



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**Departamento de Fitotecnia
Instituto de Horticultura**

Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CRIOCONSERVACIÓN DE SEMILLAS
DE *Chysis bractescens* Y *Rhyncholelia glauca***

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

MUNGUÍA MÉNDEZ ARACELI



**DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
CÓDIGO DE SERVICIOS ESCOLARES
CÓDIGO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

Bajo la supervisión de: Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

Chapingo, Estado de México, abril de 2018.



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CRIOCONSERVACIÓN DE
SEMILLAS DE *Chysis bractescens* Y *Rhyncholelia glauca*

Tesis realizada por la Ing. **Araceli Munguia Mendez** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Director: 

Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

Asesor: 

Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

Asesor: 

Dr. Juan Martínez Solís

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURA	vi
AGRADECIMIENTOS.....	viii
GENERAL ABSTRACT	x
MOLECULAR CHARACTERIZATION AND CRIOCONSERVATION OF SEEDS OF <i>Chysis bractescens</i> AND <i>Rhyncholaelia glauca</i>	xi
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Familia Orchidaceae	3
2.1.1 Taxonomía	3
2.1.2 Morfología.....	3
2.1.3 Reproducción	6
2.1.4 Importancia de la familia.....	6
2.1.5 <i>Chysis bractescens</i>	7
2.1.6 <i>Rhyncholaelia glauca</i>	10
2.2 Marcadores moleculares.....	12
2.2.1 Inter secuencias simples repetidas (ISSRs).....	13
2.3 Conservación de recursos fitogenéticos	15
2.3.1 Conservación <i>in situ</i>	15
2.3.2 Conservación <i>ex-situ</i>	16
2.3.3 Conservación a largo plazo.....	17
2.3.4 La crioconservación en orquídeas	18
2.4 Literatura citada	19
3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR POR MEDIO DE ISSR DE DOS ESPECIES DE ORQUÍDEAS MEXICANAS (<i>Chysis bractescens</i> y <i>Rhyncholaelia glauca</i>)	25
3.1 Resumen.....	25
3.2 Abstrac	26
3.3 INTRODUCCIÓN	27
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.4.1 Material vegetal	29
3.4.2 Extracción y cuantificación de ADN genómico.....	30

3.4.3	Obtención de patrones ISSR.....	31
3.4.4	Análisis estadístico	33
3.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
3.5.1	Análisis de agrupamiento.....	33
3.5.2	Análisis de varianza molecular (AMOVA).....	34
3.5.3	Descriptiva de marcadores.....	36
3.5.4	Índice de diversidad de Shannon-Weaver	38
3.6	CONCLUSIONES	39
3.7	AGRADECIMIENTOS.....	40
3.8	LITERATURA CITADA.....	40
4	CRIOCONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE DOS ORQUÍDEAS MEXICANAS (<i>Rhyncholelia glauca</i> y <i>Chysis bractescens</i>).....	43
4.1	RESUMEN	43
4.2	Abstrac	44
4.3	INTRODUCCIÓN	45
4.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
4.4.1	Material vegetal	47
4.4.2	Osmoprotección.....	47
4.4.3	Crioconservación en nitrógeno líquido	48
4.4.4	Método estadístico	49
4.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.6	CONCLUSIONES	53
4.7	AGRADECIMIENTOS.....	54
4.8	LITERATURA CITADA.....	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores ISSR usados para la obtención de las huellas genómicas de <i>Ch. bractescens</i> y <i>R. glauca</i>	31
Cuadro 2. Componentes de la mezcla de reacción en cadena de la Taq ADN polimerasa (PCR), para la obtención de patrones ISSR.	32
Cuadro 3. Condiciones de temperatura de los ciclos de amplificación de la PCR, para la obtención de patrones ISSR.....	32
Cuadro 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) en orquídeas de las especies <i>Rhyncholaelia glauca</i> y <i>Chysis bractescens</i>	35
Cuadro 5. Análisis descriptivo de 15 iniciadores ISSR utilizados para obtener perfiles moleculares de <i>R. glauca</i> y <i>Ch. bractescens</i>	37
Cuadro 6. Índice de diversidad de Shannon-Weaver en <i>R. glauca</i> y <i>Ch. bractescens</i>	39
Cuadro 7. Tratamientos usados para el estudio de crioconservación de semillas de <i>Chysis bractescens</i> y <i>Rhyncholaelia glauca</i>	48
Cuadro 8. Número de semillas viables por la prueba de cloruro de tetrazolio antes y después de ser sometidas a crioconservación.	50

