50: 416-418.
- Swarts N. D. and K. W. Dixon. 2009. **Terrestrial orchid conservation in the age of extinction.** *Annals of Botany* 104(3): 543–556.
- Tanaka D., A. Akimoto-Kato, T. Niino and T. Matsumoto. 2014. **Cryopreservation of chrysanthemum using aluminium Cryo-plate protocol.** *Cryobiology* 69(3): 520-521.

- Taylor M. J., Y. C. Song and G. M. Brockbank. 2004. **Vitrification in tissue preservation: new development.** *In*: Fuller B. J., N. Lane, E. E. Benson, (eds). *Life In The Frozen State. Florida: EE CRC Press LLC* pp 603–634.
- Teixeira da Silva J. A. 2013. **Cryopreservation of hybrid *Cymbidium* protocorm-like bodies by encapsulation–dehydration and vitrification.** *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant* 49(6): 690–698.
- Teixeira da Silva J. A., S. Zeng, R. F. Jr. Galdiano, J. Dobránszki, J. C. Cardoso and W. A. Vendrame. 2014. ***In vitro* conservation of *Dendrobium* germplasm.** *Plant Cell Reports* 33: 1413-1423.
- Thammasiri K. 1999. **Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification.** *CryoLetters* 21(4): 237-244.
- Thammasiri K. 2016. **Conservation of thai orchid species using cryobiotechnology.** *БЮЛЛЕТЕНЬ ГНБС* pp 7-16.
- Tsukazaki H., M. Mii, K. Tokuhara and K. Ishikawa. 2000. **Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification.** *Plant Cell Reports* 19: 1160-1164.
- Uragami A., A. Sakai and M. Nagai. 1990. **Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*.** *Plant Cell Reports* 9(4): 328-331.
- Vacin E. F. and F. W. Went. 1949. **Some pH changes in nutrient solutions.** *Botanical Gazette* 110: 605-13.
- Van-Waes J.M. and P. C. Debergh. 1986. **Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids.** *Physiologia Plantarum* 66: 435–422.
- Vendrame W. A. And R. T. Faria. 2011. **Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms.** *Scientia Horticulturae* 128(2): 131-135.
- Vendrame W. A., V. S. Carvalho and 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, and I. Maguire. 2008. **Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen.** *HortScience* 43(1): 264-267.
- Vendrame W., R. T. de Faria, M Sorace and S. A. Sahyun. 2014. **Orchid cryopreservation.** *Ciência e Agrotecnologia* 38(3): 213-229.
- Verleysen H., G. Samyn, E. Van Bockstaele and P. Debergh. 2004. **Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 11-21.
- Vettorazzi R. G., V. S. Carvlho, M. C. Teixeira, E. Campostrini, M. Da Cunha, E. M. De Matos and L. F. Viccini. 2019. **Cryopreservation of immature and mature seeds of Brazilian orchids of the genus *Cattleya*.** *Scientia Horticulturae* 256:108603.

- Volk G. M. and A. M. Caspersen. 2007. **Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha x piperita***. *Protoplasma* 231(3-4): 215–226.
- Volk G. M. and C. Walters. 2006. **Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection**. *Cryobiology* 52(1): 48-61.
- Wang B., R. R. Wang, Z. H. Cui, W. L. Bi, J. W. Li, B. Q. Li, E. A. Ozudogru, G. M. Volk and Q. C. Wang. 2014. **Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication**. *Biotechnology Advances* 32(3): 583-595.
- Wang J. H., J. G. Ge, L. Feng, H. W. Bian and C. N. Huang. 1998. **Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum***. *Cryo Letters* 19:123-128.
- Wu R. Y., S. Y. Chang, T. F. Hsieh and Y. S. Chang. 2013. **Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation**. *Scientia Horticulturae* 157: 108-112.
- Yamamoto S., K. Fukui, T. Ra que, N. I. Khan, C. R. Castillo-Martínez, K. Sekizawa, T. Matsumoto and T. Niino. 2011. **Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of strawberry by the vitrification method using aluminium cryo-plates**. *Plant Genetic Resources* 10(1): 14–19.
- Yamamoto S., T. Ra que, K. Fukui, K. Sekizawa and T. Niino. 2012. **V-Cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation**. *CryoLetters* 33(1): 12–23.
- Yin L. L., R. Poobathy, J. James, A. L. Julkifle and S. Subramaniam. 2011. **Preliminary investigation of cryopreservation by encapsulation-dehydration technique on *Brassidium* Shooting Star orchid hybrid**. *African Journal of Biotechnology* 10(22): 4665-4672.
- Yin M. and S. Hong. 2009. **Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98(2): 179-185.
- Zainuddin, M., A. L. Julkifle, R. Pobathy, U. R. Sinniah, A. Khoddamzadeh, J. J. J. Antony, Pavallekoodi and S. Subramaniam. 2011. **Preliminary analysis of cryopreservation of *Dendrobium Bobby Messina* orchid using an encapsulation-dehydration technique with Evans blue assay**. *African Journal of Biotechnology* 10(56): 11870-11878.
- Zalewska M. and D. Kulus. 2014. **Improvement of *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitam. Encapsulation-dehydration cryopreservation protocol**. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus* 13(2): 97-108.

CAPITULO II. ARTÍCULO II. EFECTIVIDAD DE MÉTODOS PARA DESINFESTAR SEMILLAS DE *Laelia autumnalis* PARA LA CONSERVACIÓN EN NITRÓGENO LÍQUIDO

CHAPTER II. ARTICLE II. EFFECTIVENESS OF METHODS TO DISINFECT SEEDS OF *Laelia autumnalis* FOR CONSERVATION IN LIQUID NITROGEN

RESUMEN

Introducción: *Laelia autumnalis* es una orquídea nativa de México amenazada por la pérdida de su hábitat. Para la conservación de esta especie, es necesario evaluar la efectividad de métodos de desinfección y secado para aplicar técnicas de crioconservación y cultivo *in vitro*. **Método:** En un primer experimento se consideró la técnica de inmersión directa en nitrógeno líquido para optimizar el almacenamiento a largo plazo, sin embargo, la germinación asimbiótica fue afectada por el hongo *Alternaria* sp.; motivo por el cual se realizó un segundo experimento con dos ensayos para evaluar la viabilidad y germinación asimbiótica de las semillas en función de los desinfectantes hipoclorito de calcio al 1 % e hipoclorito de sodio comercial al 15 % y los métodos de secado con aire en la campana de flujo laminar, gel de sílice y bomba de vacío, antes y después de la inmersión en nitrógeno líquido. **Resultados:** Los desinfectantes hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio disminuyeron la viabilidad en 49 y 37 %, respectivamente; así como los métodos de secado con aire en la campana de flujo laminar y bomba de vacío con 36 y 28 %, respectivamente. La pérdida de viabilidad fue menor cuando se desinfectó después de la inmersión en nitrógeno líquido, la germinación se estimuló con hipoclorito de calcio (100 %). **Conclusión:** Las semillas de *L. autumnalis* deben desinfectarse con hipoclorito de calcio y secarse con aire de la campana de flujo laminar después de la crioconservación por inmersión directa en nitrógeno líquido para evitar daños en los tejidos.

Palabras clave: crioconservación, almacenamiento de semillas, desinfestación y secado

ABSTRACT

Introduction: *Laelia autumnalis* is an orchid native to Mexico threatened by the loss of its habitat. For the conservation of this species, it is necessary to evaluate the effectiveness of disinfection and drying methods to apply *in vitro* cryopreservation and culture techniques. **Method:** In a first experiment, the technique of direct immersion in liquid nitrogen was considered to optimize long-term storage, however, asymptotic germination was affected by the fungus *Alternaria* sp. ; This is why a second experiment was

carried out with two trials to evaluate the viability and asbiotic germination of the seeds based on the disinfectants 1 % calcium hypochlorite and 15 % commercial sodium hypochlorite and air drying methods in the laminar flow hood, silica gel and vacuum pump, before and after immersion in liquid nitrogen. **Results:** Disinfectants calcium hypochlorite and sodium hypochlorite decreased viability by 49 and 37 %, respectively; as well as the methods of air drying in the laminar flow hood and vacuum pump with 36 and 28 %, respectively. The loss of viability was minor when it was disinfected after immersion in liquid nitrogen, germination was stimulated with calcium hypochlorite (100 %). **Conclusion:** The seeds of *L. autumnalis* must be disinfected with calcium hypochlorite and air dried from the laminar flow hood after cryopreservation by direct immersion in liquid nitrogen to avoid tissue damage.

Keywords: cryopreservation, seed storage, disinfestation and drying.

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones silvestres de *Laelia autumnalis*, una orquídea nativa de México, han estado sujetas al cambio en el uso del suelo y a la extracción masiva e ilegal de individuos reproductivos para satisfacer la demanda de los mercados, de seguir con esta actividad esta especie pronto formará parte de la lista de especies amenazadas (Hernández-Muñoz *et al.*, 2013). Las inflorescencias de esta orquídea contienen flores púrpura vistosas, de diversas tonalidades, formas, tamaños y aromas, que se usan en festividades tradicionales por distintos pueblos indígenas desde la época prehispánica (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017). Para preservar el germoplasma de especies en peligro de extinción y amenazadas, es necesario establecer estrategias basadas en el desarrollo y optimización de protocolos para conservación y propagación *in vitro* (Popova *et al.*, 2016) acompañados de ensayos para reintroducir plantas en sitios de restauración (Bustam *et al.*, 2015).

Los bancos de semillas son una opción efectiva y viable para la conservación *ex situ* de plantas como las orquídeas (Merritt *et al.*, 2014) ya que la tolerancia de sus semillas a la desecación parece común y generalizada, lo que incrementa el potencial de almacenamiento entre -20 y 5 °C (Ossenbach *et al.*, 2007). Sin embargo, las semillas de algunas especies de orquídeas tienen poca vida de almacenamiento (Hay *et al.*, 2010), porque son pequeñas (± 0.04 mm) y carecen de endospermo, que es sustituido por embriones globulares (indiferenciados) dentro de testas relativamente transparentes con pocas células que contienen algunas reservas de lípidos (Hosomi *et al.*, 2012; Piri *et al.*, 2013).

Para semillas con poca vida de almacenamiento, se han obtenido métodos más efectivos y económicos para la conservación a largo plazo a través de la criopreservación. Como sucedió en las orquídeas *Cymbidium macrorhizon* y *Bletilla formosana* donde se utilizaron vitrificación y desecación para obtener porcentajes de viabilidad altos (82 y 86.80 %, respectivamente) después de su almacenamiento en nitrógeno líquido (Hirano *et al.*, 2011; Rung-Yi *et al.*, 2013). Después de la conservación a largo plazo y durante la germinación asimbiótica, los embriones pueden presentar más daños, ya que las semillas de orquídeas tienen que ser desinfectadas para evitar la contaminación durante el cultivo *in vitro* (Billard *et al.*, 2014); tomando en cuenta que esta etapa es un factor crítico del protocolo de criopreservación debe ser estrictamente controlada (Pence y Sandoval, 2002).

La superficie de la testa seminal al igual que otros tejidos vegetales albergan fácilmente bacterias, hongos y esporas, lo que dificulta su preparación y crecimiento mediante micropropagación aséptica (Stubblefield *et al.*, 2015), debido al éxito limitado en los protocolos de cultivo de tejidos se

deben hacer pruebas con los compuestos o agentes desinfectantes como el hipoclorito de calcio y sodio, el cloruro de mercurio, los antibióticos y fungicidas para eliminar a los microorganismos sin afectar a los tejidos (Mng'omba *et al.*, 2012; Yildiz *et al.*, 2012). Aunque, estos desinfectantes pueden afectar la viabilidad como sucedió en semillas de *E. adenocaula*, donde la viabilidad aumentó 48.2 % cuando utilizó Tween 80 en comparación con el 24.1 % que se obtiene al desinfectar con $\text{Ca}(\text{OCI})_2$ (Aguilar-Morales *et al.*, 2016). Por el contrario, existen reportes en donde el uso de desinfectantes aumenta el porcentaje de viabilidad y germinación como en las semillas de *Paphiopedilum* donde la tinción de embriones con sales de Cloruro de 2,3,5-Trifenil-Tetrazolio (TTC) fue 44.1 % y germinación del 58.1 % después del pretratamiento con NaClO al 0.5 % durante 60 min, ya que al aumentar la dosis 1.0 o 1.5 % y el tiempo de exposición 60 y 20 min, respectivamente estos disminuyeron, la viabilidad fue del 21.7 y 25.3 % y la germinación fue de 11.7 y 12.8 %, respectivamente (Fu *et al.*, 2016).

Los datos sobre la viabilidad de las semillas de orquídeas nativas de México después de años o décadas de almacenamiento son relativamente escasos, a pesar de que, determinar la viabilidad de las semillas y establecer el método de desinfectación, son actividades fundamentales para desarrollar el método de conservación a largo plazo para la especie de interés en banco de germoplasma. Esta falta de información puede ocasionar que las semillas se almacenen a temperatura y humedad inadecuadas lo que provocaría pérdida de viabilidad (Aguirre-Bolaños *et al.*, 2017). Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación, fue evaluar el tipo de desinfectante y método secado en la viabilidad y germinación de semillas de *Laelia autumnalis* antes o después de la inmersión en nitrógeno líquido (-196 °C).

MÉTODO

Inmersión directa de semillas sin desinfectar (E1). Este experimento consistió en un ensayo preliminar en el cual se usaron los frutos maduros (cápsulas) de tres plantas de *L. autumnalis* pertenecientes al Banco de Germoplasma del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI). La semilla polvo (con humedad del 3 %) se almacenó 30 d en recipientes de cristal de 14 mL de capacidad con tapa de corcho a temperatura ambiente (24 ± 1 °C). En el primer experimento se colocaron 40 mg de semilla polvo en dos crioviales de polipropileno de 2 mL de capacidad (Sarstedt®), 20 mg por criovial. Los crioviales se almacenaron durante 24 h en nitrógeno líquido (NL) aplicando la técnica de inmersión directa (ID). Transcurrido el tiempo de inmersión los crioviales se expusieron a la corriente de aire de la campana de flujo laminar durante 2 min. Con base en los resultados de este ensayo se planteó la necesidad de desinfectar y secar las semillas antes o después de la inmersión en NL.

Desinfestación de semillas antes de la inmersión en nitrógeno líquido (E2). Se tomaron ocho muestras de semillas de 20 mg, cada muestra se colocó en sobre de papel filtro estéril de 1 cm²; cuatro sobres se desinfestaron con hipoclorito de sodio comercial (NaClO) al 15 % (v/v 6 % de i. a.) y cuatro con hipoclorito de calcio (CaCl₂O₂) al 1 % (p/v) durante 15 min. Todos los sobres se enjuagaron en tres ocasiones con agua estéril, en condiciones asépticas. Seis muestras (tres por cada tipo de desinfectante) se secaron con los métodos siguientes: a) aire de la campana de flujo laminar sobre papel filtro en caja de Petri durante 20 min; b) en contenedor de cristal herméticamente cerrado con 50 g de gel de sílice durante 20 min y c) en matraz kitasato conectado a bomba de vacío en donde se realizó vacío durante 10 min. Después del secado, las semillas de cada sobre se colocaron en crioviales de polipropileno de 2 mL de capacidad (Sarstedt®) y se sumergieron en NL durante 24 h; junto con una muestra de semillas de cada tipo de desinfectante sin secar (Figura 1). En total se evaluaron ocho tratamientos, que resultaron de la combinación de dos productos (hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio), tres métodos de secado (campana de flujo laminar, gel de sílice y bomba de vacío); además, se consideraron dos tratamientos de semillas desinfestadas (con NaClO y CaCl₂O₂) sin secado. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (Figura 1).

Desinfestación de semillas después de la inmersión en nitrógeno líquido (E3). Se colocaron dos muestras de 20 mg de semillas en crioviales de plástico con capacidad para 2 mL y se sumergieron en NL durante 24 h. Después, una muestra se desinfestó con NaClO al 15 % y otra en CaCl₂O₂ 1 % durante 15 min, posteriormente se lavaron tres veces con agua esterilizada en la campana de flujo laminar. En este ensayo el diseño experimental fue completamente al azar (Figura 1).

En los tres ensayos, la unidad experimental fue de 0.3 mL de una suspensión de 5 mg de semilla polvo en 1 mL de agua para la variable viabilidad; y de un área de 1 cm² de caja Petri con 15 mg de semilla cultivadas en medio MS, para la variable germinación *in vitro*. Cada tratamiento se repitió tres veces.

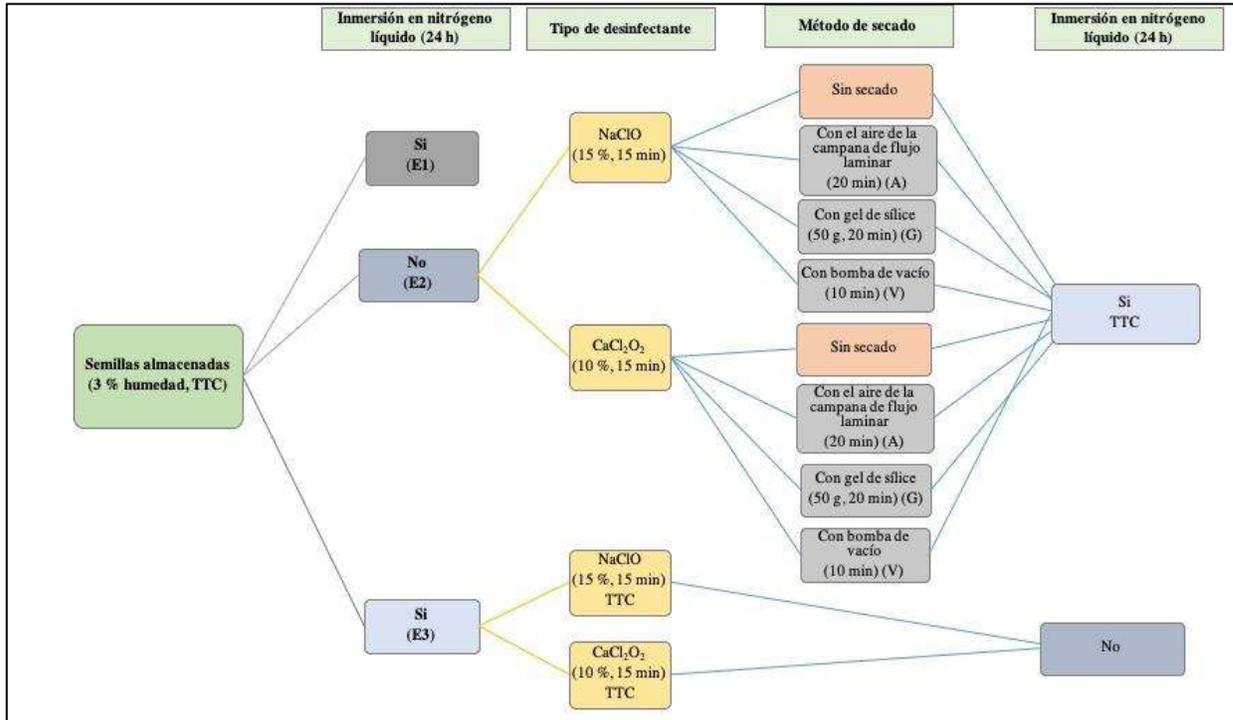


Figura 1. Ruta criogénica en la técnica de inmersión directa para semillas maduras de *Laelia autumnalis* sin desinfectar (E1), desinfectadas antes (E2) y después (E3) de la inmersión en nitrógeno líquido. TTC = Prueba de viabilidad con sales de Cloruro de 2,3,5–Trifenil-Tetrazolio (TTC) al 1 %.

Variables evaluadas

Viabilidad de semillas. De las muestras de 20 mg de cada tratamiento de los tres experimentos se tomaron 5 mg de semillas, se colocaron en tubos Eppendorf® de plástico de 2 mL de capacidad y se adicionó 1 mL de solución de sacarosa al 1 % para mejorar la permeabilidad de la testa. Después de 24 h, la sacarosa se sustituyó por 1 mL de solución de sales de Cloruro de 2,3,5–Trifenil-Tetrazolio (TTC) al 1 % (Lauzer *et al.*, 1994). Los tubos se mantuvieron a 40 °C durante 24 h. Para determinar la viabilidad de las semillas, de cada tratamiento se tomaron 0.3 mL de la mezcla de semillas y se colocaron en portaobjetos, de cada portaobjetos se seleccionaron tres áreas de 1 cm² y se tomaron imágenes digitales en microscopio estereoscopio marca Leica® modelo S6D con analizador de imágenes conectado

a cámara Leica® EC3. En cada imagen digital se registró el número de semillas totales, teñidas de rojo carmín intenso (viables con tejido vivo y vigoroso), teñidas de rojo o rosa (potencialmente viables, tejido en deterioro) debido a la reducción del tetrazolio por la actividad respiratoria de las células (ISTA, 2015) y no teñidas o blancas (semillas no viables, tejido muerto). Con la suma de semillas de cada tipo se obtuvo el número total de semillas, que se usó como denominador para obtener los porcentajes de semillas viables, potencialmente viables y no viables de la siguiente forma: semillas viables (%) = (número de semillas viables/número total de semillas en 1 cm²) X 100. En cada variable (semillas viables, potencialmente viables y no viables) se utilizó el mismo procedimiento.

Germinación *in vitro*. El resto de las semillas (15 mg) de todos los tratamientos de los tres ensayos se suspendieron por separado en crioviales con 1 mL de agua esterilizada y posteriormente se colocaron en cajas de Petri con 20 mL de medio de cultivo Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina y 6 g L⁻¹ de agar. Las cajas fueron colocadas en el cuarto de incubación a temperatura de 24 °C ± 1 y con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad con intensidad lumínica de 40 μM m⁻² s⁻¹. A los 8 días después de la siembra (dds), de los 15 mg de semillas en la caja Petri de cada tratamiento se seleccionaron tres áreas de 1 cm² y mediante observación en el microscopio estereoscópico se cuantificó el número de semillas germinadas. El porcentaje de germinación para todas las muestras se obtuvo de manera similar a lo descrito para porcentaje de viabilidad de las semillas.

Análisis estadístico. A los datos obtenidos en porcentajes de las variables respuesta de los experimentos E2 y E3 se les aplicaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov para confirmar la distribución normal y las de Bartlett y Levene para confirmar la homogeneidad de varianzas de las variables y los tratamientos. En E2 se llevó a cabo un anova factorial ($\alpha = 0.05$) para evaluar el efecto del tratamiento desinfectante (n = 2) en interacción con el tratamiento de secado (n = 4) previo a la inmersión en NL, en el porcentaje de semillas viables y germinadas, en total se probaron ocho tratamientos con tres repeticiones; además se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias entre tratamientos. En E2 también se realizó análisis de regresión ($P \leq 0.05$) entre el porcentaje de semillas potencialmente viables con el porcentaje de semillas germinadas *in vitro*, de las muestras desinfectadas con CaCl₂O₂ y secadas antes de la inmersión en nitrógeno líquido. En E3 se calcularon las pruebas t de Student para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de semillas viables y no viables y la germinación *in vitro* por efecto del tipo de desinfectante

después de la inmersión en NL. Estos análisis se efectuaron con el programa SAS (Statistical Analysis System) versión 9.0 (Statistical Analysis System, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inmersión directa de semillas sin desinfestar (E1). En los resultados del ensayo preliminar la obtención de imágenes de las semillas de *L. autumnalis* con 3 % de humedad, almacenadas por 30 d sin tratar (muestra inicial), tratadas con TTC permitió la separación de las semillas en tres categorías: viables con embriones teñidos de rojo intenso carmín (88 %), potencialmente viables con embriones de color rosa en proceso de deterioro (8 %) y no viables con embriones blancos (4 %) (Figura 2). La presencia de semillas de baja viabilidad (embriones rosas) es común en los frutos de orquídeas, por esto es importante determinar la calidad fisiológica antes y después de la conservación (Hosomi *et al.*, 2012).