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Flores (derecha) y raíces (izquierda) de <i>Chysis bractescens</i>	8
Figura 2. Distribución mundial de <i>Chysis bractescens</i>	9
Figura 3. <i>Rhyncholaelia glauca</i> (Lindl.) Schlechter 1918	11
Figura 4. Distribución de <i>Rhyncholaelia glauca</i>	12
Figura 5. Árbol flogenético de la familia de las orquídeas que muestra las relaciones entre las distintas subfamilias (basado en Chase <i>et al.</i> , 2003. Citado por Téllez, 2011).....	27
Figura 6. Resumen de clasificación para, tribus y subtribus de la subfamilia <i>Epidendroideae</i>	28
Figura 7. Dendrograma construido con el método de agrupamiento de varianza mínima de Ward y distancia de Jaccard ($\sqrt{1 - S}$) en orquídeas de las especies <i>Rhyncholaelia glauca</i> y <i>Chysis bractescens</i>	34
Figura 8. Huellas genómicas de las especies de orquídea a) <i>Rhyncholaelia glauca</i> y b) <i>Chysis bractescens</i> obtenidas mediante el uso del iniciador ISSR 8	38
Figura 9. Semillas de <i>Rhyncholaelia glauca</i> , a) Semilla viable, b) Semilla no viable y c) Semilla vana	51
Figura 10. Semillas de <i>Chysis bractescens</i> , a) Semilla viable, b) Semilla no viable y c) Semilla vana	51
Figura 11. Semillas viables de <i>Chysis bractescens</i> después de haber sido sometidas a crioconservación bajo diferentes tratamientos.	52
Figura 12. Semillas viables de <i>Rhyncholaelia glauca</i> después de haber sido sometidas a crioconservación bajo diferentes tratamientos.	53

A Ricardo Munguía, Margarita Méndez, Petra, Concepción,
Benigno, Lourdes, Marisol, Rosario y Angélica.

A Juan Flores Flores por coronar con su amor mi infancia

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** y a la **Universidad Autónoma Chapingo** por la confianza y apoyo a través de la beca que me otorgaron para realizar mis estudios de Maestría.

Al jurado revisor de tesis: **Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez, Dra. Margarita Gisela Peña Ortega** y **Dr. Juan Martínez Solís**, por su tiempo, y valiosa orientación, además de ser fuente de conocimiento en los rubros que se manejan en este trabajo.

A la **M. C. María Elisa Alvarado Cano** del Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido de la UACH por su asesoría y apoyo en Marcadores Moleculares.

A las **M. C. Violeta Alejandra Lázaro Flores** e **Imelda Romero Cervantes** por su comprensión en el momento preciso, al **Ing. Edgar Francisco Vidal Siles** por todo su apoyo en la elaboración del experimento de semillas y sobre todo por su cariño y confianza. Al Ing. **Ángel Sánchez** y al Lic. **Edgar Pérez** por su mano amiga en el momento requerido.

Al **Ing. Isaías Gil Vázquez** por otorgarme las semillas para la realización de esta investigación y sobre todo por su lucha incansable en el conocimiento y la conservación de orquídeas mexicanas.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Araceli Munguia Mendez
Fecha de nacimiento	17 de octubre de 1985
Lugar de nacimiento	Atlixco, Puebla
CURP	MUMA851017MPLNR08
Profesión	Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola
Cédula profesional	9713949

Desarrollo académico

Preparatoria: Escuela Preparatoria Regional Simón Bolívar, Atlixco, Puebla.