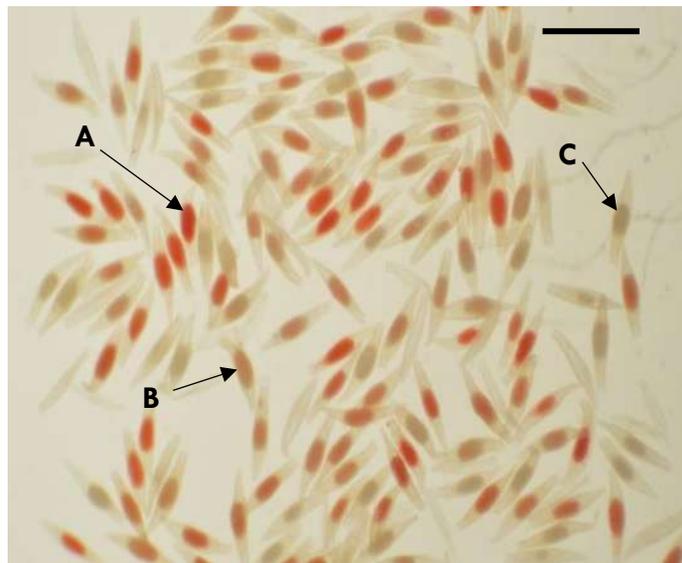


Figura 2. Semillas de *Laelia autumnalis* teñidas por efecto de las sales de TTC. Semillas viables (A), semillas potencialmente viables (B) y semillas no viables (C) después de la inmersión en NL.

El porcentaje de semillas viables obtenido (88 %) indica que *L. autumnalis* tiene capacidad de reproducción. Estos datos son similares a los obtenidos para *L. autumnalis* en otros reportes donde se han registrado porcentajes de germinación del 80 y 100 % con fotoperiodos de 24 h luz y 16/8 h (luz/oscuridad) respectivamente (Vergara-Galicia *et al.*, 2010); en otras orquídeas como *Dendrobium officinale* se han reportado valores de germinación superiores (98.47 y 99.05 %) al asociar la germinación *in vitro* con las cepas del hongo micorrízico JC-02 y JC-05 (Tan *et al.*, 2014).

Después de la inmersión en NL de semillas de *L. autumnalis* sin desinfestación, se observó que, las estructuras de resistencia les permiten a los hongos tolerar bajas temperaturas (de Araújo *et al.*,

2015), ya que, las semillas presentaron formación de micelio de color blanco algodonoso que inició entre los 2 y 10 días después de la siembra (dds) con cambio a tonalidad ocre. A los 15 dds el micelio invadió por completo las cajas Petri y evitó la germinación. Aunque se sabe que los microorganismos se encuentran presentes en todos los órganos de las orquídeas en raíces, cápsulas, semillas y también en plántulas cultivadas *in vitro* (Ávila-Díaz *et al.*, 2013), la exposición rápida al nitrógeno líquido y el recalentamiento pueden inducir agrietamiento de la testa produciendo daño en las semillas, lo que probablemente permite la eclosión de microorganismos y la contaminación (Khanna *et al.*, 2014).

En este estudio, el hongo contaminante se identificó como *Alternaria* sp, ya que registró colonias con crecimiento radial de color oscuro así como conidióforos, la mayoría simples, cortos o alargados, generalmente una cadena ramificada de conidios; conidios café oscuro, normalmente con las células transversales y longitudinales septadas; de diversas formas, ovoclavadas, elípticas u ovoides, con frecuencia acropétalas en largas cadenas; características que coinciden con las descritas por Barnett y Hunter (1998) para este género (Figura 3).



Figura 3. Estructuras del hongo *Alternaria* sp. identificado como agente contaminante en cultivo *in vitro* de semillas de *L. autumnalis* después de la inmersión directa en nitrógeno líquido, A) cadena de conidios y B) conidio con las células transversales y longitudinales septadas.

La presencia del hongo *Alternaria* también se ha confirmado mediante evidencia molecular en semillas de *Laelia speciosa* desde la germinación hasta los primeros estadios de desarrollo *in vitro*, sin embargo, no formó pelotones característicos de hongos micorrízicos por lo que se reporta que actúa como patógeno de orquídeas (Ávila-Díaz *et al.*, 2013). En semillas de *Jatropha curcas* después de la crioconservación se reportó la presencia de hongos del género *Aspergillus* en forma predominante

durante los períodos de almacenamiento a 30, 60 y 90 días (Goldfarb *et al*, 2010), y se confirmó la tolerancia de este hongo a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C).

Desinfestación de semillas antes de la inmersión en nitrógeno líquido (E2).

Semillas viables. Las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas comprobaron la distribución normal de las variables estudiadas. Los factores tipo de desinfectante y método de secado influyeron de manera independiente y en interacción en la viabilidad de las semillas (Cuadro 1). La desinfestación con NaClO redujo la viabilidad en comparación con CaCl₂O₂ (Figura 4), esto concuerda con otros reportes donde se asoció la disminución de la viabilidad de 70 a 18 % en semillas de *Paphiopedilum wardii* Sumerh con hipoclorito de sodio a 1.0 % durante 90 min, que podría deberse al daño de la semilla causado por el periodo de los tratamientos (Zeng *et al.*, 2012); mientras que el incrementó del 5 al 10 % en la concentración de CaCl₂O₂ provocó disminución de la viabilidad de 73 a 14 % en semillas de *Phalaenopsis* spp. (Mweetwa *et al.*, 2008). El NaClO erosiona parcialmente la cubierta seminal y mejora la permeabilidad al oxígeno; también es posible que el NaClO alcance algunas células del embrión y afecte las propiedades de la membrana celular, por lo tanto, tenga efectos perjudiciales sobre las actividades metabólicas de las células tratadas con NaClO (Kaneko y Morohashi, 2003).

Factor	Semillas (%)		
	Viables	Potencialmente viables	No viables
Desinfectante (D)	**	*	**
Método de secado (S)	**	**	**
D x S	**	**	**

Cuadro 1. Nivel de significancia para la viabilidad de semillas de *Laelia autumnalis* en función del tipo de desinfectante y método de secado usado antes de la inmersión en nitrógeno líquido.

* significancia estadística al 5 %; ** significancia estadística al 1 %.

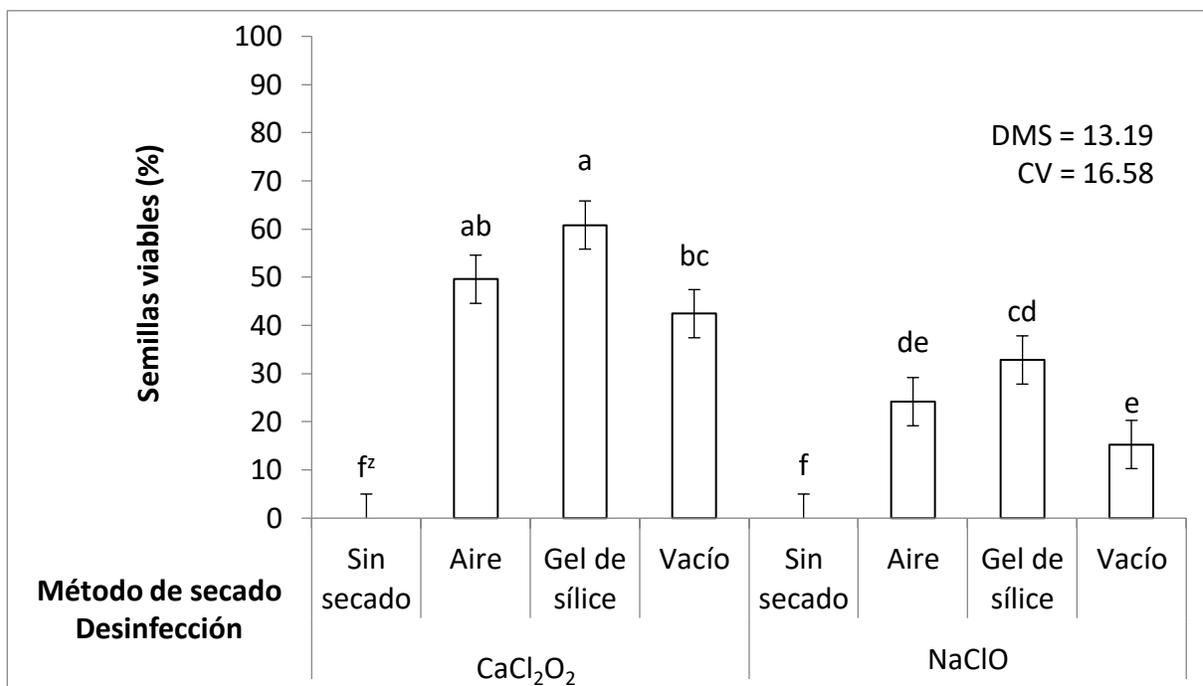


Figura 4. Viabilidad de semillas de *Laelia autumnalis* en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Las semillas fueron teñidas con las sales de TTC (E2). DMS = diferencia mínima significativa. CV = coeficiente de variación. z medias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar.

En la presente investigación fue evidente la muerte de los embriones de las semillas sin secar, ya que es posible que el agua promoviera la formación intracelular de cristales de hielo durante la inmersión en NL (Figura 4). La viabilidad fue estadísticamente superior ($P \geq F = 0.001$; G.L. = 7; $P \leq 0.05$) en semillas secadas con gel de sílice en contraste con aquellas secadas al aire de la campana de flujo laminar y con bomba de vacío. El tratamiento de desinfección con CaCl₂O₂ y secado con gel de sílice registró el porcentaje mayor (60.84) de semillas viables, estadísticamente igual al tratamiento con CaCl₂O₂ y secado con aire de la campana de flujo laminar (Figura 4).

En *Bletilla formosana* las semillas con contenido de agua del 48.9 % presentaron una viabilidad y germinación de 1.8 y 2.3 % después de la inmersión en NL; mientras que las semillas de la misma especie sometidas a deshidratación por 24 h o a gel de sílice por 1 h antes de la inmersión en NL mostraron incrementos en la viabilidad 44.9 y 86.8 % (Rung-Yi *et al.*, 2013). En general las semillas de muchas orquídeas son tolerantes a la desecación (Merritt *et al.*, 2014), aunque la inmersión en productos como el CaCl₂O₂ y NaClO puede ocasionar blanqueamiento del revestimiento de las semillas

e hinchazón de los embriones, además de la degradación de la lignina en la testa de las semillas (Bae *et al.*, 2014; Barsberg *et al.*, 2013).

Se ha documentado que las técnicas de desinfestación y tratamientos previos al cultivo *in vitro* pueden reducir la contaminación, aunque generan impactos negativos en las plántulas desarrolladas (Teixeira da Silva *et al.*, 2016). En *Cattleya*, también se reporta la presencia de semillas que se tornan de color rosa después de la tinción con tetrazolio, la técnica se modificó para 10 mg de semillas, se incubaron en solución de sacarosa al 10 % (p/v) por 24 h a 25 °C, y se lavaron con agua destilada para adicionar solución de TTC al 1 % por 24 h a 40 °C; la germinación *in vitro* corroboró que éstas eran viables (Hosomi *et al.*, 2012).

Semillas potencialmente viables. La desinfestación con NaClO y secado con gel de sílice y con CaCl₂O₂ y secado con bomba de vacío, presentaron los porcentajes mayores de semillas en proceso de deterioro (29.23 y 23.52, respectivamente) (Figura 5). La presencia de semillas potencialmente viables se registró también en las semillas sin tratar (muestra inicial). Esto confirma que la viabilidad de las semillas es afectada por otros factores además de los descritos en este estudio, como maduración de la cápsula ya que parte del extremo floral se extiende hasta el pedúnculo, por lo que, en el momento de la cosecha las semillas pueden haber alcanzado diferentes niveles de madurez y afectar la respuesta en la prueba de TTC (Hosomi *et al.*, 2012).

Semillas no viables. Con excepción de los tratamientos sin secado, en donde murieron todos los embriones, la cantidad de semillas no viables fue mayor (64 y 63 %, respectivamente) al combinar la desinfestación con NaClO y secado con bomba de vacío y corriente de aire (Figura 6). Estos dos métodos de secado son más rápidos que el secado por gel de sílice, pero son más agresivos y reducen la viabilidad de las semillas de *Laelia autumnalis*. El NaClO también ocasionó la pérdida de viabilidad en semillas de las orquídeas epifitas *Bifrenaria nodora*, *Cattleya bicolor*, *Cattleya inetmedia*, *Encyclia pygmaea*, *Epidendrum fulgens*, *Oncidium pumilum* y *Pleurothallis gumacea* y su efecto estuvo relacionado con la concentración y tiempo de exposición (Álvarez-Pardo *et al.*, 2006); además, es posible que el triple enjuague que se aplicó a las muestras desinfestadas, no eliminó completamente todos los componentes de la solución de NaClO que mantuvo efecto residual en las semillas (Silva *et al.*, 2015).

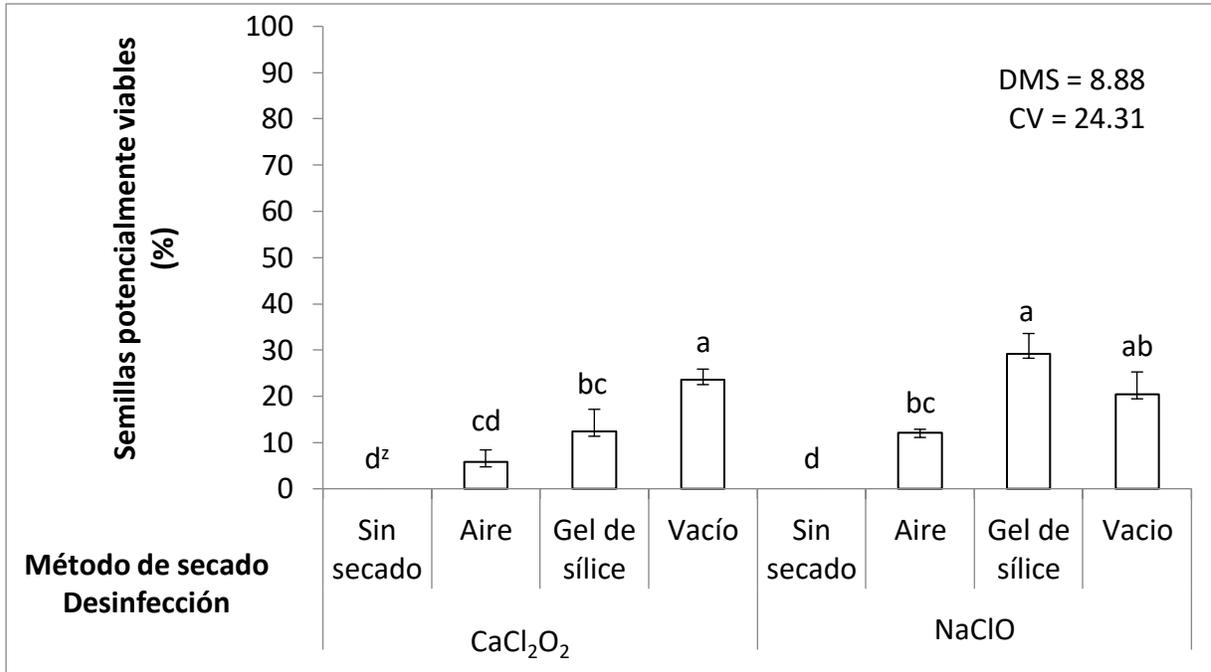


Figura 5. Semillas de *Laelia autumnalis* potencialmente viables en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Las semillas fueron teñidas con las sales de TTC (E2). DMS = diferencia mínima significativa. CV = coeficiente de variación. ^z medias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar.

La asociación entre el CaCl₂O₂ y secado con gel de sílice produjo la menor pérdida de viabilidad (26 %) por lo que puede ser considerado como el método más adecuado para la desinfección de semillas antes de la crioconservación (Figura 6).

Germinación *in vitro*. El tipo de desinfectante y método de secado afectaron de manera independiente y en interacción la germinación *in vitro* de semillas expuestas en NL por 24 h de forma similar a los datos de viabilidad obtenidos con las pruebas de tetrazolio, situación que indica que hay correspondencia entre las pruebas de viabilidad y germinación de las semillas. Datos similares, se encontraron en la orquídea *Dactylorhiza fuchsii* que registró porcentajes de germinación de 89.7 y de viabilidad de 84.8 (Colville *et al.*, 2016).

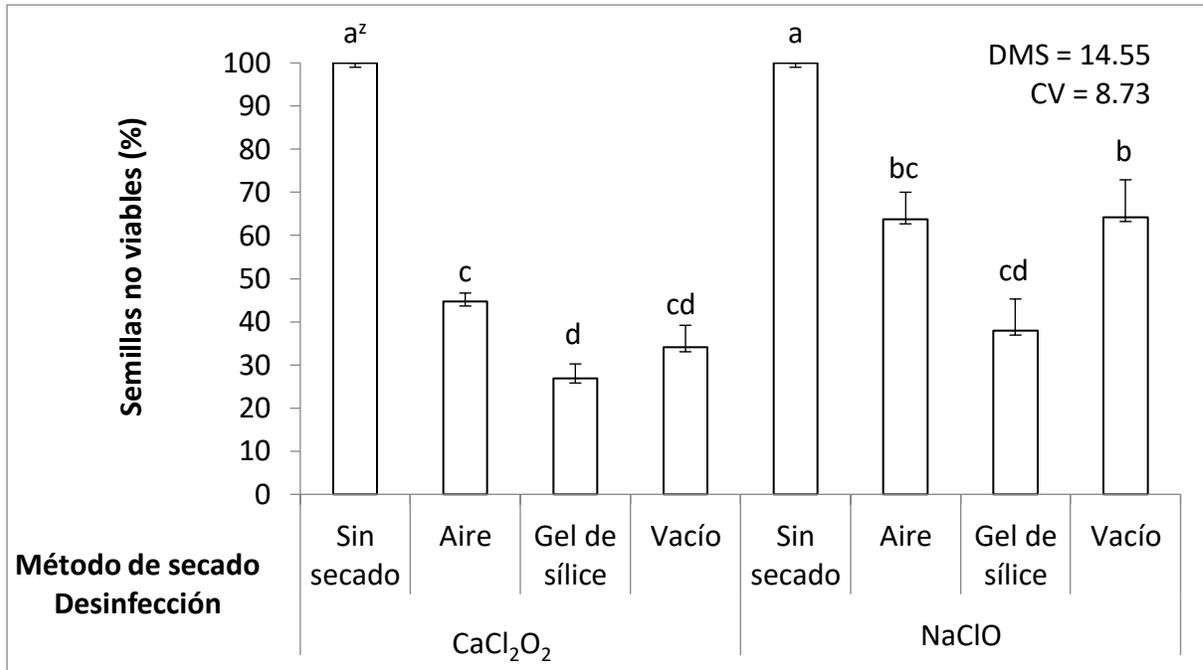


Figura 6. Semillas no viables de *Laelia autumnalis* en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Las semillas fueron teñidas con las sales de TTC (E2). DMS = diferencia mínima significativa. CV = coeficiente de variación. ^z medias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar.

La germinación *in vitro* se redujo 34.1 % en promedio al desinfectar las semillas con NaClO, comparadas con las desinfectadas con CaCl₂O₂. Los métodos de secado también influyeron en la germinación, las semillas secadas con aire de la campana de flujo laminar germinaron en promedio 8 y 30 % más que las secadas en gel de sílice y bomba de vacío. El tratamiento de desinfectación con CaCl₂O₂ y el secado en aire de la campana de flujo laminar, promovió la germinación de las semillas (94.48 %); la sustitución de NaClO con este mismo método de secado redujo en 47.8 % la germinación (Figura 7).

Aunque los embriones de las semillas potencialmente viables presentaron tinción en la prueba de TTC (color rosa), se infiere que sólo algunas pudieron germinar, ya que el porcentaje de germinación estuvo correlacionado de manera negativa ($R_2 = -0.88$, $P \leq 0.05$) con la presencia de semillas potencialmente viables (Figura 8). Estos resultados contrastan con los obtenidos con *Cattleya walkeriana* y *C. tigrina* en donde fue necesario considerar las semillas viables (color rojo) y potencialmente viables (color rosa) para calcular con mayor precisión el porcentaje de germinación (Hosomi *et al.*, 2011).

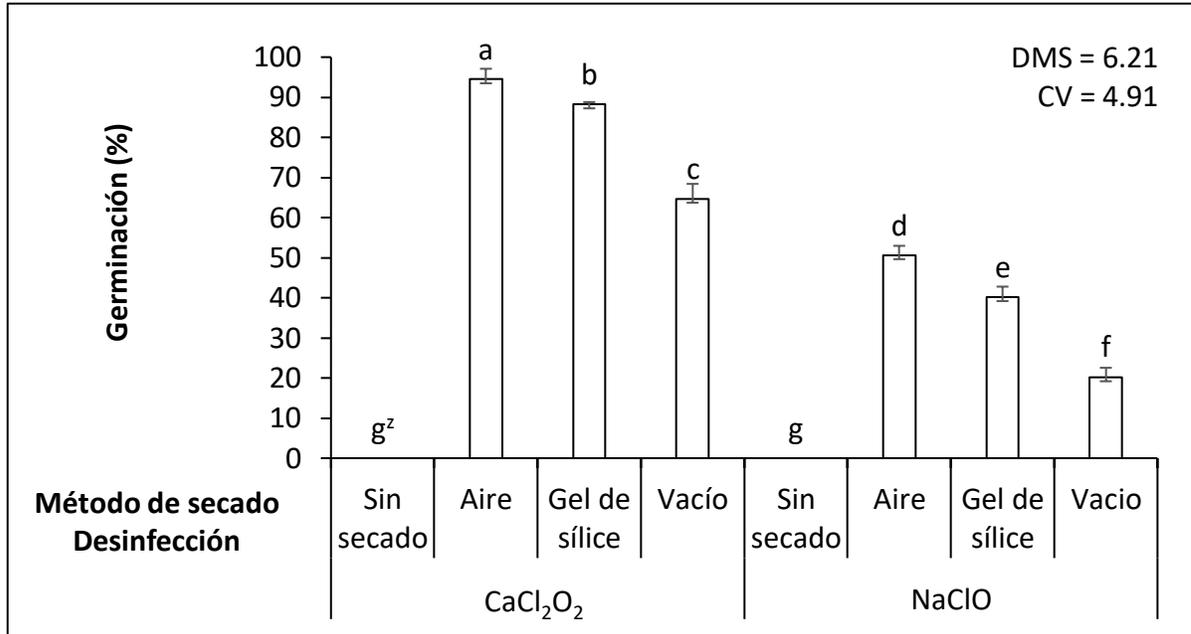


Figura 7. Germinación *in vitro* de semillas de *Laelia autumnalis* en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido (E2). DMS = diferencia mínima significativa. CV = coeficiente de variación. z medias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar.

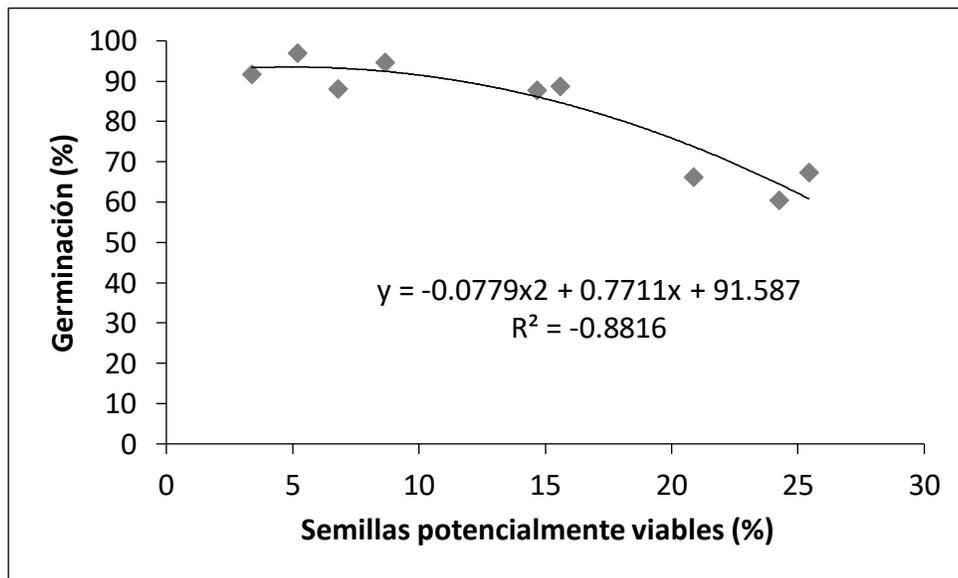


Figura 8. Modelo de regresión para estimar la relación entre el porcentaje de semillas potencialmente viables y el porcentaje de germinación *in vitro* (E2) de semillas de *L. autumnalis* en nueve muestras desinfectadas con CaCl₂O₂ antes de la inmersión en nitrógeno líquido.

Desinfestación de semillas después de la inmersión en nitrógeno líquido (E3)

Viabilidad de semillas. La desinfestación de las semillas después de la inmersión en NL no afectó la viabilidad, ya que el número de semillas viables por efecto de los desinfectantes CaCl_2O_2 y NaClO fue superior a 90 % y estadísticamente similar entre éstos (Figura 9 A). Por lo cual, se considera que los resultados obtenidos con este método (E3) son superiores a los obtenidos en el experimento 2 (E2) porque evita humedecer y secar la semilla antes de la inmersión en nitrógeno líquido; es probable que el tipo de desinfectante y método de secado previos a la inmersión en NL causen algún daño a los tejidos de la testa y el embrión lo que disminuye la viabilidad y germinación de las semillas de *L. autumnalis*. La testa de las orquídeas está formada principalmente por lignina, proteínas y celulosa (Barsberg *et al.*, 2013), funciona como protección para el embrión al retener la humedad, por lo que, aumenta la durabilidad y viabilidad de las semillas (Aybeke, 2014).

En el tratamiento con CaCl_2O_2 no se observaron semillas sin teñir o no viables (Figura 9 B), lo que sugiere que el CaCl_2O_2 afectó la composición química o física de la testa de las semillas, permitió la penetración del TTC y mejoró la tinción de los embriones. Algunas sustancias que se utilizan como desinfectantes, pueden producir blanqueamiento en las semillas y generar sesgos en las pruebas de viabilidad (Lemay *et al.*, 2015); situación que se ha reportado en semillas de otras orquídeas como *Paphiopedilum* donde el NaOCl provocó el blanqueamiento de la testa (Fu *et al.*, 2016), además, algunos desinfectantes como el NaOCl provoca la escarificación de algunas semillas como se reportó para la orquídea *Dactylorhiza fuchsii* (Custódio *et al.*, 2016).

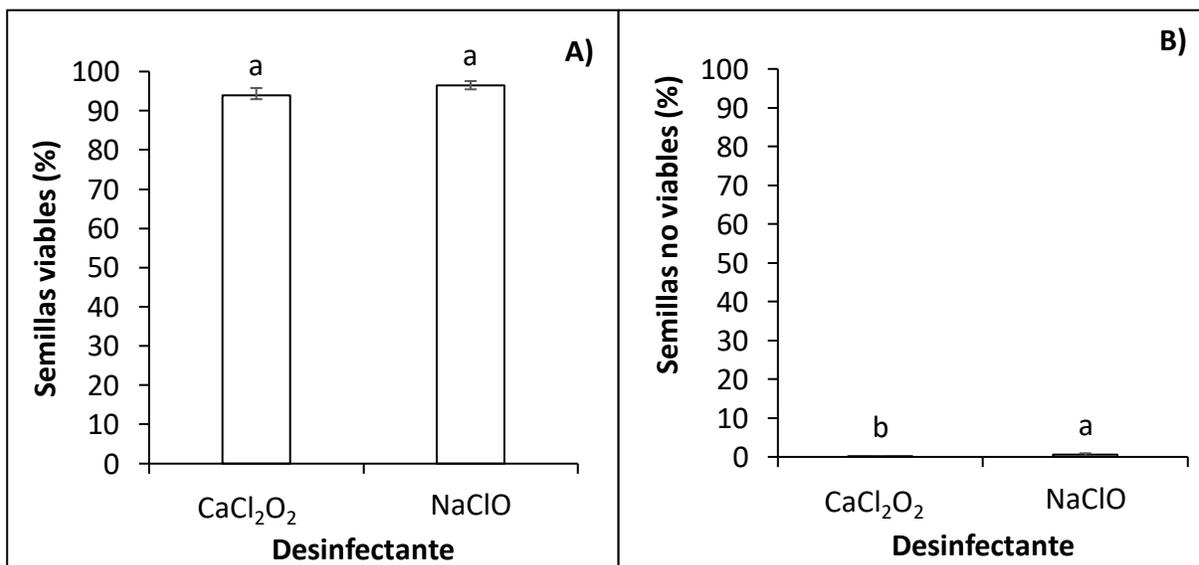


Figura 9. Efecto del tipo de desinfectante en la viabilidad de las semillas de *L. autumnalis* desinfectadas después de la inmersión en NL. A) semillas viables, B) semillas no viables (E3).

Germinación *in vitro* de semillas. De forma similar a lo observado en el porcentaje de semillas viables (Figura 10), la desinfección de semillas con NaClO y CaCl₂O₂ después del proceso de crioconservación en NL, no afectó la germinación *in vitro* (Figura 10). Contrario a nuestros resultados, en otras orquídeas como *Calanthe discolor* Lindl. se han reportado estímulos en la germinación de 88.2 % por efecto del NaClO (25 %) comparado con el testigo sin desinfectar (Bae *et al.*, 2015). Sin embargo, algunos reportes indican disminución en los porcentajes de germinación para semillas de *Oncidium longicornu* y *O. bifolium* con concentraciones de NaClO mayores al 0.5 % (Billard *et al.*, 2014).

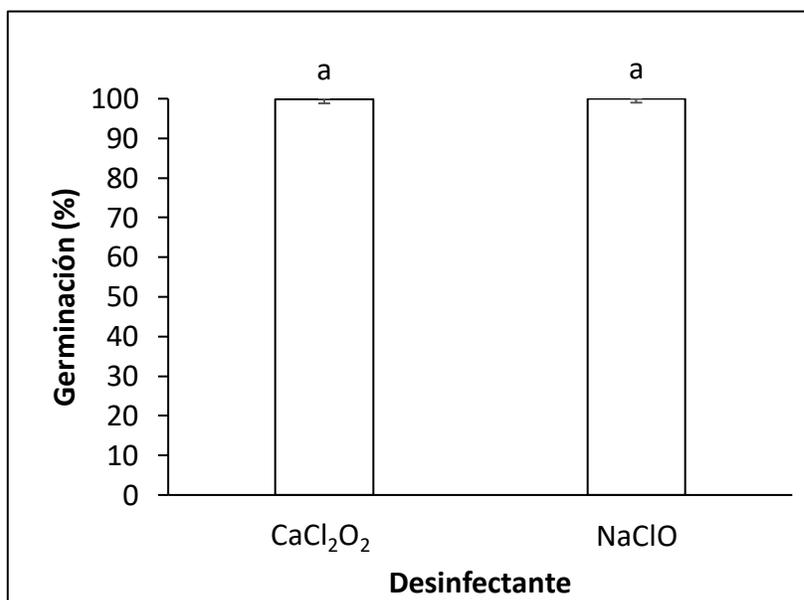


Figura 10. Efecto del tipo de desinfectante sobre la germinación de semillas de *Laelia autumnalis* después de la inmersión en nitrógeno líquido (E3).

Las semillas de *Phaius tankervilleae* desinfectadas con NaClO (1 % cloro disponible) adicionado con Tween-20 al 0.05 % durante 10 min, previo a la exposición de la solución vitrificadora (PVS2) de 0 - 120 min no sobrevivieron, debido probablemente a la adición de humedad durante la desinfección (Hirano *et al.*, 2009). Para las semillas de *L. autumnalis* estudiadas en esta investigación ocurrió algo similar cuando éstas fueron desinfectadas antes de la inmersión en NL, por tal motivo para la crioconservación exitosa se recomienda desinfectar las semillas maduras después de la inmersión a NL.

CONCLUSIONES

El tipo de desinfectante y método de secado afectan la viabilidad y germinación *in vitro* de semillas de *Laelia autumnalis*. Los resultados indican que las semillas deben desinfestarse con CaCl_2O_2 y secarse con aire de la campana de flujo laminar después de la crioconservación por inmersión directa para evitar daños en los tejidos.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Morales, M. A., Laguna-Cerda, A., Vences-Contreras, C. and Lee-Espinosa, H. E. 2016. **Análisis de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) para su conservación *ex situ*.** *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(7): 1741-1747.
- Aguirre-Bolaños, M., Benítez-Flores, J. C., González-Valle, M. R., Hernández-Portilla, L. B., Quintanar-Zúñiga, R. E. y Flores-Ortiz, C. M. 2017. **Efecto del almacenamiento prolongado sobre la viabilidad y perfil de ácidos grasos en semillas de *Encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr.** *Revista Fitotecnia Mexicana* 40(2): 151.
- Álvarez-Pardo, V. M., Ferreira, A. G. and Nunes, V. F. 2006. **Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil.** *Horticultura Brasileira* 24(2): 217-220.
- Ávila-Díaz, I., Garibay-Orijel, R., Magaña-Lemus R. E. and Oyama, K. 2013. **Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) Schltr.** *Botanical Sciences* 91(4): 523-529.
- Aybeke, M. 2014. **Morphological and histochemical investigations on *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P. Delforge (Orchidaceae) seeds.** *Plant systematics and evolution* 300(1): 91-97.
- Bae, H. K., Oh, K. H. and Kim, S. Y. 2015. ***In vitro* seed germination and seedling growth of *Calanthe discolor* Lindl.** *Plant Breeding and Seed Science* 71(1): 109-119.
- Bae, K. H., Oh, K. H. and Kim, S. Y. 2014. **Sodium hypochlorite treatment and light-emitting diode (LED) irradiation effect on *in vitro* germination of *Oreorchis patens* (Lindl.) Lindl.** *Journal of Plant Biotechnology* 41(1): 44-49.
- Barnett, H. L. and Hunter B. B. 1998. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi.** 4th ed. *Burgess Publishing Company Minneapolis, Minesota USA* p. 227.
- Barsberg, S., Rasmussen, H. N. and Kodahl, N. 2013. **Composition of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) seeds analyzed by attenuated total reflectance IR spectroscopy: In search of understanding longevity in the ground.** *American Journal of Botany* 100(10): 2066-2073.

- Billard, C. E., Dalzotto, C. A. y Lallana, V. H. 2014. **Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium***. *Polibotánica*. 38: 145-157.
- Bustam, B. M., Dixon, K. and Bunn, E. 2015. **A cryopreservation protocol for *ex situ* conservation of terrestrial orchids using asymbiotic primary and secondary (adventitious) protocorms**. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 52(2): 185-195.
- Colville, L., Marks, T. R., Pritchard, H. W., Custodio, C. C. and Machado-Neto, N. B. 2016. **Development of a reliable GC-MS method for fatty acid profiling using direct transesterification of minimal quantities of microscopic orchid seeds**. *Seed Science Research* 26(1): 84-91.
- Custódio, C. C., Marks, T. R., Pritchard, H. W., Hosomi, S. T. and Machado-Neto, N. B. 2016. **Improved tetrazolium viability testing in orchid seeds with a thick carapace (*Dactylorhiza fuchsii*) or dark seed coat (*Vanda curvifolia*)**. *Seed Science and Technology* 44(1): 177-188.
- de Araújo D. R., Almeida, F. D. A. C., Gomes, J. P., Neto, A. F. y Alves, N. M. C. 2015. **Incidencia de hongos y producción de aflatoxina en semillas de maní crioconservadas**. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 16(1): 136-147.
- Fu, Y., Jiang N., Wu K. L., Zhang, J. X., Teixeira Da Silva, J. A., Duan, J., Liu, H. T. and Zeng, S. J. 2016. **Stimulatory effects of sodium hypochlorite and ultrasonic treatments on tetrazolium staining and seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum* SCBG Red Jewel**. *Seed Science and Technology* 44(1): 77-90.
- Goldfarb, M., Duarte, M. E. M. and Mata, M. E. R. C. 2010. **Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae**. *Revista Biotemas* 23(1): 27-33.
- Hay, F. R., Merritt, D. J., Soanes, J. A. and Dixon, K. W. 2010. **Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions**. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164(1): 26–41.
- Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., López P. A., De La Cruz-Torres, E., Martínez-Palacios, A., Fernández-Pavía, S. P. y Chávez-Bárceñas A. T. 2017. **Estimulación de la germinación y desarrollo *in vitro* de *Laelia autumnalis* con rayos gamma**. *Revista Fitotecnia Mexicana* 40(3): 271-283.
- Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., Morales-García, J. L., Guillén-Andrade, H., López, P. A. and Téllez-Velasco, M. A. A. 2013. **Phenotypic characterization of Mexican orchid *Laelia autumnalis***. *Acta Horticulturae* 977: 245-252.
- Hirano, T., Godo, T., Miyoshi, K., Ishikawa, K., Ishikawa, M., and Mii, M. 2009. **Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae***. *Plant Biotechnology Reports* 3(1): 103-109.

- Hirano, T., Yukawa, T., Miyoshi, K. and Mii, M. 2011. **Wide applicability of cryopreservation with vitrification method of seeds of some *Cymbidium* species.** *Plant Biotechnology* 28(1): 99–102.
- Hosomi, S. T., Custódio, C. C., Seaton, P. T., Marks T. R. and Machado-Neto, N. B. 2012. **Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage.** *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 48(1): 127-136.
- Hosomi, S. T., Santos, R. B., Custódio, C. C., Seaton, P. T., Marks, T. R. and Machado-Neto, N. B. 2011. **Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability.** *Seed Science and Technology* 39(1): 178-189.
- ISTA 2015. International rules for seed testing: International Seed Testing Association (ISTA). *Seed Science and Technology* 27: 50-52.
- Kaneko, Y. and Morohashi, Y. 2003. **The effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amylase activity in mung bean cotyledons.** *Plant Science* 164(2): 287-292.
- Khanna, S., Jenkins, H., Bucalo, K., Determann, R. O., Cruse-Sanders, J. M. and Pullman, G. S. 2014. **Effects of seed cryopreservation, stratification and scarification on germination for five rare species of pitcher plants.** *CryoLetters* 35(1): 29-39.
- Lauzer, D., St.-Arnaud, M. and Barabe, D. 1994. **Tetrazolium staining and *in vitro* germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae).** *Lindleyana* 9: 197-204.
- Lemay, M. A., De Vriendt, L., Pellerin, S. and Poulin, M. 2015. ***Ex situ* germination as a method for seed viability assessment in a peatland orchid, *Platanthera blephariglottis*.** *American Journal of Botany* 102(3): 390-395.
- Merritt, D. J., Hay, F. R., Swarts, N. D., Sommerville, K. D. and Dixon, K. W. 2014. ***Ex situ* conservation and cryopreservation of orchid germplasm.** *International Journal of Plant Sciences* 175(1): 46-58.
- Mng'omba, S. A., Sileshi, G., du Toit, E. S. and Akinnifesi, F. K. 2012. **Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures.** *In Tech Open Access Publisher. Fungicides for Plant and Animal Diseases* 13(1): 245-254.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. **A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures.** *Physiologi Plantarum* 15(3): 473-497.
- Mweetwa, A. M., Welbaum, G. E. and Tay, D. 2008. **Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on *in vitro* germinability of *Phalaenopsis* seeds.** *Scientia Horticulturae* 117(3): 257-262.

- Ossenbach C., Arce J. y Warner, J. 2007. **Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas.** *Tierra Tropical* 3(1): 47-59.
- Pence, V. C. and Sandoval, J. A. 2002. **Controlling Contamination during *in vitro* collecting.** En *In Vitro Collecting Techniques for Germplasm Conservation*; Pence, V. C.; Sandoval, J. A.; Villalobos, V. M. and Engelmann F. (Eds). *International Plant Genetic Resources Institute: Rome, Italy* p. 30–40.
- Piri, H., Pathak, P. and Bhanwra, R. K. 2013. **Asymbiotic germination of immature embryos of a medicinally important epiphytic orchid *Acampe papillosa* (Lindl.) Lindl.** *African Journal of Biotechnology* 12(2): 162-167.
- Popova, E., Kim, H. H., Saxena, P. K., Engelmann, F. and Pritchard, H. W. 2016. **Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity.** *Biotechnology advances* 34(4): 380-403.
- Rung-Yi W., Shao-Yu, C., Ting-Fang, H. and Yu-Sen, C. 2013. **Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation.** *Scientia Horticulturae* 157: 108-112.
- SAS Institute Business Systems Analyst Salaries. 2002. **SAS version 9.0.** SAS Institute. *North Carolina* p. 4424.
- Silva, L. C., Paiva, R., Vargas, D. P., Silva, D. P. C. D., Barbosa, S. And Herrera, R. C. 2015. **Decontaminant solution on *in vitro* growth of *Byrsonima intermedia* seedlings.** *Ciência Rural* 45(4): 674-679.
- Stubblefield, J. M., Newsome, A. L. and Cahoon, A. B. 2015. **Surface decontamination of plant tissue explants with chlorine dioxide gas.** *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 51(2): 214-219.
- Tan, X. M., Wang, C. L., Chen, X. M., Zhou, Y. Q., Wang, Y. Q., Luo, A. X., Liu, Z. H. and Guo, S. X. 2014. ***In vitro* seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.).** *Scientia Horticulturae* 165: 62-68.
- Teixeira da Silva J. A. T., Winarto, B., Dobránszki, J., Cardoso, J. C. and Zeng, S. 2016. **Tissue disinfection for preparation of *Dendrobium in vitro* culture.** *Folia Horticulturae* 28(1): 57-75.
- Vergara-Galicia, J., Aguirre-Crespo, F., Castillo-España, P., Arroyo-Mora, A., López-Escamilla, A. L., Villalobos-Molina, R. and Estrada-Soto, S. 2010. **Micropropagation and vasorelaxant activity of *Laelia autumnalis* (Orchidaceae).** *Natural Product Research*. 24(2): 106-114.
- Yildiz, M., Fatih Ozcan, S., T. Kahramanogullari C. and Tuna, E. 2012. **The effect of sodium hypochlorite solutions on the viability and *in vitro* regeneration capacity of the Tissue.** *The Natural Products Journal* 2(4): 328-331.

Zeng, S., Wu, K., da Silva, J. A. T., Zhang, J., Chen, Z., Xia N. and Duan, J. 2012. **Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid.** *Scientia Horticulturae* 138: 198-209.

**CAPITULO III. ARTÍCULO III: CRIOCONSERVACIÓN DE PROTOCORMOS DE *Laelia autumnalis*
(ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN, ENCAPSULACIÓN-VITRIFICACIÓN Y V CRÍO-LÁMINA)**

**CHAPTER III. ARTICLE III. PROTOCORMS CRYOPRESERVATION OF *Laelia autumnalis* (ENCAPSULATION-
DEHYDRATION, ENCAPSULATION-VITRIFICATION AND V CRYO-PLATE)**

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la efectividad de los métodos encapsulación-deshidratación (E-D), encapsulación-vitrificación (E-V) y V crío-lámina (V C-L) para la crioconservación de protocormos de *Laelia autumnalis*. Para E-D, las cápsulas de alginato (con 1 a 2 protocormos) y 20 % de humedad se precultivaron durante 24 h en medio líquido Murashige y Skoog (MS) con 0, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.25 M de sacarosa, después se sumergieron en nitrógeno líquido durante 24 h. El recalentamiento fue lento en la campana de flujo laminar (60 segundos). Para todos los tratamientos se determinó la viabilidad de protocormos con diacetato de fluoresceína (0.05 %) 30 d después de la crioconservación. Los protocormos precultivados con 1 y 1.25 M de sacarosa reflejaron 100 % de fluorescencia, mientras que los protocormos sin precultivo reflejaron fluorescencia solo en 20 % de sus tejidos. Para E-V y V C-L, los protocormos se precultivaron en medio MS basal con sacarosa (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 M) y un tratamiento control sin sacarosa durante 24 h (16/8 h, luz/oscuridad), transcurrido el tiempo se subcultivaron en medio fresco MS basal para su recuperación. Otros protocormos se subcultivaron en medio MS basal (sacarosa 0.2 M) durante 24, 32, 48 y 72 h. En todos los tratamientos se evaluó el porcentaje de protocormos verdes (viables), cloróticos (potencialmente viables) y necróticos (no viables) después de 15 días del subcultivo (dds), 30 dds se evaluó el número de protocormos que formaron plántulas. Una vez establecido el precultivo se optimizó el tiempo de exposición a la solución de carga, los protocormos precultivados y encapsulados se colocaron en sacarosa 0.4 y glicerol 2 M durante 15, 30 y 60 min y un tratamiento sin exposición. Después se adicionó solución vitrificadora de plantas (PVS2 o PVS3) durante 20 min e introdujeron en nitrógeno líquido durante 24 h. Para optimizar el tiempo de exposición en PVS se evaluaron cuatro tratamientos (20, 40, 60 y 120 min) y un tratamiento testigo sin PVS2 o PVS3; los criotubos se sumergieron en nitrógeno líquido durante 24 h. El recalentamiento fue rápido a 40 ± 2 °C durante 60 s y solución de lavado (sacarosa 2 M y sales inorgánicas MS 50 %) durante 180 s. La adición de

sacarosa en el precultivo disminuyó la viabilidad de los protocormos, los tratamientos expuestos a 0.8 M de sacarosa presentaron solo 2 % de protocormos verdes respecto al tratamiento sin sacarosa. Así mismo, la sacarosa afectó negativamente la formación de plántulas. El tiempo de exposición no influyó sobre la viabilidad y regeneración de los protocormos. Para la E-V, la exposición en la solución de carga durante 15 min y PVS3 alcanzó el mayor porcentaje de protocormos viables (74 %) después de la criopreservación; los protocormos expuestos durante 15 min a la solución de carga y PVS2 mostraron 70 % viabilidad. En la técnica V C-L el mayor porcentaje de viabilidad (72%) de los protocormos se logró al exponerlos a la solución de carga durante 30 min más PVS2 (30 min), mientras que los protocormos sin solución de carga y PVS2 alcanzaron 20 % de viabilidad. Al exponer los protocormos a solución de carga durante 20 min y a PVS2 durante 20, 40 y 60 min, se obtuvo un promedio de 94 % de viabilidad, mientras que con la solución PVS3 se alcanzó un 100 % de viabilidad al exponerlos durante 40, 60 y 120 min. Estos resultados sugieren que para la criopreservación de protocormos de *Laelia autumnalis* debe utilizarse la técnica de V crío-lamina.

Palabras clave: métodos criogenicos, orquideas, osmodeshidratación.