Período: 2000-2003

Licenciatura: Ciencias Políticas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Período: 2003-2008

Licenciatura: Ing. Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco de Mora, Edo. de México. Período: 2010-2014.

RESÚMEN GENERAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CRIOCONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE *Chysis bractescens* Y *Rhynchoaelia glauca*

En México, *Orchidaceae* ocupa el tercer lugar a nivel familia con alrededor de 1,260 especies y 170 géneros. Su importancia recae en su uso como plantas de ornato y en su papel en la dinámica y diversidad de los ecosistemas. Muchas de ellas se encuentran amenazadas, como *Chysis bractescens* Lindl. (1840) y otras tienen un alto potencial económico como *Rhynchoaelia glauca* (Lindl.) Schltr. (1918). Uno de los objetivos de este estudio fue el de obtener la huella genómica de ambas especies por medio de marcadores moleculares de tipo ISSR con fines de protección vegetal. A partir de hojas jóvenes se realizó la extracción de ADN con el método CTAB. La amplificación fue mediante el uso de 15 iniciadores tipo ISSR y para visualizarlas, se amplificaron en un gel de agarosa al 2 %. El polimorfismo general obtenido fue de 96.5 % y el análisis de agrupamiento permitió separar correctamente a las plantas muestreadas a nivel de especie. La mayor variabilidad genética (51.96 %) se presentó dentro de las especies y el índice de diversidad de Shannon-Weaver estimado fue de 5.11. El segundo objetivo consistió en la evaluación de la viabilidad de semillas después de ser crioconservadas en nitrógeno líquido durante 1 hora, previo mantenimiento de éstas en condiciones ambientales durante 6 meses. Las semillas fueron pretratadas con cuatro disoluciones crioprotectoras y una solución de carga. Fueron sumergidas en nitrógeno líquido y después se tiñeron con cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio (CTT) al 2 %. Los resultados indicaron que el tratamiento de semillas sin ninguna disolución, presentó un 82 % y 58.2 % para *Ch. bractescens* y *R. glauca* respectivamente. demostrándose que, los marcadores ISSRs resultan de utilidad para la obtención de sus huellas genómicas, y que las semillas pueden ser crioconservadas.

Palabras clave: *Chysis bractescens*, *Rhynchoaelia glauca*, *Orchidaceae*, huella genómica, conservación de semillas.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Araceli Mungia Méndez
Director de Tesis: Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

GENERAL ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND CRIOCONSERVATION OF SEEDS OF *Chysis bractescens* AND *Rhynchoaelia glauca*

In Mexico, Orchidaceae occupies the third site at the family level with around 1,260 species and 170 generes. Its importance reside in its use as ornamental plants and in its role in the dynamics and diversity of ecosystems. Many of them are threatened, such as *Chysis bractescens* Lindl. (1840) and others have a high economic potential as *Rhynchoaelia glauca* (Lindl.) Schltr. (1918). One of the objectives of this research was to obtain the genomic footprinting of both species through molecular markers of the ISSR type for plant protection purpose. DNA extraction was performed with the CTAB method from young leaves. The amplification was using 15 ISSR type primers and to visualize them, they were amplified in a 2 % agarose gel. The general polymorphism obtained was 96.5 % and the cluster analysis allowed to correctly separate the sampled plants at the species level. The highest genetic variability (51.96 %) occurred within the species and the estimated Shannon-Weaver diversity index was 5.11. The second objective consisted in the evaluation of the viability of seeds after being cryopreserved in liquid nitrogen for 1 hr., previous maintenance of these in environmental conditions for 6 months. The seeds were pretreated with four cryoprotective solutions and a loading solution. They were immersed in liquid nitrogen and then stained with 2 % 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (CTT). The results indicated that the treatment of seeds without any solution, presented 82 % and 58.2 % for *Ch. Bractescens* and *R. glauca* respectively, demonstrating that, the ISSRs markers are useful for obtaining their genomic footprinting, and that the seeds can be cryopreserved.