ABSTRACT

The aim of the investigation was to evaluate the encapsulation-dehydration (E-D), encapsulation-vitrification (E-V) and Vitrification cryo-plate (V C-P) methods for protocorms preservation of *Laelia autumnalis*. Murashige and Skoog (MS) liquid medium with 0, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.25 M of sucrose were used for alginate capsules pre-cultivation (with 1 to 2 protocorms) and humidity of 20 % for E-D during 24 h, after that, they were immersed in liquid nitrogen during 24 h. The rewarming was slow on the laminar flow hood (60 seconds). 30 d after cryopreservation the protocorms viability of all treatments were determined with fluorescein diacetate (0.05 %). 100 % of pre-cultivated protocorms with 1.0 and 1.25 M of sucrose showed fluorescence, while just the 20 % of non-pre-cultivated protocorms showed fluorescence on their tissues. MS basal medium with sucrose (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 and 1.2 M) and a non-sucrose treatment during 24 h (16/8 h light/dark) were used for protocorms pre-cultivation for E-V and V C-P, they were subcultured on MS basal medium after the time for their recovery. Other protocorms were subcultivated on MS basal medium (0.2 M sucrose) during 24, 32, 48 and 72 h. The percentage of green (viable), chlorotic (potentially viable) and necrotic protocorms (non-viable) were evaluated at all treatments 15 days after subculture (das), the number of seedlings development from the protocorms were evaluated 30 das. The exposition time at loading solution was optimized once the pre-culture was established, the precultivated and encapsulated protocorms were placed in 0.4 sucrose and 2 M glycerol during 15, 30 and 60 min and a treatment without exposition as control. After that, plant vitrification

solution (PVS2 or PVS3) were added during 20 min and immersed in liquid nitrogen during 24 h. Four treatments (20, 40, 60 and 120 min) and a control treatment without PVS2 or PVS3 were evaluated in PVS for exposition time optimizing; cryotubes were immersed in liquid nitrogen for 24 hours. The rewarming was fast at 40 ± 2 °C during 60 s and washing solution (2 M sucrose and 50 % MS inorganic salts) during 180 s. Viability protocorms decreased by adding sucrose at pre-culture, the treatments which were exposed at 0.8 M sucrose presented just 2 % of green protocorms with respect to the treatment without sucrose. Likewise, seedlings development was affected negatively by sucrose. Viability and regeneration of protocorms were not affected by exposition time. The highest percentage of viable protocorms (74 %) after cryopreservation were obtained at the exposition of loading solution during 15 min and PVS3 for E-V; protocorms exposed at loading solution and PVS2 during 15 min showed 70 % of viability. The highest viability percentage (72 %) of protocorms were obtained at the exposition of loading solution during 30 min plus PVS2 for V C-P technique, while protocorms without loading solution and PVS2 obtained 20 % of viability. An average of 94 % of viability was obtained at the exposition of the protocorms with loading solution during 20 min and PVS2 during 20, 40 and 60 min, while 100 % of viability was obtained at the exposition of PVS3 solution during 40, 60 and 120 min. These results suggest that V cryo-plate must be used for cryopreservation of *Laelia autumnalis* protocorms.

Keywords: cryogenic methods, orchids, osmodehydration

INTRODUCCIÓN

En el mundo, las orquídeas son catalogadas como plantas de uso ornamental para flor de corte, en maceta y jardines (Teixeira da Silva, 2013). Sin embargo, solo algunos géneros se cultivan de forma comercial; lo que ocasiona la recolección sin control de plantas silvestres para su comercialización ilegal. Por esto, se considera entre las familias vegetales con más especies en riesgo de extinción (Merritt *et al.*, 2014).

En México, la desaparición del hábitat natural de las orquídeas, las colectas ilegales, la tala descontrolada, el cambio de uso de suelo, la apertura de nuevas carreteras e incluso la desertificación, han ocasionado que una especie desaparezca y 187 se encuentren bajo protección especial o en riesgo de extinción. Por ejemplo, las flores del género *Laelia* son colectadas durante las festividades religiosas que coinciden con la época de floración, además en la cultura Otomí se ha utilizado para la generación de remedios homeópatas, golosinas o pegamento para pinturas naturales (Bertolini *et al.*, 2012). Esto ocasiona que cada año el saqueo y la comercialización de orquídeas para los fines descritos contribuyan a la extinción lenta pero segura de las orquídeas mexicanas (Castillo-Pérez *et al.*, 2019).

Las orquídeas presentan una reproducción difícil de forma natural por lo que es necesario desarrollar protocolos de propagación *in vitro* para su reproducción y conservación. El almacenamiento de plántulas a corto o mediano plazo *in vitro* es más eficiente y seguro que la conservación en el campo. Sin embargo, este método no es ideal para la conservación de germoplasma a largo plazo, porque requiere mano de obra calificada, es de costoso alto y se tiene el riesgo de perder accesiones por contaminación y etiquetado incorrecto durante el subcultivo (Panta *et al.*, 2014).

La combinación de herramientas biotecnológicas como la micropropagación y la crioconservación mejoran las posibilidades de preservación a largo plazo en genotipos de interés (Prada *et al.*, 2015). La crioconservación es un método viable y económico basado en la desecación inducida por el descenso controlado de temperatura (métodos clásicos) o en la vitrificación, por soluciones penetrantes a los tejidos (Lazo-Javalera *et al.*, 2015). Los tejidos se someten a una deshidratación parcial al ser expuestos a soluciones químicas y/o al secado físico, y se enfrían por inmersión rápida en nitrógeno líquido.

El principal desafío de crioconservar materiales biológicos es evitar la formación de hielo intracelular durante el enfriamiento a temperaturas ultra bajas -196 °C (Panta *et al.*, 2014). El agua libre en las células ocasiona que éstas se contraigan durante los procesos de osmoprotección y/o

deshidratación, lo que produce daños en algunas células (tensiones y frío-lesiones) que no soportan el estrés osmótico al retirar rápidamente el agua del protoplasma (Volk y Caspersen, 2007; Wen *et al.*, 2012). El mantener un equilibrio del agua intracelular, es el factor más importante para lograr una criopreservación exitosa (Rahmah *et al.*, 2015).

Con base en estos principios, los métodos de criopreservación se han diversificado en técnicas con deshidratación física: deshidratación, encapsulación-deshidratación y D frío-lámina y técnicas que requieren de crioprotectores: vitrificación, encapsulación-vitrificación, gota-vitrificación y V frío-lámina (González-Arno y Engelmann, 2013).

La encapsulación-deshidratación (E-D) se basa en la técnica de producción de semillas sintéticas, es decir la encapsulación de tejidos en cápsulas de alginato de calcio (González-Arno y Engelmann, 2006). La encapsulación de los tejidos permite la aplicación de tratamientos drásticos, incluida la osmoprotección con concentraciones de sacarosa altas y la desecación física en contenidos bajos de humedad lo que sería perjudicial o letal para las muestras no encapsuladas. Con la desecación drástica de los tejidos, la mayor parte o la totalidad del agua congelable se elimina de las células y se produce la vitrificación de los solutos internos durante la exposición a nitrógeno líquido de forma rápida, evitando así la formación de hielo intracelular letal (Engelmann, 1997).

Con encapsulación-deshidratación se criopreservó cuerpos parecidos a protocormos (PLBs, por sus siglas de *Protocorm like bodies*) de *Phalaenopsis bellina* en cápsulas con 32 % de humedad y se logró 30 % de desarrollo (Khoddamzadeh *et al.*, 2011). El porcentaje de viabilidad en protocormos criopreservados de *Dendrobium heterocarpum* fue 16.67 % y contenido de agua de 0.07 gH₂O·gDW⁻¹, después de dos semanas se logró 8.33 % de desarrollo (Pimda y Bunnag, 2010). Para *Dendrobium Walter Oumae* se observó relación en la supervivencia con las sales de TTC (16.18 mg de células vivas / 100 mg de células totales) y el desarrollo (13.33 %) (Lurswijidjarus y Thammasiri, 2004).

La vitrificación se desarrolló principalmente para la criopreservación de materiales vegetales sensibles a la desecación como ápices, PLBs y células en suspensión (Antony *et al.*, 2015; Thammasiri *et al.*, 2016). Esto implica un proceso en el que los fluidos intracelulares forman un vidrio amorfo sin la formación letal de cristales de hielo extracelulares (Panta *et al.*, 2014), esto se consigue mediante la adición de soluciones crioprotectoras que conforman las soluciones vitrificadoras (PVS, por las siglas de *Plants Vitrification Solution*) como glicerol y dimetilsulfóxido (Sakai y Engelmann, 2007).

En la encapsulación-vitrificación se combina la encapsulación del material vegetal en alginato de sodio, el cual puede ser tratado como semilla ortodoxa y la adición de soluciones vitrificadoras (Merritt *et al.*, 2014). Las cápsulas pasan distintos procesos como la osmodeshidratación (precultivo en sacarosa), la deshidratación con solución de carga (sacarosa y glicerol) y soluciones PVS; lo que reduce el contenido de agua intracelular con el fin de evitar la cristalización durante el almacenamiento en nitrógeno líquido (Ping *et al.*, 2016).

La encapsulación-vitrificación se ha logrado en especies como *Dendrobium candidum* (Yin y Hong, 2009) y *D. nobile* (Mohanty *et al.*, 2012), donde se optimizó cada paso de esta técnica y se logró una tasa de supervivencia de 89 % y 78 %, respectivamente. En *Laelia autumnalis* aun no se han reportado avances en crioconservación.

La vitrificación crío-lámina es una combinación de gota-vitrificación y encapsulación-vitrificación (Yamamoto *et al.*, 2011). Los tejidos se fijan en láminas de aluminio con alginato de calcio y se colocan dentro de criotubos de 2 mL (Noor *et al.*, 2019). Esta técnica permite una fácil manipulación del material vegetal ya que todos los tratamientos (solución de carga y PVS) se pueden llevar a cabo en un solo movimiento se transfiere la crío-lamina de una solución a otra (Cordova y Thammasiri, 2016). El enfriamiento rápido mediante el contacto directo de los tejidos con el nitrógeno líquido, lo que resulta en desarrollo alto y estable de los tejidos crioconservados (Fukai, 2017).

El objetivo, en el presente trabajo fue evaluar la efectividad de los métodos criogénicos de encapsulación-deshidratación, encapsulación-vitrificación y crío-lámina vitrificación para la conservación en protocormos de *Laelia autumnalis* para su conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo. Las semillas se obtuvieron de tres plantas de *L. autumnalis* resguardadas en el banco de germoplasma del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI). En la campana de flujo laminar, las semillas se desinfectaron con hipoclorito de calcio (CaCl_2O_2) al 10 % (p/v) durante 15 min y se enjuagaron tres veces con agua estéril. La germinación se efectuó en frascos de cristal de 120 mL de capacidad con 20 mL de medio Murashige y Skoog (1962) (MS basal) con las sales inorgánicas reducidas a 50 %, adicionado con 30 g L^{-1} de sacarosa, 0.4 mg L^{-1} de tiamina, 100 mg L^{-1} de mio-inositol y 6 g L^{-1} de agar. El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH y H_2SO_4 1 N y se esterilizó en autoclave a 1.5 kg \times cm^2 de presión durante 15 min. Las semillas sembradas se incubaron durante 20 días con fotoperiodo de 16/8 h (luz/obscuridad), intensidad lumínica de 40 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperatura de 24 ± 1 °C.

A los 30 días se eligieron protocormos de 3 a 5 mm de diámetro que sirvieron como material vegetal de los ocho experimentos (E1 a E8) ensayos establecidos para optimizar las técnicas de crioconservación por encapsulación-deshidratación, encapsulación-vitrificación y vitrificación crío-lámina (Figura 1).

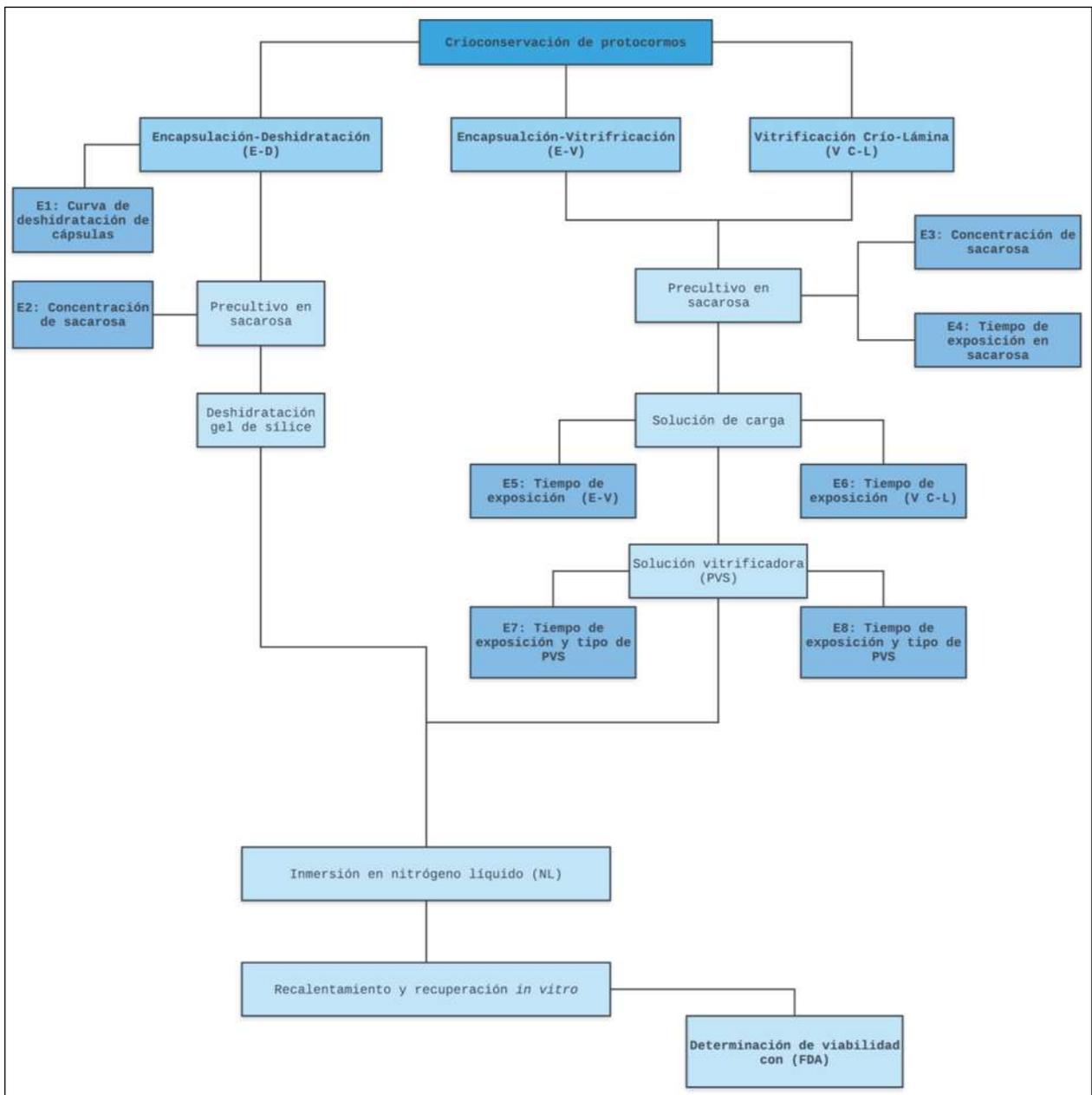


Figura 1. Ruta criogénica para la conservación a largo plazo de protocormos de *Laelia autumnalis*.

E1: Curva de deshidratación de cápsulas de alginato de calcio. Para establecer la curva de deshidratación estándar, es necesario determinar previo las condiciones de desecación, es decir, elegir contenedores estándar con gel de sílice (400 g). Cápsulas de alginato de calcio (10) fueron colocadas en rejillas de aluminio y se situaron dentro de los contenedores previamente esterilizados. Los recipientes fueron puestos dentro de la campana de flujo laminar para homogenizar las condiciones ambientales de los posteriores experimentos.

Las cápsulas se pesaron juntas en balanza analítica previo a colocarlas en recipientes para obtener el peso total (FWt₀); posteriormente se colocaron en los contenedores para la desecación y se pesaron después de la exposición a los diferentes períodos de tiempo, lo que permitió medir su peso fresco después de un periodo de desecación (FWt_x). Los lotes de cápsulas se colocaron en estufa de secado a 100 °C durante 24 h para extraer toda el agua restante y obtener el peso seco (DW). Se empleó la siguiente fórmula para calcular el contenido de humedad de las cápsulas después de un período de desecación determinado (tx):

$$MC_{tx} (\% \text{ peso fresco}) = (FW_{tx} - DW / FW_{t_0}) \times 100$$

(Gonzalez-Arno y Engelmann, 2006).

El porcentaje de peso fresco que se obtuvo de los diferentes tiempos de desecación permitió graficar la curva de desecación estándar (Figura 1A).

E2: Precultivo para la deshidratación de cápsulas en sacarosa. Se colocaron 500 protocormos en solución 80 mL de alginato de sodio 3 % (p/v), con una micropipeta se tomaron de 1 a 2 protocormos, se gotearon sobre la solución de CaCl₂ 0.1 M y se mantuvieron en ésta durante 20 min. La solución de CaCl₂ se decantó y las cápsulas de alginato de calcio que se formaron (5 mm de diámetro), se colocaron en cajas Petri de cristal con papel filtro estéril para retirar el exceso de solución. Posteriormente se colocaron en matraces de cristal Erlenmeyer con capacidad de 125 mL con 50 mL de medio MS basal (líquido), con cuatro concentraciones de sacarosa (0.5, 0.75, 1.0 y 1.25 M) y un tratamiento control sin sacarosa; cada tratamiento contó con cuatro repeticiones, la unidad experimental fue un frasco de cristal con cinco cápsulas. Los matraces se mantuvieron en agitación constante durante 16/8 h luz/oscuridad.

Transcurrido el tiempo de exposición (24 h), las cápsulas se retiraron del medio líquido con sacarosa y se colocaron sobre rejillas de aluminio, dentro de contenedores de cristal con gel de sílice (400 g) estéril. Los contenedores se cerraron herméticamente durante 4.5 h. Después de la osmodeshidratación, las cápsulas se colocaron en criotubos de polipropileno con capacidad de 2 mL (Sarstedt®) y se sumergieron en nitrógeno líquido durante 24 h. Los criotubos se colocaron en la corriente de aire de la campana de flujo laminar durante 60 segundos (recalentamiento lento). Las cápsulas se retiraron y se colocaron sobre 20 mL de medio MS basal (recuperación). Durante 8 d se mantuvieron en oscuridad para evitar fotooxidación en los protocormos y después se colocaron en fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad (Figura 2).

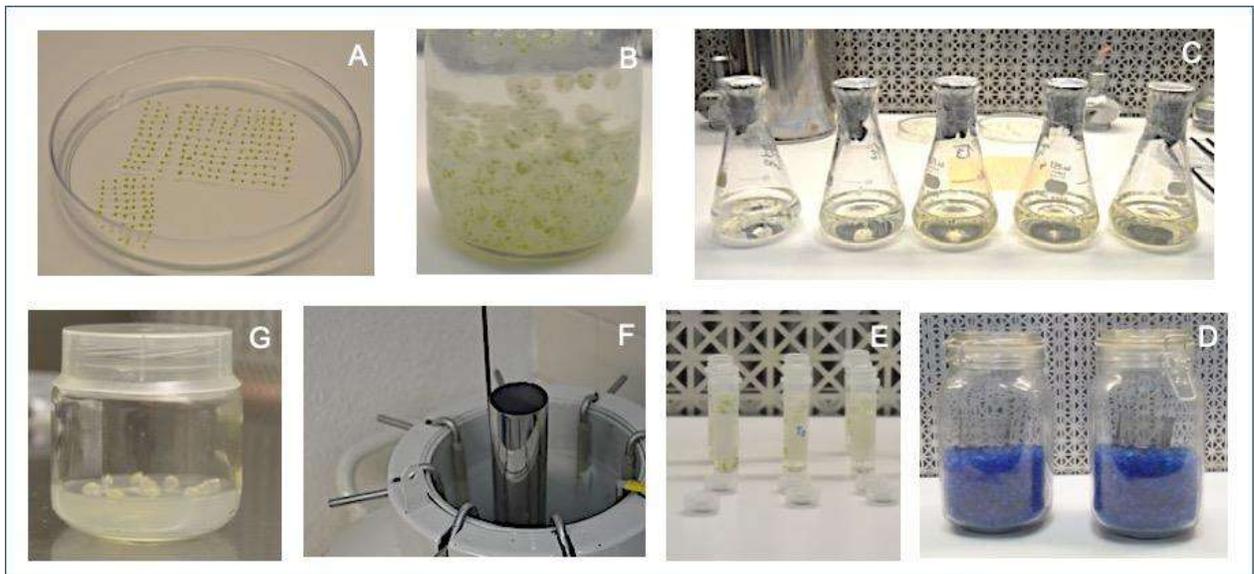


Figura 2. Técnica de encapsulación-deshidratación utilizada para la crioconservación en protocormos de *L. autumnalis*. A) cultivo de protocormos, B) encapsulación de protocormos en alginato de Ca, C) exposición en sacarosa, D) deshidratación en gel de sílice, E y F) exposición en nitrógeno líquido y G) recuperación en medio de cultivo MS.

E3: Precultivo de protocormos para las técnicas de vitrificación. Determinación de la concentración de sacarosa. Los protocormos se colocaron sobre 20 mL de medio MS basal con seis concentraciones de sacarosa (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 M) y un tratamiento control sin sacarosa; se colocaron 50 protocormos por caja Petri (diámetro de 90 x 15 cm²) y se incubaron durante 24 horas (16/8 h), transcurrido el tiempo de exposición se subcultivaron en medio fresco MS basal para su recuperación. Los siete tratamientos se repitieron dos veces, la unidad experimental fue una caja Petri con 50 protocormos.

E4: Precultivo de protocormos para las técnicas de vitrificación. Determinación del tiempo de exposición a sacarosa. En cuatro cajas Petri con medio MS basal con sacarosa 0.2 M, se colocaron 50 protocormos y se incubaron a 24 ± 1 °C, bajo fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad), durante 24, 32, 48 y 72 h, respectivamente. Posteriormente, se subcultivaron en medio MS basal. La viabilidad de protocormos se evaluó 15 días después del subcultivo, los protocormos verdes se consideraron viables, los cloróticos potencialmente viables y los necróticos no viables. La regeneración de plántulas a partir de los protocormos (regeneración se evaluó 30 días después del subcultivo).

E5: Solución de carga E-V. Determinación del tiempo de exposición. Se precultivaron 400 protocormos sobre cajas Petri con medio MS basal adicionado con sacarosa 0.2 M y se incubaron durante

48 horas. Los protocormos se retiraron de las condiciones de precultivo para colocarlos en solución de alginato de sodio al 3 % (p/v) y se gotearon con micropipeta en una solución de CaCl₂ 0.1 M (durante 20 min). La solución de CaCl₂ se eliminó y las cápsulas se colocaron dentro de cajas de Petri con papel filtro estéril. Posteriormente se colocaron 10 cápsulas en criotubos de polipropileno de 2 mL de capacidad (Sarstedt®) y se adicionó 1.5 mL de la solución de carga (sacarosa 0.4 M y glicerol 2 M) durante 15, 30 y 60 min, y un tratamiento sin exposición a la solución de carga, se seleccionó un testigo para cada tiempo (10 cápsulas, sin inmersión en nitrógeno líquido).

La solución de carga fue sustituida por 1.5 mL de solución vitrificadora PVS2 (etilenglicol 15 % (p/v), dimetil sulfoxido 15 % (p/v), glicerol 30 % (p/v) y sacarosa 0.4 M) o PVS3 (glicerol 50 % (p/v) y sacarosa 50 % (p/v)) durante 20 min y posteriormente fue reemplazada por solución PVS fresca. Los criotubos se introdujeron en nitrógeno líquido durante 24 h.

Después los crioviales se colocaron en baño maría a temperatura de 40 ± 2 °C durante 60 s; se retiró la solución vitrificadora y las cápsulas se colocaron en la solución de lavado (sacarosa 2 M y sales inorgánicas MS 50 %) durante 180 s. Posteriormente las cápsulas se colocaron sobre papel filtro estéril en una caja Petri para retirar el exceso de solución. Por último, se colocaron cinco cápsulas en 20 mL de medio MS basal y se mantuvieron en oscuridad durante 8 d. Transcurrido este tiempo se colocaron en fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad) estas condiciones fueron iguales para todos los ensayos expuestos a nitrógeno líquido en este estudio.

E6: Condiciones de solución vitrificadora para la técnica de E-V. Determinación del tiempo de exposición y tipo de PVS. Se colocaron 10 cápsulas (400 protocormos precultivados y encapsulados) por criotubo de polipropileno con capacidad para 2 mL (Sarstedt®). En cada criotubo se adicionó 1.5 mL de solución de carga (sacarosa 0.4 M y glicerol 2 M) durante 30 min. Transcurrido el tiempo de exposición se retiró esta solución. Se probaron ocho tratamientos cuatro para cada tipo de PVS y, consistieron en adicionar 1.5 mL de solución vitrificadora PVS2 o PVS3 (temperatura ambiente) durante 20, 40, 60 y 120 min; se probó un tratamiento sin exposición a la solución PVS2 o PVS3. Al terminar el tiempo de exposición la solución vitrificadora fue sustituida por solución PVS fresca, y los criotubos se sumergieron 24 h en nitrógeno líquido (Figura 3).

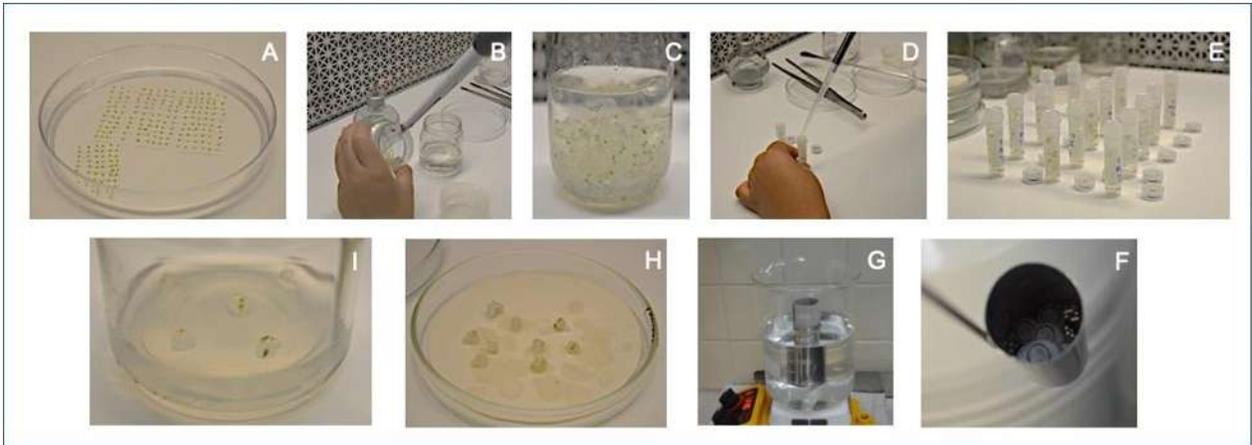


Figura 3. Técnica de encapsulación-vitrificación para la criopreservación en protocormos de *L. autumnalis*. A) Precultivo de protocormos, B y C) encapsulación de protocormos en alginato de Ca, D) exposición en solución de carga, E) exposición en solución PVS, F) inmersión en nitrógeno líquido, G) recalentamiento 40 °C, H) exposición a solución de lavado e I) recuperación en medio de cultivo MS.

E7: Solución de carga E-V. Determinación del tiempo de exposición. Dentro de cada cavidad de las láminas de aluminio (37 mm de largo x 7 mm de ancho; 10 cavidades de 1.5 mm y profundidad de 0.75 mm) se formaron gotas de alginato de sodio al 2 % (p/v) y se colocó un protocormo precultivado bajo las condiciones óptimas ya establecidas (160 protocormos); se adicionó CaCl_2 0.1 M hasta cubrir las láminas para la gelificación de las gotas (20 min).

A continuación, las láminas se colocaron sobre papel filtro estéril en cajas de Petri para remover el excedente de solución y se pusieron dentro de criotubos de polipropileno con capacidad de 2 mL (Sarstedt®). Se probaron tres tratamientos que consistieron en adicionar 1.5 mL de solución de carga (0.4 M de sacarosa y 2 M de glicerol) durante 15, 30 y 60 min; y un tratamiento sin exposición a la solución de carga.

Transcurrido el tiempo se retiró la solución de carga y se adicionó 1.5 mL de solución vitrificante (PVS2 o PVS3) durante 20 min. La solución PVS se sustituyó por solución fresca y los criotubos se expusieron 24 h a nitrógeno líquido. Después del tiempo de exposición, los criotubos se colocaron en baño María a 40 ± 2 °C durante 60 s; y se retiró la solución vitrificadora, las crío-láminas se colocaron en cajas Petri con solución de lavado (sacarosa 2.0 M y sales inorgánicas MS 50 %) durante 180 s. Transcurrido el tiempo de exposición las crío-láminas se colocaron sobre papel filtro estéril en cajas Petri y los protocormos se colocaron en medio MS basal de recuperación.

E8: Condiciones de solución vitrificadora para la técnica de V C-L. Determinación del tiempo de exposición y tipo de PVS. Se formaron gotas de alginato en las cavidades de las crío-láminas y se colocó un protocormo precultivado en cada gota (200 protocormos). Tras la gelificación, las crío-láminas se introdujeron en los criotubos con capacidad de 2 mL y se añadió 1.5 mL de solución de carga durante 30 min. La solución de carga se retiró y se adicionó 1.5 mL de solución vitrificadora PVS2 o PVS3 (temperatura ambiente) para probar cuatro tratamientos durante 20, 40, 60 y 120 min; se probó un tratamiento sin exposición para cada PVS (20 protocormos para cada tratamiento). Después del tiempo de exposición, la solución vitrificadora se sustituyó por solución fresca y se sumergieron en nitrógeno líquido durante 24 h. El recalentamiento, la recuperación y almacenamiento se efectuó con la misma metodología que en el ensayo anterior (Figura 4).

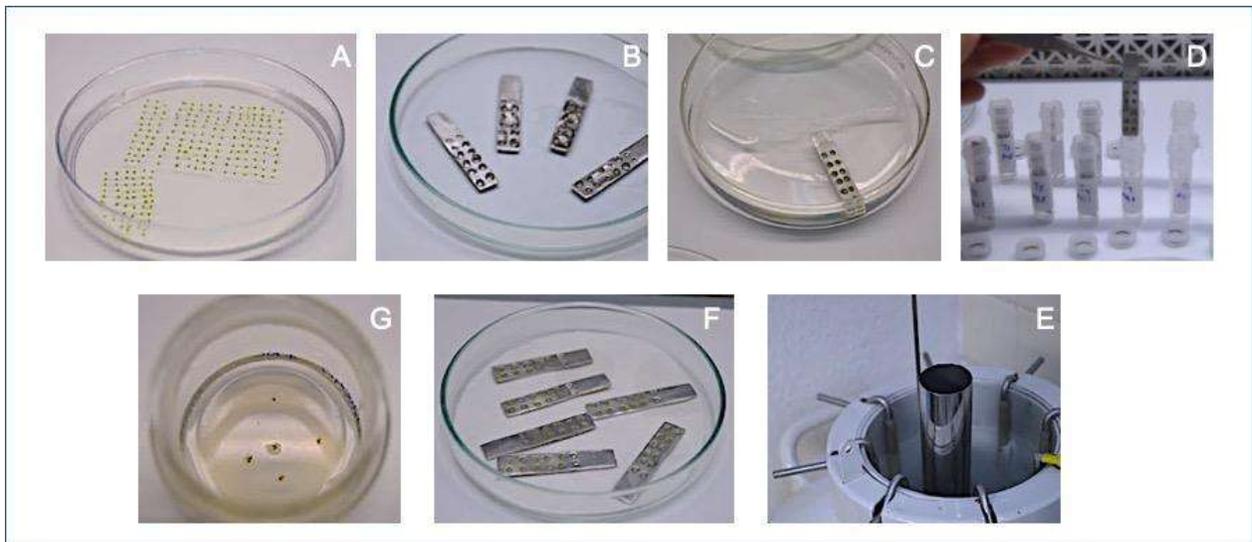


Figura 4. Técnica de crío-lámina para la crioconservación en protocormos de *Laelia autumnalis*. A) precultivo, B) fijación de protocormos en crío-láminas con alginato de Ca, C) exposición a solución de carga, D) exposición a soluciones PVS, E) inmersión en nitrógeno líquido, F) solución de lavado y G) recuperación de protocormos en medio MS.

Viabilidad de protocormos después de la crioconservación. Para los experimentos E2, E5, E6, E7 y E8 se evaluó esta variable viabilidad después de 30 días de la crioconservación se tomaron 10 protocormos de cada tratamiento en cada experimento y se expusieron en 20 μ L de solución de diacetato de fluoresceína (FDA) al 0.05 %, con igual volumen de agua destilada (10 μ L) y colorante FDA (10 μ L) (50 mg en 100 mL de acetona absoluta) durante 10 min y se examinaron con microscopio de fluorescencia Nikon® 254 mm (luz ultravioleta). Los protocormos observados con fluorescencia completa se consideraron viables y los que no mostraron fluorescencia como no viables.

Parámetros morfológicos en protocormos crioconservados. En todos los experimentos de crioconservación después de 60 días de cultivados los protocormos en medio MS basal de recuperación, se evaluó la supervivencia, crecimiento y/o formación de nuevos individuos.

Análisis estadístico. En cada ensayo cada tratamiento se repitió cinco veces, la unidad experimental fueron 10 protocormos en un cróovial. Todos los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA). Para la comparación de medias entre tratamientos se utilizó una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). El análisis estadístico se realizó con el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

E1: Curva de deshidratación de cápsulas de alginato de calcio. La polimerización de las cápsulas se evaluó de manera visual, ya que son traslúcidas inmediatamente después de su formación y progresivamente se vuelven opacas al completar la polimerización. De acuerdo con la curva de desecación (Figura 5), las cápsulas alcanzaron en su interior 20 % de humedad relativa después de 4.5 horas; este porcentaje corresponde a la cantidad de agua no congelable en una célula vegetal (Jitsopakul *et al.*, 2012) y el contenido de agua en el interior de las cápsulas, esto garantiza la mayor supervivencia después del enfriamiento en nitrógeno líquido (González-Arno y Engelman, 2006), sin embargo, este valor puede variar según la especie y el tipo de muestra.

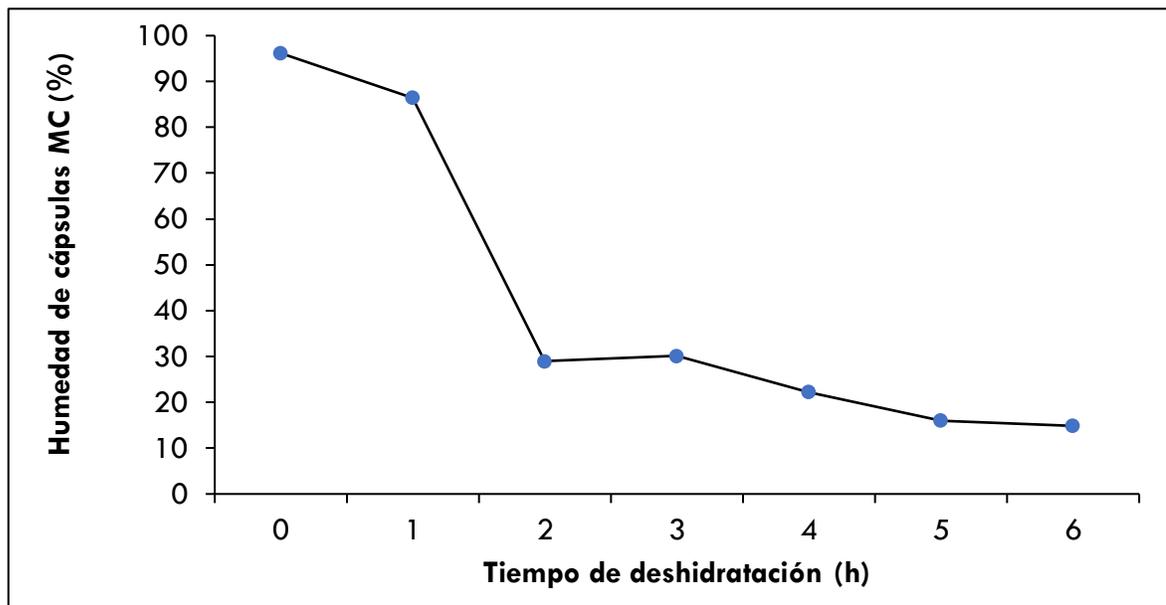


Figura 5. Curva de deshidratación para cápsulas de alginato de calcio con gel de sílice (recipiente de 20 cm de altura x 12 cm de diámetro, 10 cápsulas y 400 g de gel de sílice por recipiente).

E2: Precultivo para la deshidratación de cápsulas en sacarosa. La concentración de sacarosa influyó sobre la reacción fluorocromática de los protocormos (Cuadro 1), lo que indica la viabilidad de estos tejidos. Los protocormos osmodeshidratados con 1 y 1.25 M de sacarosa reflejaron 100 % de fluorescencia, es decir estos tejidos no presentaron daños por enfriamiento o recalentamiento, ya que la reacción fluorocromática permite diferenciar fácilmente los protocormos viables al tornarse de color verde intenso (Rejón *et al.*, 2010), la penetración rápida del fluorocromo en el citoplasma se hidroliza

por esterases y deja libre la fluoresceína, polar y fluorescente (Passarelli, 1999). Esta respuesta se origina porque en las membranas intactas, la fluoresceína se acumula en el citoplasma que emite fluorescencia verde amarillenta bajo el microscopio de fluorescencia.

Los protocormos del tratamiento testigo (sin precultivo en sacarosa) reflejaron fluorescencia solo en 20 % de sus tejidos, esto se debe a que las membranas de la mayor parte de sus células no son funcionales, porque la fluoresceína pasa rápidamente sin incorporarse a la célula (Passarelli, 1999) y los protocormos no emiten coloración bajo el microscopio de fluorescencia. (Cuadro 1 y Figura 6). Conforme se incrementó la concentración de sacarosa se aumentó el porcentaje de fluorescencia. Esta respuesta indica que la sacarosa funciona como reductora del potencial osmótico de las células para conferir deshidratación y tolerancia al congelamiento (Benson y Bremner, 2004), debido al cambio de molaridades de la sacarosa en las cápsulas por la desecación, lo que resulta en una transición vítrea durante el enfriamiento en nitrógeno líquido (Engelman y Takagi, 2000). Además, la prueba de fluorescencia es adecuada para evaluar la integridad de las membranas como la actividad esterasa (Rejón *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la concentración de sacarosa en la reacción fluorocromática de protocormos de *L. autumnalis* crioconservados por encapsulación-deshidratación.

Concentración de sacarosa (M)	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Pr>F	CV	R ₂
Reacción fluorocromática	4	23296.0	5824.0	<.0001**	7.37	0.97

**Altamente significativo ($Pr \leq 0.05$), CV=Coeficiente de variación y R₂= Coeficiente de determinación.

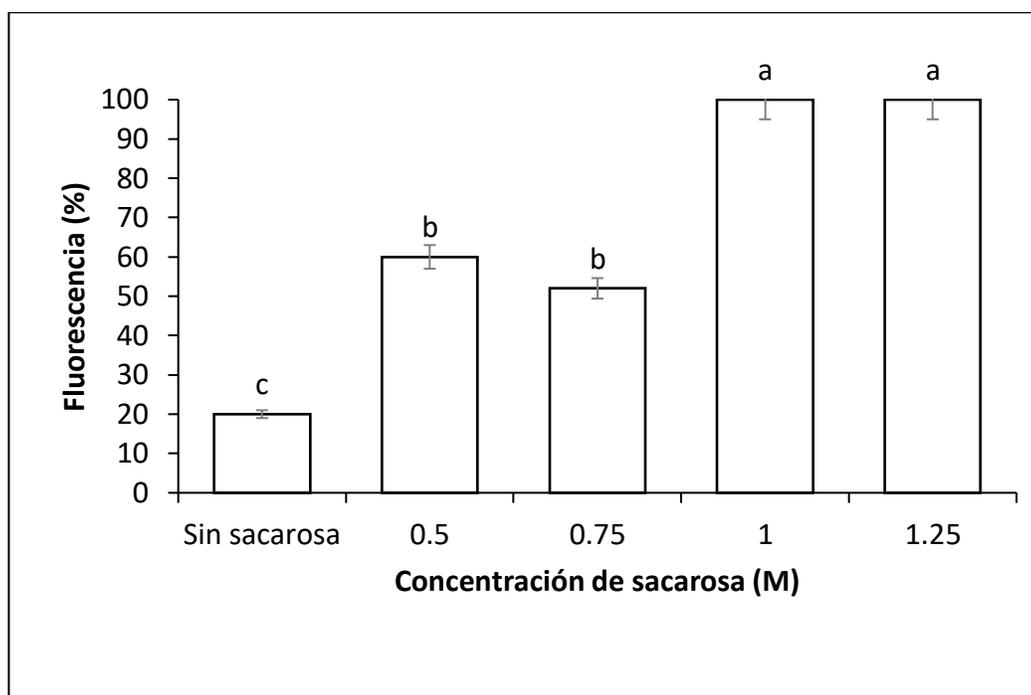


Figura 6. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la fluorescencia de protocormos de *L. autumnalis* después de la criopreservación con encapsulación-deshidratación.

E3: Precultivo de protocormos para las técnicas de vitrificación. Determinación de la concentración de sacarosa. En el tercer ensayo, se observó que la concentración de sacarosa afectó la supervivencia y el color de los protocormos tratados (Cuadro 2). A medida que se aumentó la concentración los protocormos perdieron su color verde y se tornaron cloróticos (Figura 6). El éxito de un protocolo de criopreservación está en función del porcentaje de supervivencia y desarrollo de brotes sin anomalías. Se ha observado que los protocormos sin precultivo no sobreviven a la criopreservación y mueren (Yin y Hong, 2009).

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la concentración de sacarosa en la supervivencia de los protocormos de *L. autumnalis*.

Concentración de sacarosa (M)	Grados de libertad	Cuadrado de la media	Pr>F	CV	R ₂
Protocormos verdes	6	841.23	0.0178*	55.68	0.83
Protocormos cloróticos	6	2226.57	<.0001**	12.84	0.96
Protocormos necróticos	6	410.66	0.0057*	42.78	0.88

** Altamente significativa, *Significativa (Pr ≤ 0.05), CV= Coeficiente de variación CV y R₂= Coeficiente de determinación.

Los tratamientos expuestos a 0.8 M de sacarosa presentaron 2 % menos (52 %) de protocormos verdes (viables) en comparación del tratamiento sin sacarosa, aunque este tratamiento registró el porcentaje mayor de protocormos cloróticos (Figura 7A). El pretratamiento con sacarosa antes de la exposición al nitrógeno líquido, induce tolerancia osmótica a la solución PVS (Rahmah *et al.*, 2015).

En los tratamientos control y con 0.2 M de sacarosa se observó el mismo porcentaje de protocormos cloróticos (19 %) esto es 57 % menos que las concentraciones más altas de sacarosa 0.8, 1.0 y 1.2 M que en promedio presentaron 76 % (Figura 7B). Sin embargo, el mayor porcentaje de protocormos necróticos se observó (35 %) con 0.2 M de sacarosa respecto a las concentraciones de 0.8, 1.0 y 1.2 M de sacarosa (3, 4 y 1 %, respectivamente) (Figura 7D). El precultivo en sacarosa aumenta el contenido de proteínas solubles en las células (Barraco *et al.*, 2014). Esto podría deberse a los azúcares que sustituyen las moléculas de agua que forman enlaces de hidrógeno con los grupos principales de fosfolípidos polares de la membrana, estabilizan las proteínas de la membrana y mantiene así la integridad del plasmalema durante la deshidratación y la congelación (Crowe *et al.*, 1987).

Con lo que se demuestra que es importante el precultivo de sacarosa ya que brinda la oportunidad de aumentar la tolerancia tanto a la deshidratación como la congelación en nitrógeno líquido (Khoddamzadeh *et al.*, 2011).

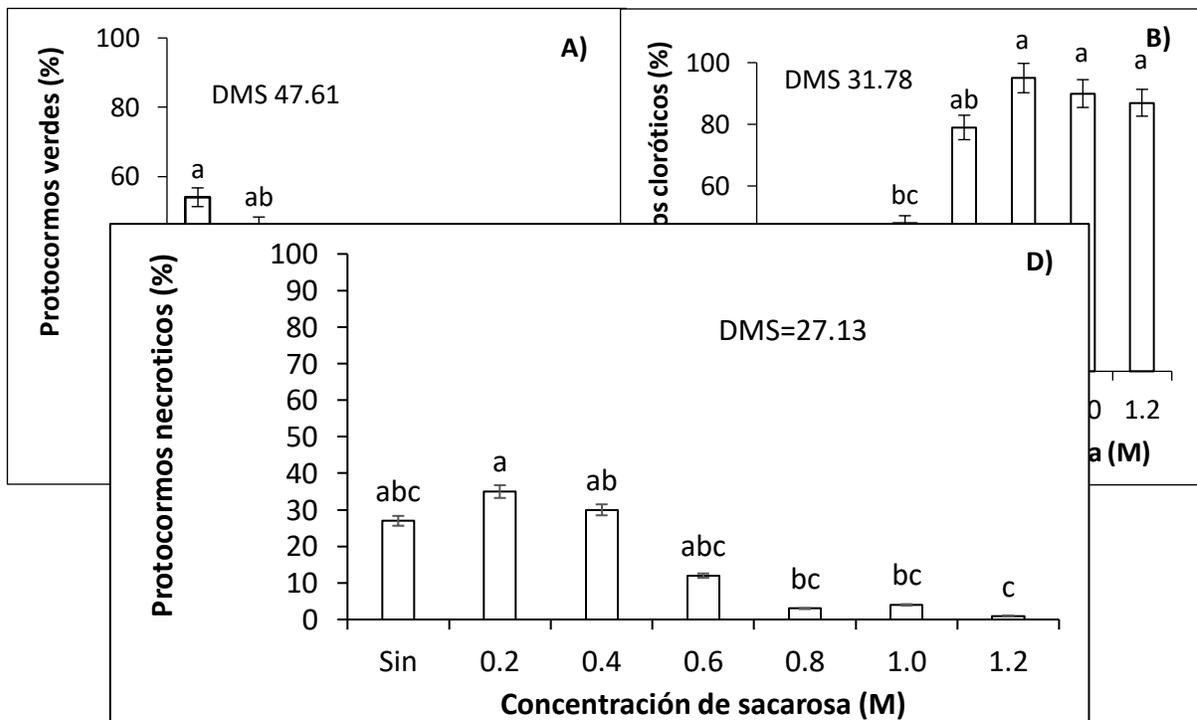


Figura 7. Efecto de la osmodeshidratación *in vitro* con diferentes niveles de sacarosa sobre protocormos verdes (A), protocormos cloróticos (B) y necróticos (C) de la orquídea *Laelia autumnalis*.

Efecto de la concentración de sacarosa sobre la formación de vitroplántulas. La regeneración de plántulas se vio afectada por la concentración de sacarosa usada en el preacondicionamiento con sacarosa (Cuadro 3). El precultivo con concentración alta de sacarosa, es extremadamente eficaz para la inducción de osmo-tolerancia en plantas crioconservadas (Dhungana *et al.*, 2017).

Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la concentración de sacarosa en la regeneración plántulas a partir de protocormos de *L. autumnalis*.

Concentración de sacarosa (M)	Grados de libertad	Cuadrado de la media	Pr \geq F	CV	R ₂
Protocormos que regeneraron plántulas	6	1906.86	0.0112*	47.46	0.85
Protocormos no regenerados	6	1907.16	0.0112*	25.58	0.85

*Significativo (Pr \leq 0.05), CV= Coeficiente de variación y R₂= Coeficiente de determinación.