Key words: *Chysis bractescens*, *Rhynchoaelia glauca*, *Orchidaceae*, genomic footprinting, seed conservation.

Thesis of: Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Araceli Munguía Mendez
Advisor: Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia *Orchidaceae* constituye uno de los grupos de plantas más diversos a nivel mundial con alrededor de 25, 000 especies (Dressler, 2005). Éstas se distribuyen en todos los continentes (excepto la Antártida), y su mayor variación se concentra en las regiones tropicales. En México, estas plantas ocupan el tercer lugar a nivel familia con alrededor de 1,260 especies y 170 géneros, con un porcentaje de endemismo de 40 % a nivel de especies y 8 % de géneros (Hágsater *et al.*, 2005).

La mayoría de las especies de orquídeas que se comercializan en la actualidad son silvestres que el hombre utiliza pero no siembra ni cultiva, originando una erosión genética que no se produce al azar sino discriminadamente contra el material más valioso. En efecto, en las poblaciones naturales de estas especies el hombre selecciona y consume las plantas que poseen los caracteres más codiciados. En muchas ocasiones éste consumo lleva consigo la destrucción de las semillas o de las plantas antes de su reproducción, desencadenando una selección negativa (Esquinas, 1982).

Para las especies silvestres con un valor ornamental, el factor principal de su destrucción ha sido la colecta excesiva en sus hábitats naturales para abastecer el mercado de orquídeas principalmente en Estados Unidos, Europa y Japón (Flores-Palacios & Brewter, 2002), a esto se suman otras causas como la desaparición de árboles, insectos y cambio de uso de suelo. Actualmente en México se han incluido 196 especies de orquídeas en la norma oficial vigente NOM-ECOL-059-2011 en alguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2011), y se han extinguido al menos 22 (Cox, 2013).

La pérdida de los recursos fitogenéticos es una problemática no sólo nacional sino mundial, los bancos de germoplasma son una opción para el rescate y preservación de los recursos. Las orquídeas, sin embargo, son un grupo de especies difícil de conservar en un banco de germoplasma convencional debido a que sus semillas pierden viabilidad con mucha facilidad y rapidez. Si se toma en cuenta que la semilla es el medio adecuado para conservar la riqueza genética de

nuestras plantas, es importante buscar la forma de mantenerlas vivas por el tiempo que sea necesario.

La crioconservación es un método de conservación de especies vegetales que se emplea como complemento a las colecciones y bancos de germoplasma clásicos. Este proceso consiste en la preparación, mantenimiento y preservación a largo plazo del material vegetal en condiciones de congelación a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ del nitrógeno líquido (Panis & Lombardi, 2005). Este método de preservación es rápido, sencillo y no altera la información genética del material a conservar.

Nuestros recursos fitogenéticos no sólo requieren ser conservados sino también ser protegidos de biopiratería (acceso, uso y apropiación directa o indirecta de materiales biológicos y sus derivados por parte de intereses científicos, comerciales e industriales), ya que en algunos casos el intercambio de material vegetal ya no significa una cooperación equitativa, sino más bien una forma de enriquecimiento desigual dónde se pierde el libre acceso a los materiales biológicos (Ruiz, 2013), aspecto que actualmente en México trata de regularse mediante la implementación del Protocolo de Nagoya (Protocolo de Nagoya, 2017).

Para conservar y proteger material vegetal es necesaria una descripción morfológica y genética, sin embargo, la morfología puede variar debido a los efectos del ambiente y son comunes los errores de apreciación en los descriptores, sobre todo con relación en los caracteres cualitativos (h^2). La caracterización molecular sirve de apoyo a la descripción morfológica ya que revela una identidad única a cada planta, lo que permite una protección contundente, evitando así la apropiación de este material por parte de la iniciativa privada, dejándolo libre para investigación, mejoramiento genético, cultivo y comercialización, es por eso que este trabajo parte de que, al menos uno de los marcadores usados presentará polimorfismo para la obtención de la huella genómica de *Chysis bractescens* y *Rhynchoaelia glauca*. Por otro lado, la importancia de conservar a dichas especies ha llevado a plantear la hipótesis de que sus semillas pueden ser conservadas por medio de crioconservación con e

incluso sin la ayuda de crioprotectores. Razón por la cual, los objetivos del presente estudio fueron, evaluar el efecto de cuatro disoluciones crioprotectoras en semillas, así como la factibilidad de obtener sus huellas genómicas por medio de marcadores ISSR.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Familia Orchidaceae