Los protocormos expuestos a 0.6 M de sacarosa formaron 70 % menos plántulas en comparación con el tratamiento testigo, el cual obtuvo el mayor porcentaje de plántulas regeneradas (81 %) (Figura 8A). La exposición a 0.8 M de sacarosa inhibió por completo la regeneración de plántulas. En semillas de *Jatropha curcas* L. se observó un comportamiento similar, ya que, en los embriones pretratados con la mayor concentración de sacarosa (0.75 M) mostraron clorosis y no se desarrollaron (17 %) (Prada *et al.*, 2015), en este estudio, algunos de los protocormos tratados con sacarosa presentaron clorosis (Figura 9). Sin embargo, si se observó desarrollo, aunque más lento (Figura 8B).

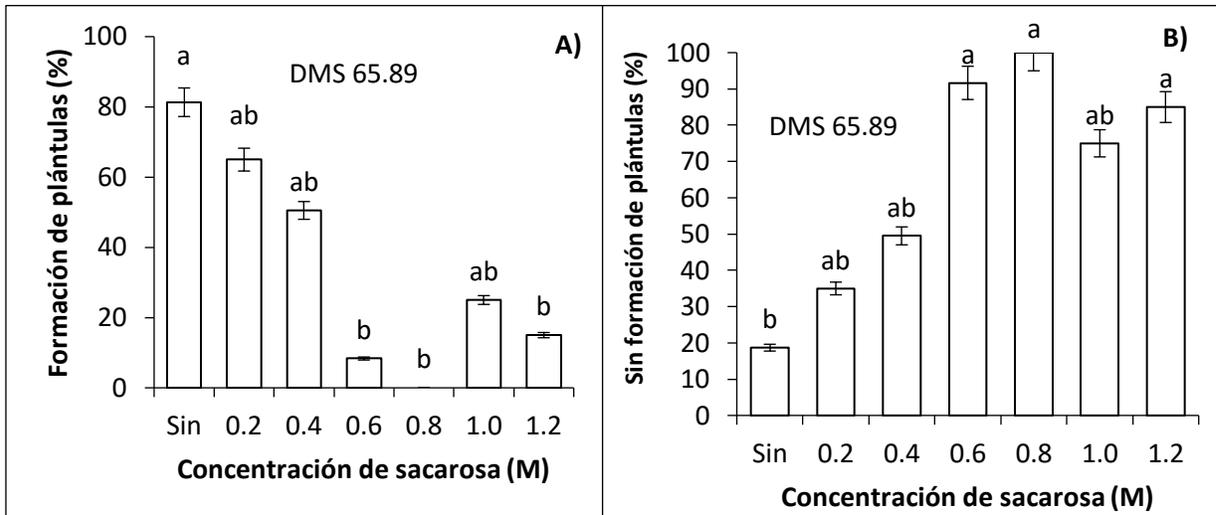


Figura 8. Efecto de la osmodeshidratación con sacarosa en el desarrollo de vitroplántulas a partir de protocormos (A) protocormos que formaron plántulas (B) protocormos vivos que no formaron plántulas *L. autumnalis*.

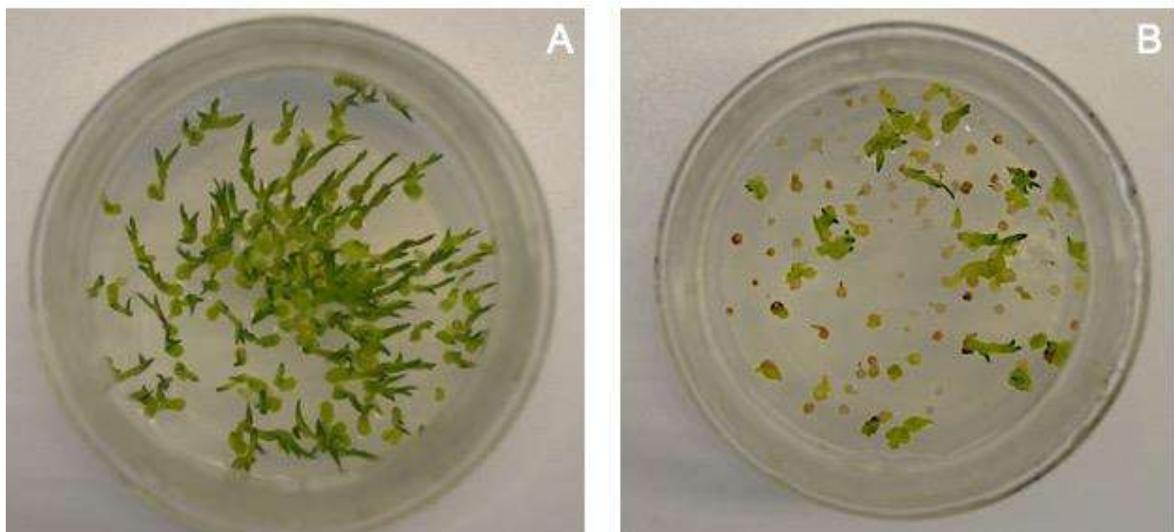


Figura 9. Efecto de la osmodeshidratación con sacarosa en el desarrollo de vitroplántulas a partir de protocormos de *L. autumnalis* precultivados con distintos niveles de sacarosa A) sin sacarosa B) sacarosa 1.2 M.

E4: Precultivo de protocormos para las técnicas de vitrificación. Determinación del tiempo de exposición a sacarosa. El tiempo de exposición a la sacarosa no influyó sobre la viabilidad de los tejidos, ya que el porcentaje de protocormos verdes, cloróticos o necróticos fue similar entre tratamientos (Cuadro 4). Los protocolos de crioconservación incluyen el uso de aditivos y tratamientos previos,

encaminados a reducir la probabilidad de nucleación de hielo a todas las temperaturas, principalmente a través del aumento en la micro-viscosidad (Teixeira da Silva *et al.*, 2014).

Cuadro 4. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del tiempo de exposición a la sacarosa en la recuperación de los protocormos de *L. autumnalis*.

Exposición a sacarosa (T)	Grados de libertar	Cuadrado de la media	Pr>F	CV	R ₂
Protocormos verdes	3	34.66	0.5445 _{NS}	7.04	0.38
Protocormos cloróticos	3	8.50	0.8389 _{NS}	96.04	0.17
Protocormos necróticos	3	9.83	0.5863 _{NS}	163.29	0.35

_{NS} No significativo para ($Pr \leq 0.05$), CV= Coeficiente de variación y R₂= Coeficiente de determinación.

En los protocormos colocados en 0.2 M de sacarosa y expuestos a diferentes tiempos de precultivo, se obtuvo en promedio general 92 % de protocormos verdes (Figura 10A), 6 % en promedio de protocormos cloróticos y 2 % de protocormos necróticos (Figura 10B). Porcentajes superiores al 30 % logrado en PLBs de *Brassidium Shooting Star* precultivados con 0.25 M de sacarosa durante 7 días, se observó un porcentaje de supervivencia del 30 % (Rahmah *et al.*, 2015). El precultivo de PLBs de *Phalaenopsis bellina* en 0.75 M de sacarosa mostró un aumento de viabilidad cuando se cultivaron durante 3 días (A530nm0.37) sin embargo esta disminuyó cuando el precultivo se extendió por 5 días (A530nm0.33) (Khoddamzadeh *et al.*, 2011). La deshidratación osmótica en PLBs de *Cymbidium* expuestos en sacarosa 2 % durante 24 h aumentó la formación y desarrollo de nuevos PLBs (Teixeira da Silva, 2013). De igual forma la acumulación en las membranas de crioprotectores endógenos (azúcar o azúcar alcohol) pueden aumentar la estabilidad de las mismas en condiciones de deshidratación severa (Sakai y Engelmann, 2007).

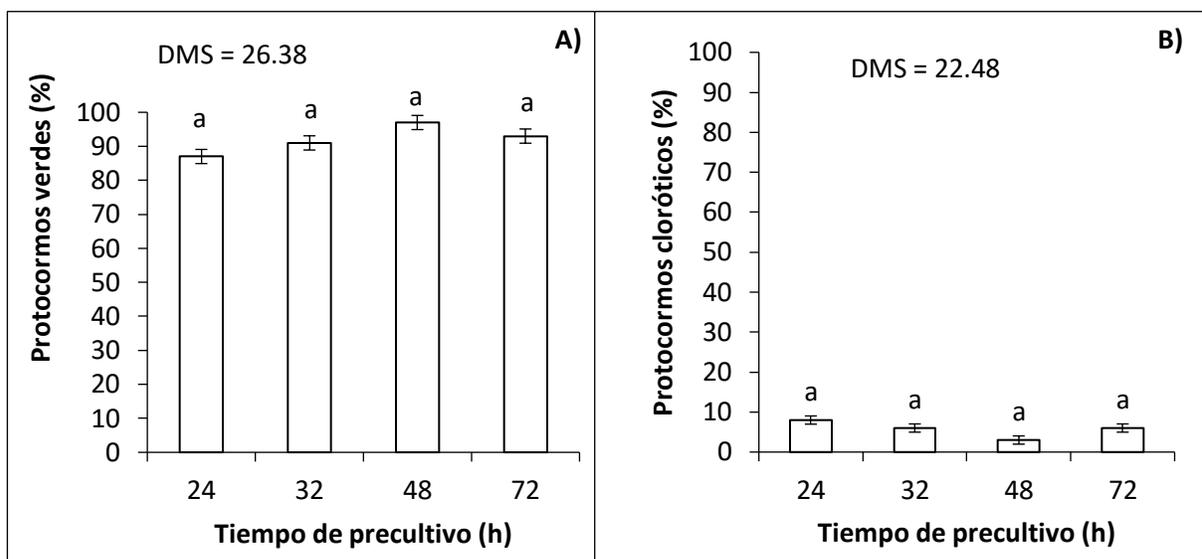


Figura 10. Efecto del tiempo de precultivo (h) en 0.2 M de sacarosa sobre la supervivencia de protocormos verdes (A) y cloróticos (B) en la orquídea *Laelia autumnalis*.

Regeneración de protocormos. Al igual que para la variable supervivencia, el tiempo de exposición (h) del precultivo en sacarosa no influyó en la formación de plántulas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del tiempo de exposición a la sacarosa en la formación de plántulas *in vitro* a partir de protocormos de *L. autumnalis*.

Tiempo de exposición a sacarosa (h)	Grados de libertad	Cuadrado de la media	Pr>F	CV	R ₂
Protocormos regenerados	3	419.80	0.0979 _{NS}	13.56	0.76
Protocormos no regenerados	3	419.80	0.0979 _{NS}	37.13	0.76

_{NS} No significativo ($Pr \geq 0.05$), CV= Coeficiente de variación y R₂= Coeficiente de determinación.

Los diferentes tiempos de exposición (h) en el medio de cultivo adicionado con 0.2 M de sacarosa, no mostraron diferencias estadísticas significativas sobre la formación de plántulas (Figura 11A).

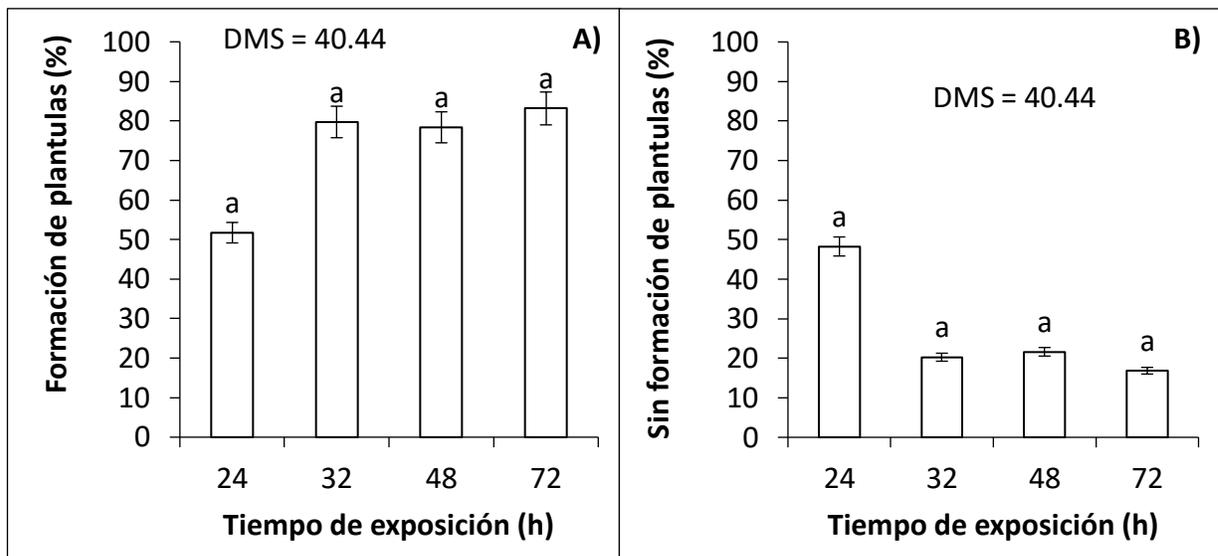


Figura 11. Efecto del tiempo de precultivo (h) en 0.2 M de sacarosa sobre el desarrollo a vitroplántulas (A) y sin formación de vitroplántulas (B) provenientes de protocormos *in vitro* de *Laelia autumnalis*.

E5: Solución de carga E-V. Determinación del tiempo de exposición. Los factores tiempo de exposición a la solución de carga, el tipo de solución vitrificante y la interacción entre estos dos (Cuadro 6), influyeron en la viabilidad de los protocormos, ya que la fluorescencia tiene una baja permeabilidad debido a su carácter polar, lo que ocasiona que una vez que penetra no pueda salir a través del plasmalema, y queda retenida, acumulándose en aquellas células con el plasmalema bien conservado. Solo los niveles de actividad esterasa adecuados y con el plasmalema integro muestran fluorescencia verdosa, indicativa de su viabilidad (Rejón *et al.*, 2010).

Cuadro 6. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del tiempo de exposición a la solución de carga y del tipo de solución PVS en la viabilidad de protocormos de *L. autumnalis* criopreservados por encapsulación-vitrificación.

Reacción fluorocromática	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Pr>F
Tiempo de exposición a la solución de carga	3	16360.0	5453.3	<.0001**

Tipo de solución PVS	1	3920.0	3920.0	0.0004**
Tiempo*PVS	3	4840.0	1613.3	0.0015**

**Altamente significativo ($Pr \leq 0.05$) CV= Coeficiente de variación 34.35 y R_2 = Coeficiente de determinación 0.55.

La exposición durante 15 min a la solución de carga y PVS3, aumentó el porcentaje de protocormos viables (74 %) después de la crioconservación; seguido de los protocormos expuestos (15 min) en la solución de carga PVS2 que presentaron 70 % de viabilidad, estos dos tratamientos fueron superiores a los no expuestos a la solución de carga (Figura 12). Sin embargo, la viabilidad se ve afectada por efecto de la PVS3 y la osmodeshidratación previa (solución de carga) conforme incrementa éste, podría deberse a la lenta penetración de la PVS3 en los protocormos más osmóticamente más deshidratados por el tiempo de exposición (Figura 13).

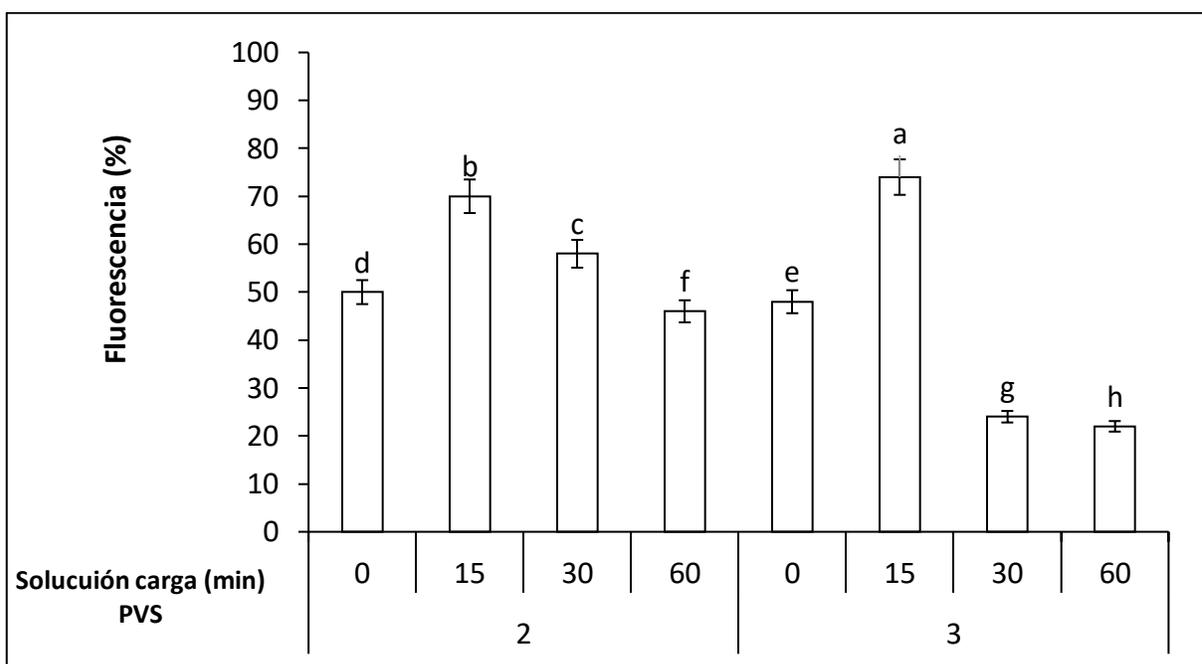


Figura 12. Efecto del tiempo de exposición a la solución de carga y tipo de PVS en la viabilidad de protocormos de *L. autumnalis*, determinada por fluorescencia, después de la crioconservación con la técnica de encapsulación-vitrificación.

E7: Solución de carga V C-L. Determinación del tiempo de exposición. La viabilidad de los protocormos se vio afectada por el tiempo de exposición a la solución de carga, el tipo de solución PVS y la interacción entre ambos factores (Cuadro 7). La acumulación de fluoresceína en una célula nos indica

que esta viva, debido a la presencia de enzimas esterases activas y la posesión de una membrana plasmática inactiva, lo que evita dar falsos negativos con el uso de esta prueba.

Cuadro 7. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del tiempo de exposición a la solución de carga y tipo de solución PVS en la viabilidad de protocormos de *L. autumnalis* crioconservados por V crío-lámina V.

Reacción fluorocromática	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Pr<F
Tiempo de exposición a la solución de carga	3	5070.0	1690.0	<.0001**
Tipo de solución PVS	1	90.0	90.0	0.3725 _{NS}
Tiempo*PVS	3	2510.0	836.6	0.0006**

_{NS} No significativo, **Altamente significativo ($Pr \leq 0.05$) CV= Coeficiente de variación 21.18 y R_2 = Coeficiente de determinación 0.68.

Los protocormos expuestos a solución de carga y PVS2 durante 30 min mostraron un porcentaje de viabilidad 72 %, tratamiento estadísticamente similar al conformado por 60 min en solución de carga y PVS2 (52 %) y, solución de carga 30 y 60 min más PVS3 (52 y 60 %, respectivamente) (Figura 13). Sólo 20 % de los protocormos del tratamiento testigo fueron viables, lo cual demuestra que la combinación de la solución de carga (glicerol 2 M más sacarosa 0.4 M) y la solución PVS estimulan la osmotolerancia de los tejidos crioconservados por crío-lámina V.

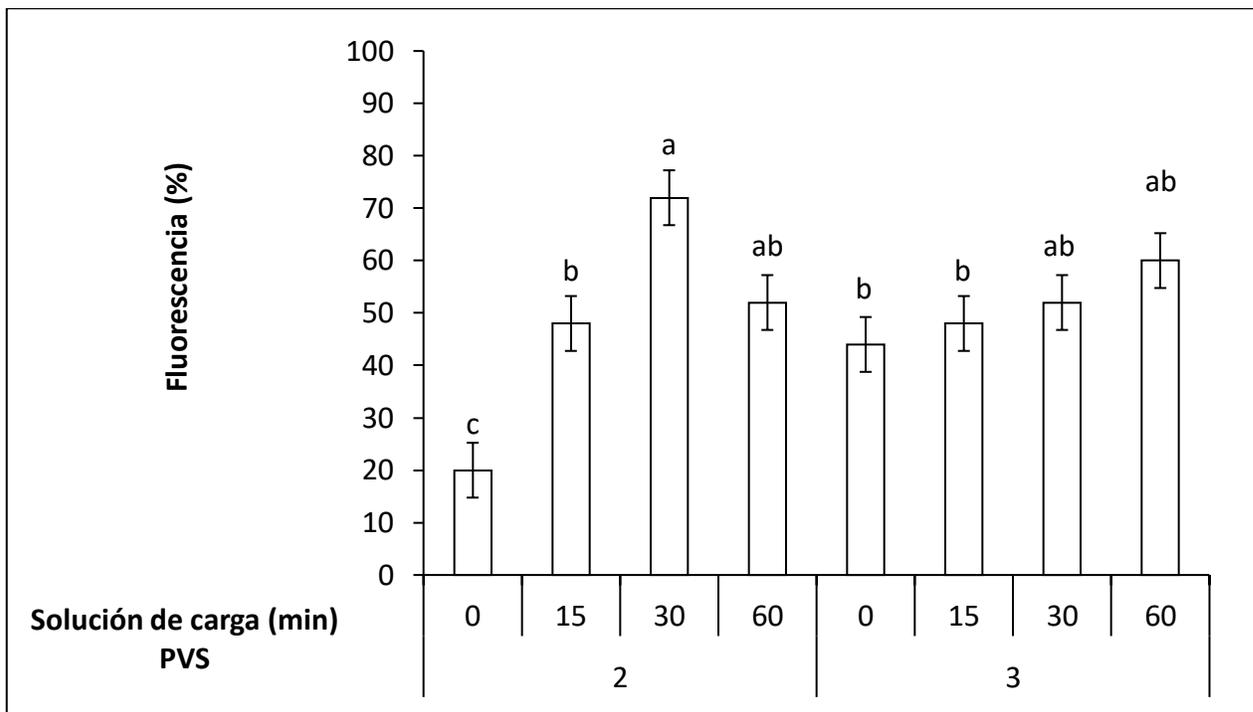


Figura 13. Efecto del tiempo de exposición a la solución de carga sobre la viabilidad de protocormos de *L. autumnalis* después de la criopreservación por V crío-lámina.

E8: Condiciones de solución vitrificadora para la técnica de V C-L. Determinación del tiempo de exposición y tipo de PVS. La viabilidad de los protocormos de *L. autumnalis* se vio afectada por el tiempo de exposición y la interacción entre el tiempo de exposición y tipo de PVS (Cuadro 8). Solo después de la penetración del diacetato de fluoresceína en las células, es posible detectar una señal de fluorescencia en los tejidos que no están dañados (Barnoy *et al.*, 2018).

Cuadro 8. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del tiempo de exposición y tipo de solución PVS en la viabilidad de protocormos de *L. autumnalis* criopreservados por V crío-lámina.

Reacción fluorocromática	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Pr>F
Tiempo de exposición a la solución PVS	4	32460.9	8115.2	<.0001**
Tipo de PVS	1	200.0	200.0	0.2390 _{NS}
Tiempo*PVS	4	22707.0	5676.7	<.0001**

_{NS} No significativo, **Altamente significativo (Pr ≤ 0.05), CV= Coeficiente de variación 16.71 y

R₂= Coeficiente de determinación 0.90.

El tipo de PVS y el tiempo de exposición a esta influyeron en la viabilidad de los protocormos. Los protocormos expuestos durante 20, 40 y 60 min en PVS2 mostraron un promedio 94 % más tejido viable que el tratamiento testigo y el mayor tiempo de exposición (120 min). Sin embargo, para los tejidos expuestos en PVS3 durante el mayor tiempo (40, 60 y 120 min) la viabilidad de los tejidos aumenta 60 % que los expuestos durante 20 min y, 80 % más que el tratamiento testigo (Figura 14).

Con la técnica de V crío-lámina los protocormos pueden ser fácilmente expuestos a la solución de carga y PVS sin lastimar los tejidos, lo que facilita la manipulación y reduce las lesiones en las células (Sekizawa *et al.*, 2011), esto aumenta la posibilidad de almacenamiento por largo tiempo (Figura 15).

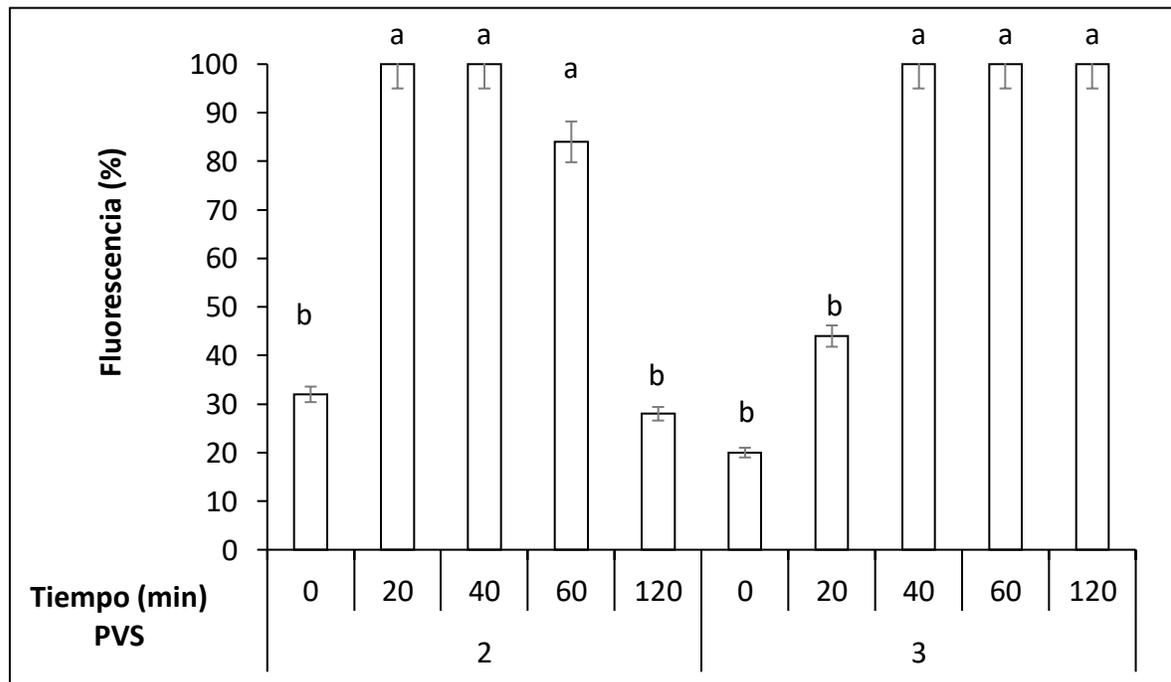


Figura 14. Efecto del tiempo de exposición a la solución PVS sobre la viabilidad de protocormos de *L. autumnalis* después de la crioconservación por V frío-lámina.

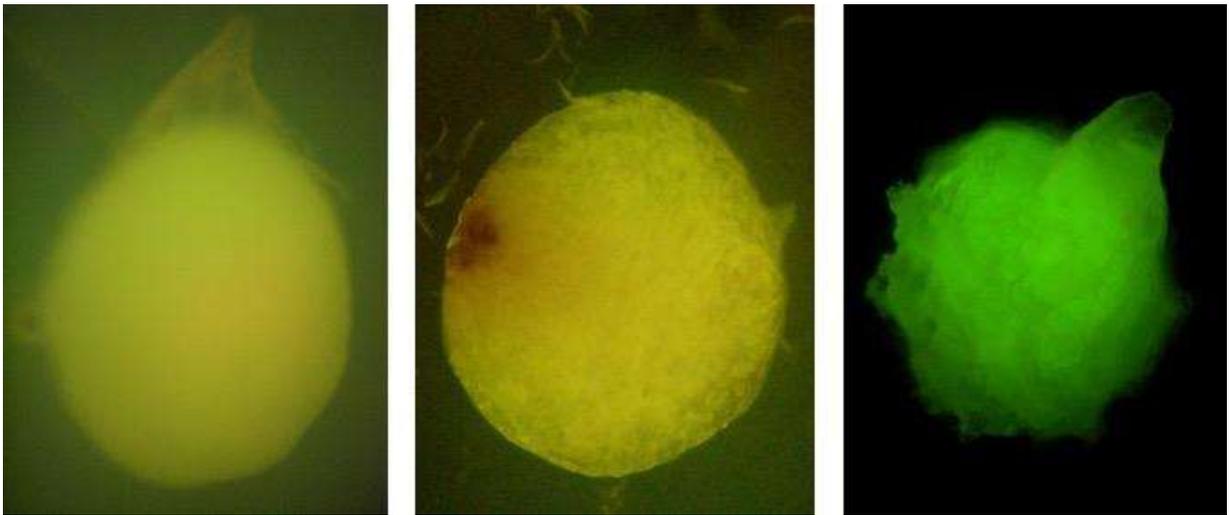


Figura 15. Efecto de la reacción fluorométrica en protocormos de *L. autumnalis* 30 días después de la inmersión en nitrógeno líquido.

Los tejidos mantuvieron una coloración verde por dos semanas, tiempo después esta característica se perdió, hasta quedar en un tono de color ocre. Por lo que se puede decir que, en nuestro estudio, todos los protocormos sobrevivieron después de los tratamientos de crioconservación, sin oscurecimiento observable. Esto se comprobó con el test de fluoresceína para determinar la viabilidad, sin embargo, debe interpretarse con precaución, ya que, se sugiere que había células viables presentes en los protocormos, lo que refleja la supervivencia *in vitro* de los protocormos crioconservados, así como, la posible recuperación de los explantes.



Figura 16. Plántulas de *L. autumnalis* regeneradas a partir de protocormos crioconservados con la técnica de V crío-lámina.

CONCLUSIONES

Para la técnica de E-D los protocormos deben ser precultivados en sacarosa 0.2 M durante 48 h y deshidratados durante 4.5 h en gel de sílice. La E-V se deben precultivar los protocormos en sacarosa 0.2 M durante 48 h + solución de carga durante 15 min. La solución PVS2 30 min y PVS 60 min; en V C-L PVS2 40 min y PVS3 60 min. Dichas condiciones podrían mejorar la tolerancia al estrés de los protocormos por la deshidratación, enfriamiento y recalentamiento en la crioconservación.

LITERATURA CITADA

- Antony J. J. J., R. A. Shamshir, R. Poobathy, B. L. Chew and S. Subramaniam. 2015. **Somaclonal variations were not induced by the cryopreservation: levels of somaclonal variations of *in vitro* and thawed protocorms of *Dendrobium Bobby Messina* analysed by SCoT and TRAP DNA markers.** *South Agrican Journal of Botany* 100: 148-157.
- Barnoy E. A., R. Popovtzer and D. Fixler. 2018. **Development of a molecular bioswitch using fluorescence lifetime imaging: Incremental activation of fluorescein diacetate.** *Journal of biophotonics* 11(2).
- Barraco G., I. Sylvestre, M. Collin, J. Escoute, M. Lartaud, J. L. Vedeil and F. Engelmann. 2014. **Histocytological analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation-dehydration.** *Protoplasma* 251(1): 177-189.
- Benson E. E. 2008. **Cryopreservation theory.** In Reed M. B. (ed.) *Plant cryopreservation: a practical guide.* Springer, New York p.p. 15-32.
- Benson E. E. and D. Bremner. 2004. **Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view.** In *Life in the frozen stae* p 231-268.
- Bertolini V., A. Damon, F. R. L. Tavera y A. N. R. Velázquez. 2012. **Las orquídeas del valle del Mezquital, Hidalgo (México), resultados preliminares.** *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 11(2): 85-94.
- Castillo-Pérez L. J., D. Martínez-Soto, J. J. Maldonado-Miranda, A. J. Alonso-Castro and C. Carranza-Álvarez. 2019. **The endemic orchids of Mexico: a review.** *Biologia* 74(1): 1-13.
- Cordova I. I. L. B. and K. Thammasiri. 2016. **Cryopreservation on a cryo-plate of *Arundina graminifolia* protocorms, dehydrated with silica gel and drying beads.** *CryoLetters* 37(2): 68-76.
- Crowe J. H., L. M. Crowe, J. F. Carpenter and C. A. Wistrom. 1987. **Review article: Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars.** *Biochemical Journal* 242(1): 1-10.
- Dhungana S. A., H. Kunitake, T. Niino, S. Yamamoto, K. Fukui, D. Tanaka, S. Maki and T. Matsumoto. 2017. **Cryopreservation of blueberry shoot tips derived from *in vitro* and current shoots using D cryo-plate technique.** *Plant Biotechnology* 34(1): 1-5.
- Engelmann F. 1997. ***In vitro* conservation methods.** In: Callow J. A., B. V. Ford-Lloyd, H. J. Newbury (eds) *Biotechnology and Plant Genetic Resources*, CAB International, Oxford UK p. 119-161.
- Engelmann F. and H. Takagi. 2000. **Cryopreservation of tropical plant germplasm-current research progress and applications.** *Tsukuba: JIRCAS; Rome. IPGRI.*
- Fukai S. 2017. **Development of cryopreservation techniques in ornamental crops.** *I International Symposium on Tropical and Subtropical Ornamentals* 1167: 49-54.

- Gonzalez-Arno M. T. and F. Engelmann. 2006. **Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane.** *CryoLetters* 27(3): 155-168.
- González-Arno M. T. y F. Engelmann. 2013. **Consideraciones teóricas y prácticas para la crioconservación de germoplasma vegetal.** *In: Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe.* M. T. González-Arno y F. Engelmann (eds). *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José* pp37- 64.
- González-Benito M. E., I. Clavero-Ramírez and J. M. López-Aranda. 2004. **Review. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops.** *Spanish Journal of Agricultural Research* 2(3): 341-351.
- Jitsopakul N., K. Thammasiri, T. Yukawa and K. Ishikawa. 2012. **Effect of cryopreservation on seed germination and protocorm development of *Vanda tricolor*.** *ScienceAsia* 38: 244-249.
- Kaczmarczyk A., T. Rutten, M. Melzer and E. R. J. Keller. 2008. **Ultrastructural changes associated with cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips.** *CryoLetters* 29(2): 145-156.
- Khoddamzadeh A. A. U. R. Sinniah, P. Lynch, M. A. Kadir, S. B. Kadzimin and M. Mahmood. 2011. **Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) christenson by encapsulation-dehydration.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107(3): 471-481.
- Lazo-Javalera M. F., M. E. Tiznado-Hernández, I. Vargas-Arispuro, E. Valenzuela-Soto, M. del C. Rocha-Granados, M. E. Martínez-Montero and M. Rivera-Domínguez. 2015. **Data on antioxidant activity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) following cryopreservation by vitrification.** *Data in Brief* 5: 549-555.
- Lurswijidjarus W. and K. Thammasiri. 2004. **Cryopreservation of shoot tips of *Dendrobium Walter Oumae* by encapsulation/dehydration.** *Science Asia* 30: 293-299.
- Merritt D. J., F. R. Hay, N. D. Swarts, K. D. Sommerville and K. W. Dixon. 2014. **Ex situ conservation and cryopreservation of orchid germplasm.** *International Journal of Plant Sciences* 175(1): 46-58.
- Mohanty P., M. C. Das. S. Kumaria and P. Tandon. 2012. **High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl.** *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 109(2): 297-305.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. **A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures.** *Physiologi Plantarum* 15(3): 473-497.
- Nava J. J. F., A. R. Jiménez-Aparicio, A. De Jesús-Sánchez, M. L. Arenas-Ocampo, E. Ventura-Zapata y S. Evangelista-Lozano. 2011. **Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas in vitro.** *Polibotánica* 32: 107-117.
- Noor N. M., N. Sulong and B. M. Reed. 2019. **Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: advances and strategies.** *Cryobiology* 87:1-14.

- Panta A., B. Panis, C. Ynouye, R. Swennen and W. Roca. 2014. **Development of a PVS2 droplet vitrification method for potato cryopreservation.** *CryoLetters* 35(3): 255-266.
- Passarelli L. M. 1999. **Relación entre la germinación del polen "in vitro", reacción fluorocromática y tinción con azul de algodón en lactofenol, en dos especies de *Solanum* sec. *Cyphomandropsis*.** *Publicación Electrónica de la Asociación Paleontológica Argentina* 6(1).
- Pimda W. and S. Bunnag. 2010. **Cryopreservation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl. via encapsulation-dehydration method.** *Extreme Life Biospeology and Astrobiology* 2(1): 7-14.
- Ping K. S., R. Zakaria and S. Subramaniam. 2016. **Ascorbate peroxidase activity of *Aranda Broga Blue* Orchid protocorm-like bodies (PLBs) in response to PVS2 cryopreservation method.** *Tropical Life Sciences Research* 27(1): 139-143.
- Prada J. A., M. E. Aguilar, A. Abdelnour-Esquivel and Florent Engelmann. 2015. **Cryopreservation of seeds and embryos of *Jatropha curcas* L.** *American Journal of Plant Sciences* 6(1): 172-180.
- Rahmah S., S. A. Mubbarakh, K. S. Ping and S. Subramaniam. 2015. **Efects of droplet-vitrification cryopreservation base on physiological and antioxidant enzyme activities of *Brassidium Shooting Star* Orchid.** *The Scientific World Journal* 2015:1-10.
- Rejón J. D., C. G. Suárez, J. D. Alché, A. J. Castro and M. I. Rodríguez-García. 2010. **Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea Europaea* L.).** *Polen* 20: 60-72.
- Sakai A. and F. Engelmann. 2007. **Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review.** *CryoLetters* 28(3): 151-172.
- SAS Institute (2002). **SAS/STAT. User's Guide, version 9.0.** Statistical Analysis System Institute. Cary, N. C. USA p 4424.
- Sekizawa K., S. I. Yamamoto, T. Rafique, K. Fukui and T. Niino. 2011. **Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates.** *Plant Biotechnology* 28(4): 401-405.
- Teixeira da Silva J. 2013. **Orchids: advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology.** *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 7(1): 1-52.
- Teixeira da Silva J. A. 2013. **Cryopreservation of hybrid *Cymbidium* protocorm-like bodies by encapsulation-dehydration and vitrification.** *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 49: 690-698.
- Teixeira da Silva J. A., S. Zeng, R. F. Galdiano, J. Dobránszki, J. C. Cardoso and W. A. Vendrame. 2014. ***In vitro* conservation of *Dendrobium* germplasm.** *Plant cell reports* 33(9): 1413-1423.
- Thammasiri K. 2016. **Conservation of thai orchid species using cryobiotechnology.** БЮЛЛЕТЕНЬ ГНБС 120: 7-16.

- Volk G. M. and A. M. Caspersen. 2007. **Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha X piperita***. *Protoplasma* 231: 215-226.
- Wen B., C. Cai, R. Wang, S. Song and J. Song. 2012. **Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation**. *Protoplasma* 249(2): 323-335.
- Yammamoto S., T. Rafique, W. S. Priyantha, K. Fukui, T. Matsumoto and T. Niino. 2011. **Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates**. *Cryo Letters* 32 (3): 256-265.
- Yin M. and S. Hong. 2009. **Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification**. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 98(2): 179-185.

¡El arca moderna de Noé para conservar plantas!

***“Un método biotecnológico para la
conservación de las plantas”***

Ulices Ivén Santos-Pérez y Martha E. Pedraza-Santos

¿Por qué deberíamos preparar un arca moderna para conservar plantas? Porque en nuestro planeta, además de la fauna, un gran número de especies vegetales se encuentran en riesgo de extinción, ya que enfrentan un problema severo debido al cambio climático, la tala inmoderada de bosques y selvas, así como el cambio de uso de suelo, entre otras actividades humanas.

Los reportes que presentan las instituciones dedicadas a la conservación de las especies a nivel mundial, son alarmantes: por ejemplo, en el 2007 la Lista Roja de Especies Amenazadas de la **UICN** (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) reportó que, de las 12043 plantas clasificadas, 8447 fueron consideradas como especies amenazadas, y los organismos vegetales endémicos, aquellos que son únicos a cierta región del mundo, son los principales que están en riesgo. En el 2016 se realizó el primer censo mundial de plantas, el cual estuvo dirigido por el centro botánico

Kew Gardens de Londres, concluyó que el 21 % de las plantas a nivel mundial, están en peligro de extinción, de las casi 391,000 especies que han sido clasificadas.

En México, el Diario Oficial de la Federación publicó que en el 2010 existían 987 especies de plantas dentro de alguna de las categorías de riesgo [amenazadas (A), sujeta a protección especial (Pr), peligro de extinción (P) o extinta (E) del medio natural], debido a que la gran mayoría de las plantas en estado silvestre son extraídas de su hábitat natural y se comercializan de manera ilegal. El mayor número de especies más vulnerables a la desaparición son de los órdenes Caryophyllales (32 P, 87 A y 157 Pr), Asparagales (15 P, 73 A, 134 Pr y 1 E), Cycadales (38 P, 8 A y 4 Pr), Pinales (15 P, 2A y 13 Pr), Fabales (7 P, 8A y 2 Pr), Poales (7 P, 2 A 4 Pr) y Saxifragales (11 P, 2 A y 5 Pr). Entre éstas, tenemos especies de pinos, orquídeas, agaves, cactus y bromelias, entre otras.

Por tal motivo, la preocupación mundial se hizo evidente en el acuerdo celebrado entre 183 países para el catálogo de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), acordando que 60 especies de la flora silvestre no pueden comercializarse sin previa autorización.

¿Cómo se conserva la diversidad vegetal? Para contrarrestar estas pérdidas, durante la última década varias instituciones nacionales e internacionales están aplicando técnicas de conservación a corto, mediano y largo plazo, teniendo como principal objetivo el rescatar, salvaguardar y usar en un futuro esta gran diversidad. Principalmente tenemos la conservación *in situ* (dentro de su hábitat) como los parques nacionales y las áreas naturales protegidas. Además, se cuenta con técnicas de conservación *ex situ* (fuera de su sitio de origen), componentes fundamentales de un programa de conservación global que contempla esencialmente las operaciones de almacenamiento y propagación de germoplasma, ejemplo de estas técnicas son los jardines botánicos y los bancos de semillas o de germoplasma.



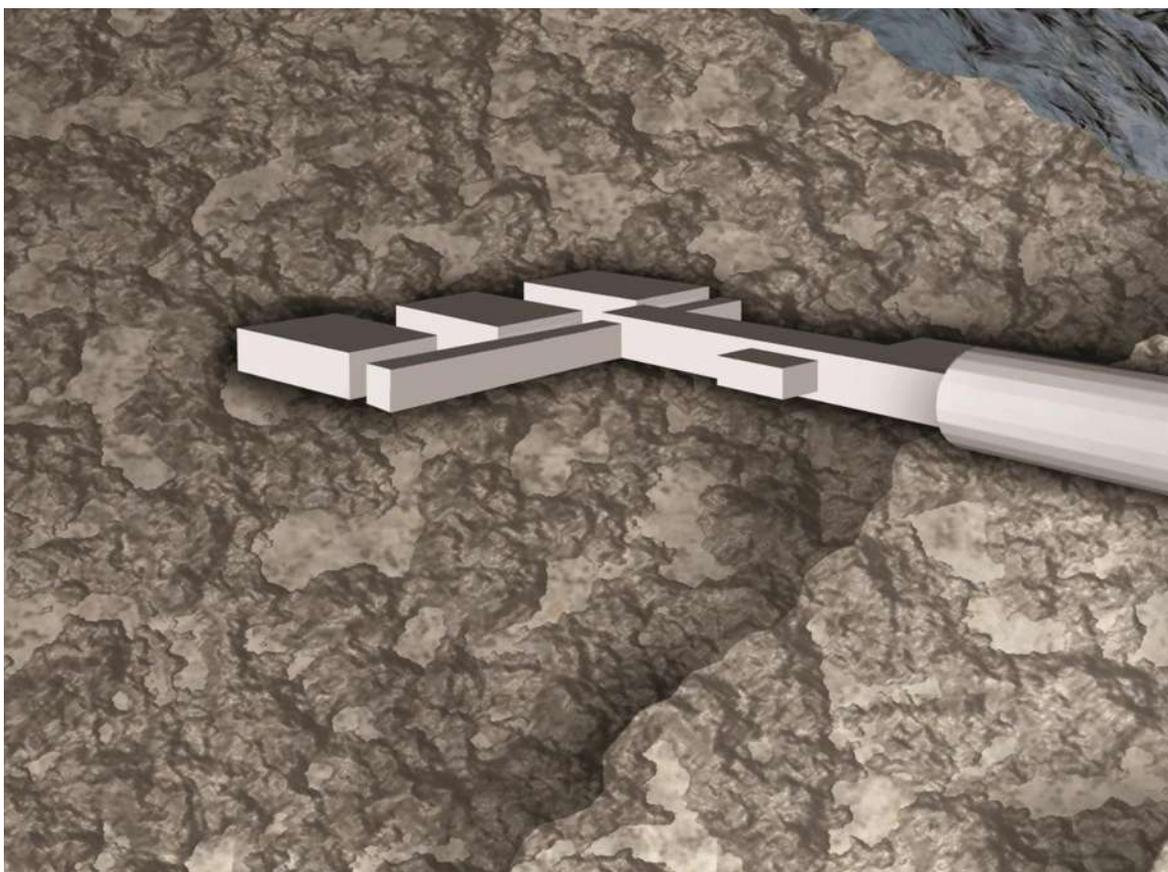
Parques y Áreas Naturales. Los parques y áreas naturales protegidas mantienen los ambientes originales o no han sido significativamente alterados por la actividad humana o que requieren ser preservados y restaurados. México actualmente administra 176 áreas naturales de carácter federal que representan más de 25,394,779 hectáreas. Cabe señalar que cuando las amenazas a las especies en su propio hábitat o al hábitat mismo, persistan a largo plazo, es importante evaluar la necesidad de iniciar un programa de conservación *ex situ*. Aunado a esta problemática, las plantas en sus áreas naturales enfrentan problemas por plagas, enfermedades, incendios e inundaciones.



Jardines Botánicos. En los jardines botánicos se mantienen bajo resguardo colecciones vivas para uso público, educativo, científico o como parques recreativos. Actualmente, estos rescatan y conservan material amenazado, con lo que se alberga mundialmente casi un tercio de las especies de plantas vasculares conocidas, unas 100,000 especies diferentes, representadas por unos 4,000,000 de accesiones. Existen 532 jardines botánicos en Europa, solamente 82 en África y 66 en Latinoamérica. En México se conservan aproximadamente 198 familias de plantas y 3275 especies, lo que representa más del 10 % del total de especies registradas, aunque no todas las especies incluidas en estos jardines son nativas.

Bancos de semillas. Estos bancos de semillas o germoplasma, son uno de los principales métodos de conservación *ex situ*, ya que pueden almacenar un rango amplio de variabilidad genética, en extensivas plantaciones a cielo abierto para mantener la diversidad genética de una especie, principalmente para especies de importancia económica o ecológica. En México, la localización geográfica de sitios con experiencias en el manejo *ex situ* es heterogénea y las instituciones asociadas

son igualmente diversas. Varias de ellas están ligadas a herbarios, universidades, centros de investigación científica, asociaciones civiles, gobiernos federal y estatal.





Un ejemplo de un gran proyecto de conservación de germoplasma es el que se encuentra en el Ártico Norte, en el archipiélago noruego de Svalbard, lugar donde se encuentra ubicada la **Bóveda Global de semillas de Svalbard** desde el 26 de febrero de 2008. Está construida a 130 m de profundidad dentro de una montaña rodeada de hielo. Este modelo de conservación de plantas es una alusión de lo que fue *“el arca de Noé”*, para el resguardo de los animales. Ésta se ha diseñado para proteger la biodiversidad de las especies cultivadas que sirven como alimento, en donde se pueden almacenar en su interior hasta 2,000 millones de semillas.