2.1.1 Taxonomía

Por mucho tiempo, la clasificación de las orquídeas se ha basado casi exclusivamente en características morfológicas de su flor y de su columna (Brown, 1810). Sin embargo, muchos estudios han mostrado que las orquídeas forman un grupo que incluye a todos los descendientes de un ancestro común (Cameron & Chase, 1999). El uso de las secuencias de ADN, ha permitido conocer mejor las relaciones filogenéticas y proponer sistemas de clasificación más naturales (Chase, Cameron, Barrett, & Freudenstein, 2003)

La clasificación taxonómica de las orquídeas es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Subfamilias: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Orchidoideae* y *Epidendroideae*, la última es la que contiene la mayor parte de los *taxa* en la familia (Chase *et al.*, 2003).

2.1.2 Morfología

Las orquídeas son un grupo de plantas monocotiledóneas que se distinguen por sus interacciones ecológicas con sus agentes polinizadores, por su relación con

hongos micorrícicos y sobre todo por la complejidad de sus flores. Son perennes, terrestres, litófitas o epífitas y ocasionalmente trepadoras (Lozano, Zulueta, Lara, & Trejo, 2008).

Su raíz es la estructura por medio de la cual la planta toma agua y otros minerales, está protegida por un tejido esponjoso de células muertas de color blanco o gris, llamado velamen, que actúa como esponja y facilita la absorción del agua y de los gases del aire. En las especies terrestres las raíces son iguales a la de cualquier otra planta: alargada y ramificada, cubierta con pelos absorbentes; sin embargo, en las epífitas en el extremo de la raíz existe una parte verde, que tiene la función de realizar la fotosíntesis (Téllez, 2011).

Estas raíces se encuentran asociadas con hongos, integrando una simbiosis micorrícica que es importante para el desarrollo y nutrición de los dos organismos.

El tallo es el órgano localizado entre la raíz, las hojas y retoños, sirve para conducir y almacenar agua, así como los minerales alimenticios que la planta utiliza en épocas de sequía y/o reposo y en el momento de su floración; también es un órgano útil para efectuar la fotosíntesis (Chase *et al.*, 2003).

Existe una gran variedad de tallos desarrollados como respuestas adaptativas a los diferentes medios donde habitan las orquídeas, el principal tipo de tallo es el pseudobulbo, característico de las orquídeas epífitas, que es engrosado, carnoso, de muy variadas formas dependiendo del género y la especie.

Las hojas presentan una gran variedad en formas, tamaños, grosores y texturas. El tipo de hoja es una característica que puede indicar el lugar o el ambiente de procedencia de las plantas. Si las condiciones climáticas son secas, las hojas son de consistencia carnosa o suculenta y actúan como estructura de reserva para sobrevivir los periodos largos de sequía (Romero-González, Fernández-Concha, Dressler, Magrath, & Argus, 2003).

Las flores pueden presentarse solitarias, aunque en la mayoría de las orquídeas, son inflorescencias. Son hermafroditas, pero pueden existir también, en menor cantidad, flores unisexuales, como en el caso de *Catasetum*, *Mormodes* y

Cycnoches (Suárez & Mora, 2007). La flor presenta una simetría. El tamaño de las flores varía, ya que pueden ser desde 3 mm hasta 25 cm de diámetro.