Diversas especies no pueden ser conservadas de esa manera, debido a problemas asociados con la producción, manipulación y almacenamiento óptimo de las semillas.

Un papel importante y significativo en el establecimiento de métodos eficaces de propagación y conservación lo presenta la biotecnología, la cual ofrece herramientas para el cultivo *in vitro* no solo de semillas, sino también de células, tejidos y otros órganos (vegetativos), que representan una solución viable y segura para la conservación, a este procedimiento se le conoce como *“Conservación in vitro”*.

Conservación de plantas *in vitro*. Las técnicas de almacenamiento mediante la conservación *in vitro*, constituyen una alternativa válida a la conservación de especies raras o amenazadas, sobre todo de aquellas que no soportan la conservación con los métodos anteriormente descritos. Esta técnica se ha aplicado de forma extensiva en la conservación de recursos fitogenéticos de plantas cultivadas desde periodos cortos hasta un largo plazo y se basa en establecer y mantener cultivos de células, tejidos, órganos e incluso plántulas, en sistemas *in vitro* bajo condiciones controladas de cultivo (ver *Saber Más No. 10:21-24*).

Los métodos de conservación *in vitro* a corto y mediano plazo, consisten en mantener los diferentes tipos de cultivo por periodos de meses, pero raras veces por años, haciendo uso de los cuartos de cultivo o cámaras de crecimiento con condiciones controladas de temperatura (25 °C) y luz (intensidades y fotoperiodo). Para extender los períodos de conservación, los cultivos son sometidos a disminuir su crecimiento, reduciendo la disponibilidad de nutrientes (medios mínimos), la temperatura y/o iluminación e incorporando retardadores de crecimiento. Debido a que deben de realizarse recultivos continuos, hay riesgo de pérdida del material vegetal por deshidratación y por contaminación microbiana.

Por tal motivo, la conservación *in vitro* a largo plazo es una alternativa para reducir los recultivos, evitando dichos riesgos de pérdida de material. Un método relativamente moderno y eficiente para la conservación por períodos largos es la crioconservación.

La crioconservación: el futuro de la conservación de plantas. Al mantenimiento de células vivas, tejidos y órganos vegetales a temperaturas ultra bajas, desde los -80 °C hasta los -196 °C, la temperatura del nitrógeno líquido, se le conoce como crioconservación. A esta temperatura se detienen la mayoría de las actividades metabólicas, así como la división celular. Bajo estas condiciones se consigue la supervivencia extremadamente larga y solo se ve limitada por la acumulación de daños en el genoma, producto de la radiación de fondo.

Desde hace tiempo, se sabe que el almacén de semillas y tejidos vivos en condiciones a temperaturas muy bajas y con un contenido bajo de agua, permite su conservación por periodos largos y, de acuerdo con este modelo, deberían mantenerse viables durante siglos, quizás hasta milenios.

La crioconservación del material cultivado *in vitro* plantea dificultades mayores que la crioconservación de semillas, debido al contenido mayor de humedad presente en los tejidos. Por eso,

con la crioconservación se persiguen condiciones celulares de ausencia de agua en estado líquido, energía cinética molecular baja y una difusión extremadamente lenta, para así lograr que las reacciones químicas y biológicas se encuentren prácticamente detenidas. Sin embargo, en algunas especies de plantas crioconservadas, se han observado roturas de las semillas y agrietamiento de las cubiertas seminales, así como daños en las células vegetales, principalmente en la membrana celular. Estos daños se pueden evitar con el control de la velocidad de enfriamiento, el contenido de humedad y la velocidad de descongelación.

Pasos importantes para lograr la crioconservación de plantas. Para superar los problemas anteriormente mencionados, se realizan investigaciones que involucran el uso de sustancias crioprotectoras y se desarrollan protocolos específicos de congelación y descongelación. Las sustancias crioprotectoras que previenen la desnaturalización de los constituyentes de las células durante la fase de desecación y estabilizan el estado de vitrificación (no se forman cristales de hielo a pesar de contener agua congelable dentro de los tejidos), son el dimetil sulfóxido (5 – 15 %), glicerol (5 - 20 %) y etilenglicol (10 – 15 %). Para la deshidratación de los tejidos celulares se emplean cantidades altas de sacarosa (mayores a 0.2 M = 68.46 gL⁻¹) entre otros azúcares. La aplicación de éstas, dependerá del tipo de material y la especie que se desee crioconservar.

Otro paso crucial en la crioconservación es la descongelación del material vegetal, que aunque es un proceso sencillo, está considerado como el paso más crítico durante la crioconservación, ya que si ocurre una recrystalización se podrían formar grandes cristales de hielo que dañarían la integridad celular. Hay métodos que se basan en la descongelación paulatina para recuperar el material, cultivándolo en medios y condiciones de cultivo que permitan una correcta recuperación que lleve a la regeneración de las plantas. Con la modificación y adaptación de estos pasos se han logrado altos porcentajes de supervivencia.

Ventajas y avances de la crioconservación de plantas. Comparada con otras técnicas, la crioconservación presenta ventajas muy favorables en cuanto a la optimización de costos y procesos. Desde que el material se almacena en tanques, el espacio para mantener la colección resulta ser mucho menor, el costo para labores y mantenimiento es mínimo (solamente mantener el nivel de nitrógeno en el tanque) y, una vez almacenadas las muestras, éstas no se manipulan, lo que disminuye significativamente los costos de regeneración.

Más de 40 géneros y 60 especies de plantas leñosas tropicales han sido objeto de estudio para lograr protocolos viables de crioconservación. Así, la crioconservación se ha aplicado con éxito en semillas, ejes embrionarios, embriones somáticos, suspensiones celulares, callos, meristemos, brotes y polen.

Un estudio detallado realizado recientemente en el que se compararon los costos del establecimiento y mantenimiento de una de las colecciones de café más grandes del mundo en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en Costa Rica, como colección en el campo y por crioconservación, demostró claramente que la crioconservación cuesta menos (en perpetuidad por accesión) que la conservación en bancos de germoplasma de campo.

En los últimos 10 años, la actividad de investigación sobre la crioconservación se ha incrementado significativamente a nivel mundial. Es importante destacar que se ha brindado apoyo financiero cada vez más a proyectos nacionales, regionales e internacionales, con el fin de avanzar en la investigación básica y aplicada de la crioconservación de plantas y lograr una mejor coordinación con los investigadores y usuarios mediante la creación y el funcionamiento de redes científicas y técnicas. Sin embargo, podemos mencionar pocas instituciones que se dedican a la crioconservación de plantas, entre ellas están el Kew Garden en Londres (Royal Botanic Gardens Kew) y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Costa Rica.

México se ha sumado a esta gran labor a través del establecimiento del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), propuesto con el propósito de preservar de manera apropiada y sistemática, las colecciones de germoplasma (semillas, plántulas, tejidos, células somáticas, gametos, embriones, ácidos nucleicos, etc.), como reserva estratégica para la conservación que asegure la supervivencia de especies útiles y resguardar la riqueza genética de México.

Además, una de las grandes ventajas de este tipo de almacenamiento es que las células presentan un mínimo de riesgo de sufrir cambios genéticos, por lo que el material vegetal puede conservarse durante períodos prolongados de tiempo (más de 10,000 años), con la certeza de que el material crioconservado tendrá las mismas características con las que se almacenó.

Con esta ventaja, el material podría estar disponible para que las generaciones futuras puedan repoblar los sitios de origen, o bien, utilizar dichos materiales para el mejoramiento genético. Finalmente, la crioconservación ofrece el establecimiento de bancos de germoplasma ultra modernos,

que incluye a los bancos genómicos o de ADN, considerados como “*el arca moderna de Noé*” para la conservación de plantas.

LITERATURA CITADA

- González-Arno M.T. y Engelmann F. (eds.). 2013. **Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe**. <http://www.iica.int/sites/default/files/publications/files/2015/b3099e.pdf>
- Abdelnour A. 1999. **Crioconservación de plantas, estado actual de la investigación en Costa Rica**. *Agronomía Costarricense*, 23(2):205-204. [Crioconservacion_plantas_estado_actual_investigacion_costa_rica.pdf](#) (1.509Mb)
- Iriondo-Alegría J.M. 2001. **Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión)**. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*,16(1):5-24. http://www.inia.es/gcontrec/pub/germoplasma_1161158274546.pdf
- García-Águila L. *et al.* 2007. **Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal**. *Bioteconología Vegetal* 7(2): 67-79. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/359/727>
- Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENRG) . <http://www.inifap.gob.mx/SitePages/centros/cnrg.aspx>

VII. DISCUSIÓN GENERAL

Las orquídeas están amenazadas tanto por actividades humanas, calentamiento global y la imparable recolección de especies silvestres, lo que limita a las poblaciones en pequeños puntos geográficos (Schofiel, 2018). Es posible que algunas reservas naturales no puedan mantener especies ya establecidas y en peligro de extinción. Incluso dentro de las colecciones las plantas tienen una vida útil limitada y están sujetas a envejecimiento, plagas, enfermedades y muerte accidental (Seaton *et al.*, 2010). La diversidad genética de plantas silvestres ornamentales debe ser almacenada de manera *ex situ* debido a su creciente extinción (Rajasegar *et al.*, 2015).

El banco de semillas ha sido durante mucho tiempo la única opción para el almacenamiento de orquídeas. Sin embargo, para que la conservación en los bancos de germoplasma sea efectiva, es necesario determinar las condiciones de almacenamiento y tolerancia a la desecación. Algunas semillas de orquídeas presentan corta viabilidad comparadas con plantas superiores (Hay *et al.*, 2010). Con el fin de mejorar las estrategias de conservación en orquídeas, es necesario optimizar metodologías basadas en la crioconservación, la capacidad de superar el estrés por baja temperatura; la estimulación del crecimiento y desarrollo de los tejidos recuperados *in vitro* (Popova *et al.*, 2016).

Actualmente las técnicas de crioconservación han demostrado ser económicas, eficientes y necesarias para el almacenamiento a largo plazo de material vegetal (Córdova II y Thammasiri, 2016). Dentro de este método, las técnicas de vitrificación y encapsulación / deshidratación se usan comúnmente en todo el mundo (Matsumoto, 2017), para el almacenamiento a largo plazo se requiere un mínimo de espacio y mantenimiento (Sakai y Engelmann, 2015). Es la única opción a largo plazo segura, eficiente y rentable que puede conservar el potencial regenerativo de los tejidos (Reed, 2007).

Los tejidos sometidos a deshidratación, estrés osmótico y congelación durante la crioconservación, enfrentan condiciones fisiológicamente similares a la sequía, la salinidad y la escarcha en campo (Panta *et al.*, 2014). En las células a crioconservar el agua libre es factor crítico, por lo que es importante determinar su contenido antes y después de la inmersión en nitrógeno líquido (Santos y Stushndf, 2003). La crioconservación de tejidos puede ser útil solo si se evita la formación de cristales de hielo en el protoplasma que pueden causar daños irreversibles a las membranas celulares, destruyendo así su semipermeabilidad (Pimda y Bunnag, 2010).

Además, se sabe que la formación de cristales intracelulares durante el enfriamiento y/o descongelamiento influye en la estabilidad de almacenamiento y envejecimiento, ya que la viscosidad extrema de los cristales restringe la movilidad molecular (Walters *et al.*, 2010).

La conservación a largo plazo de las de las semillas en los bancos de germoplasma se basa principalmente en la reducción del contenido de humedad y la temperatura de almacenamiento (-20 °C). El primer paso en estos estudios es establecer la tolerancia a la desecación de las semillas, donde la determinación del contenido de humedad es crucial (Morandini *et al.*, 2013). Las semillas ortodoxas se almacenan con valores de contenido de humedad por debajo del 5 %, lo que permite regular algunos procesos biológicos y evitar el congelamiento celular (Pritchard, 2004).

Las semillas de orquídeas tienen un comportamiento ortodoxo, en general las semillas provenientes de cápsulas maduras recién cosechadas tienen la capacidad de germinar sin secarse y adquieren tolerancia a la desecación antes o alrededor del tiempo de maduración. Las semillas inmaduras muestran un comportamiento recalcitrante, ya que aun no son tolerantes a la desecación. Esto es de suma importancia para las semillas de vida corta como *Diuris magnifica* y *Diuris laxiflora*, que se colectan mientras son inmaduras (Merritt *et al.*, 2014).

Generalmente las semillas ortodoxas maduras no se benefician de las soluciones crioprotectoras debido a su tolerancia a la desecación que permite la eliminación del agua congelable de manera natural antes del almacenamiento a largo plazo, lo que brinda potencialmente mejor resistencia al enfriamiento rápido y posterior descongelación, asociado con la inmersión directa en nitrógeno líquido (Merritt *et al.*, 2014). En semillas de *Laelia autumnalis* provenientes de cápsulas maduras se registró 100 % de germinación asimbiótica después de la inmersión directa sin adición de crioprotectores y desinfectadas después de la inmersión en nitrógeno líquido con hipoclorito de calcio.

El uso de protocormos de orquídeas para la crioconservación es preferible, porque se encuentran compuestos por células indiferenciadas compactadas densamente, también el tamaño reducido de la vacuola y la cantidad de agua relativamente pequeña. Además, cada protocormo puede desarrollar una planta completa (Córdova II y Thammasing, 2016). Por lo cual, es importante optimizar diferentes protocolos de crioconservación en las distintas especies (Niino y Arizaga, 2015).

La osmoprotección de los tejidos en cápsulas para la deshidratación es esencial porque evita lesiones criogénicas, desestabilización de la membrana plasmática, alteración de la estructura celular y

cambios en la actividad enzimática antioxidante junto con lesiones inducidas por especies reactivas de oxígeno (Wen, 2011).

Para evitarlo se activan los mecanismos de adaptación celular en el citosol se puede reducir el agua intracelular mediante el secado (aire), aplicación de sustancias penetrantes o no penetrantes como crioprotectores (Panis y Lambardi, 2005), o el metabolismo adaptativo que previenen la pérdida de agua en condiciones hiperosmóticas (osmoregulación), con el aumento de la concentración de sacarosa en los pretratamientos (Rajasegar *et al.*, 2015).

Sin embargo, la drástica eliminación de agua en la célula produce “efecto de soluto” lo que ocasiona cambios de pH, aumento de la concentración de electrolitos, desnaturalización de proteínas, transición de fase de membrana e interacciones macromoleculares y luego daño de la célula (Grospietsch *et al.*, 1999; Dumet y Benson, 2000).

En la técnica de encapsulación-deshidratación los valores bajos de agua en la célula pueden ocasionar deshidratación severa que ocurre por una distribución desigual de agua en el tejido (Lurswijidjarus y Thammasiri, 2004). Por lo que la deshidratación puede no ser beneficiosa en la crioconservación, si la distribución desigual del agua da como resultado diferentes respuestas de congelación entre las células del mismo tejido (Reinhoud *et al.*, 2000).

Las células con alto contenido de agua pueden estar predisuestas al peligro de formación de hielo intracelular y los cambios volumétricos diferenciales de las células conducirían a un estrés físico considerable dentro de los tejidos (Dumet y Benson, 2000).

En la encapsulación-vitrificación es esencial mejorar la tolerancia de los tejidos a la deshidratación por la solución de vitrificación. Por lo que antes de la deshidratación con soluciones vitrificantes es importante la osmoprotección (Rittirat *et al.*, 2019), ya que la exposición directa o sobreexposición de los tejidos a la solución de vitrificación es dañina debido al estrés osmótico o la toxicidad química, lo que es un obstáculo importante para la crioconservación por vitrificación (Matsumoto *et al.*, 1994).

La técnica de V crío-lámina permite la encapsulación de protocormos directamente en la misma lámina, esto puede aumentar la supervivencia y disminuir la destrucción celular debido a los procesos de osmodeshidratación (Córdova y Thammasiri, 2016).

Las membranas pueden dañarse durante los procesos de congelación y descongelación, o durante la desecación o deshidratación en las distintas fases de cada técnica de crioconservación. La ruptura de la membrana plasmática es uno de los indicadores de muerte celular más utilizado (Wolfe y Bryant, 1999).

Es importante investigar la estabilidad genética en plantas cultivadas de tejidos a largo plazo y plantas crioconservadas para la conservación exitosa del germoplasma de plantas. Sin embargo, las técnicas actuales de crioconservación han reportado diferencias nulas o pequeñas entre las muestras crioconservadas y no crioconservadas en condiciones óptimas (Matsumoto, 2017).

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

El tipo de desinfectante y método de secado afectan la viabilidad y germinación *in vitro* de semillas de *Laelia autumnalis*. Los resultados indican que las semillas deben desinfectarse con CaCl_2O_2 y secarse con aire de la campana de flujo laminar (120 s) después de la crioconservación por inmersión directa para evitar daños en los tejidos.

El protocolo de crioconservación mediante los métodos de encapsulación-deshidratación, encapsulación-vitrificación y V crío-lámina de *Laelia autumnalis*. Los protocormos en encapsulación-deshidratación precultivados en sacarosa 1 M durante 48 h seguido de una deshidratación en silica gel (400 g) durante 4.5 h. Para los protocormos en encapsulación-vitrificación y V crío-lámina deben ser precultivados en sacarosa 0.2 M durante 48 h + solución de carga durante 15 min. La solución PVS en E-V se recomienda PVS2 30 min y PVS 60 min; en V C-L PVS2 40 min y PVS3 60 min. Las condiciones para la crioconservación empleadas podrían mejorar la tolerancia al estrés de los protocormos a la deshidratación, enfriamiento y recalentamiento durante la crioconservación.

IX. LITERATURA CITADA COMPLEMENTARIA

- Cordova II L. B. And K. Thammasiri. 2016. **Cryopreservation on a cryo-plate of *Arundina graminifolia* protocorms, dehydrated with silica gel and drying beads.** *CryoLetters* 37(2): 68-76.
- Dumet D. and E. E. Benson. 2000. **The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduced cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm.** In: Engelmann F. and H. Takagi (eds). *Cryopreservation of tropical plant germplas.* Italy IPGRI.
- Galdiano R. F. Jr., de Macedo L. E. G., Vendrame W. A. 2013. **Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flewuosum* Sims.** *Plant Cell Tissue Organ Culture* 114: 139-148.
- González-Arno M. T. y F. Engelmann. 2013. **Consideraciones teóricas y prácticas para la crioconservación de germoplasma vegetal.** En: *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe.* M. T. González-Arno y F. Engelmann (ed.) pp. 3764.
- Grospietsch M., E. Stodulkova and J. Zamecnik. 1999. **Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips.** *CryoLetters* 20: 339-346.
- Hare P. D., Cress W. A., Staden J. van. 1998. **Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress.** *Plant Cell and Environment* 21: 535-553.
- Hay F. R., D. J. Merritt, J. A. Soanes, K. W. Dixon. 2010. **Coparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions.** *Botanical Journal of the Linnean Society* 164: 26-41.
- Hernández-Muñoz S., M. E. Pedraza-Santos, J. L. Morales-García, H. Guillén-Andrade, P. A. López and M. A. A. Téllez-Velasco. 2012. **Phenotypic characterization of Mexican orchid *Laelia autumnalis*.** *In International Conference on Germplasm of Ornamentals* 977: 245-252.
- Hu W. H., Yang Y. H., Liaw S. I., Chang C. 2013. **Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, *Bletilla forosana* (Hayata) Schltr. by vitrification.** *Botanical Studies* 54:33.
- Khoddamzadeh A. A., Sinniah U. R., Midhzar P. L., Kadir M. A., Kadzimin S. B., Mahmood M. 2011. **Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) christenson by encapsulation-dehydration.** *Plant Cell Tissue Organ Culture* 107: 471-481.
- Lurswijidjarus W. and K. Thammasiri. 2004. **Cryopreservation of shoot tips of *Dendrobium Walter Oumae* by encapsultadion/dehydration.** *Science Asia* 30: 293-299.
- Matsumoto T. A. and T. Niino. 2014. **The development of plant vitrification solution 2 and recent PVS2-based vitrification protocols.** In Reed B. M. (ed) *Proc. Second International Symposium on Plant Cryopreservation.* *Acta Horticulture* 1039: 21-28.

- Matsumoto T. A. Sakai and K. Yamada. 1994. **Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration.** *Plants Cells Reports* 13(8): 442-446.
- Merritt D. J., F. R. Hay, N. D. Swarts, K. D. Sommerville and K. W. Dixon. 2014. ***Ex situ* conservation and cryopreservation of orchid germplasm.** *International Journal of Plant Sciences* 175(1): 46-58.
- Mohanty P., Das M. C., Kumaria S., Tandon P. 2012. **High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl.** *Plant Cell Tissue Organ Culture* 109: 297-305.
- Mohanty P., Das M. C., Kumaria S., Tandon P. 2013. **Cryopreservation of pharmaceutically important orchid *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. using vitrification-based method.** *Acta Physiology Plant* 35: 1373-1379.
- Morandini M. N., E. M. Giamminola y M. L. de Viana. 2013. **Tolerancia a la desecación de semillas de *Psosopis ferox* y *Pterogyne nitens* (Fabaceae).** *Revista de Biología Tropical* 61(1): 335-342.
- Niino T. and M. V. Arizaga. 2015. **Cryopreservation for preservation of potato genetic resources.** *Breeding Science* 65: 41-52.
- Panis B. and M. Lambardi. 2005. **Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees).** *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources* FAO, Rome p. 61-78.
- Panta A., B. Panis, C. Ynouye, R. Swennen and W. Roca. 2014. **Development of a PVS2 droplet vitrification method for potato cryopreservation.** *CryoLetters* 35(3): 255-266.
- Pritchard H. 2004. **Classification of seed storage types for *ex situ* conservation in relation to temperature and moisture.** In E. O. Guerrant, K. Havens and M. Maunder (eds.). *Ex situ* plant conservation: supporting species survival in the wild. Island, Washington EE.UU. p 139-161.
- Rajasegar A., R. Poobathy, X. Rathinam, Y. Oyunbileg and S. Subramaniam. 2015. **Cryopreservation of PLBs of *Brassidium fly away* using encapsulation-dehydration technique.** *Mongolian Journal of Biological Sciences* 13(1-2): 19-23.
- Reed B. M. 2008. **Plant cryopreservation: a practical guide.** *Springer Science* pp. 513.
- Reinhoud P. J., F. V. Iren and J. W. Kijne. 2000. **Cryopreservation of undifferentiated plant cells.** In Engelmann F. and H. Takagi (eds). *Cryopreservation of tropical plant germplas.* Italy IPGRI.
- Rittirat S., S. Klaocheed, J. Suppapan, P. Chaithada, S. Kalawong and K. Thammasiri. 2019. **Cryopreservation of an endangered pharmaceutically important orchid, *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. using vitrification technique.** *Acta Horticulture* 1234: 125-132.
- Santos H. L., E. Aguirre, J. E. Campos, M. Martínez. 2006. **Conservación *in situ* de la flora mexicana: la orquídea, *Laelia albida* en una reserva de la biosfera.** *Ciencia y desarrollo CONACYT* 1-10.

- Seguel B. I. 2001. **Conservación de recursos fitogenéticos *ex situ* “Estrategias en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur”**. *Procisur* 2001.
- SEMARNAT. 2011. **Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio**. *In*: Lista de especies en riesgo. Instituto Nacional de Ecología. Disponible en: DIALOG. http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/normas/rec_nat/no_59.html Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Consultado el 25 de enero de 2017.
- Villalobos A. V. M. and F. Engelman. 1995. ***Ex situ* conservation of plant germoplasm using biotechnology**. *World Journal of Microbiology and Buitechnology* 11: 375 – 382. Traducción del inglés de Cruz C. J. G y P. J. R. Pérez. Centro Regional Universitario Oriente de la Universidad Autonoma Chapingo en Huatusco, Veracruz.
- Wen B. 2011. **Cytological and physiological changes related to cryotolerance in recalcitrant *Livistona chinensis* embryos during seed development**. *Protoplasma* 248: 483-491.
- Wolfe J. and G. Bryant. 1999. **Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems**. *Cryobiology* 39: 103-129.