El pistilo y la antera están fusionados formando una estructura llamada columna, ubicada en el centro de la flor. En la parte superior de la columna se encuentra la antera, debajo de ésta se encuentra el estigma, separada de la parte masculina por un tejido llamado rostelo que es una forma de barrera, cuya función es evitar la autopolinización. Dentro de la flor, los granos de polen se aglutinan en pequeños paquetes llamados polinios cuyo número depende del género. En la base del polinio existe una estructura llamada viscidio, que es una base cubierta de mucílago (sustancia pegajosa) que sirve para adherirse a los agentes polinizadores (Iborra, 2007).

El ovario está ubicado abajo de los sépalos y pétalos. A menudo experimenta una torsión que orienta a la flor hacia arriba (resupinación). Colocando así al labelo arriba o abajo, funcionando como una plataforma o atracción para los polinizadores.

El fruto es una cápsula dehiscente. Su forma y tiempo de maduración dependen de la especie. Las orquídeas producen grandes cantidades de semillas, va de 1 000 a aproximadamente 4 000 000 (Arditti, 1992). En frutos pequeños como en *Malaxis* o *Lepanthes* puede haber menos de mil semillas. El tamaño de la semilla es de 0.25 a 1.2 mm de largo por 0.09 a 0.027mm de ancho, por lo que son las plantas que cuentan con las semillas más pequeñas del reino vegetal (Arditti, 1967). Las semillas son desnudas ya que la mayor parte es aire, razón por la que se pueden dispersar o mover fácilmente por el viento o el agua.

Para lograr la germinación debe existir un hongo, que generalmente se encuentra entre hojas secas o musgos, en las ramas de los árboles o en las raíces de las orquídeas que anteriormente se encontraban en el árbol, se ha observado que en plantas adultas continua la relación simbiótica (Téllez & Flores, 2008).

2.1.3 Reproducción

Las orquídeas poseen estrategias para propagarse y poder conservar su especie, se propagan de manera asexual por secciones de la planta, en este tipo de propagación no hay intercambio de gametos, las plantas nuevas generadas son genéticamente idénticas a la planta madre. Las nuevas plantas se generan a partir de la división por separación de pseudobulbos o rizomas, keikis, cortes de tallo y, actualmente también por cultivo de tejidos. Por otro lado, la propagación sexual implica un entrecruzamiento genético, las semillas de orquídeas son conocidas usualmente como semillas polvo debido a que son muy pequeñas y contienen pocas reservas nutritivas. Usualmente estas semillas germinan en el medio natural si son infectadas por un hongo en asociación o micorriza, en la cual el hongo abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que son lo suficientemente grandes y con capacidad fotosintética para fabricar su propio alimento. Cuando la semilla germina, produce una masa indiferenciada de células de forma esférica llamada protocormo. Manteniendo las condiciones normales, éste continuará su crecimiento por varias semanas, meses o incluso años, dependiendo de la especie, hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y las primeras hojas (Arditti, 1992).

Las orquídeas presentan un ciclo de vida en el cual la germinación y la sobrevivencia de las plántulas están sujetas a varios factores. Su largo y frágil período reproductivo, logra, en la naturaleza, que de un millón de semillas solamente germinen de 10 a 15 (de 0.0003 % a 1 %) y alcancen a ser adultas una o dos de ellas; todo este ciclo juvenil puede durar hasta dos o tres años, lo que nos indica que una población de orquídeas afectada dentro de un bosque puede tardar mucho tiempo en restablecerse.

2.1.4 Importancia de la familia

Las orquídeas han sido importantes en muchas comunidades, algunos de los géneros utilizados son *Laelia*, *Prosthechea* y *Bletia* para la obtención de mucílagos para el arte plumario y la elaboración de dulces (Hágsater *et al.* 2005), además algunas personas los consideran útiles como enraizadores. En algunas

comunidades de Yucatán se utilizan especies con fines medicinales, como por ejemplo, *Catasetum integerrimum* Hook es usada para la cura de tumores, en el tratamiento de forúnculos y heridas, *Cyrtopodium punctatum* como balsámico y la parte carnosa del tallo de *Myrmecophila christinae* y *Rhyncholaelia digbyana* para tratar heridas, *Arpophyllum spicatum*, *Epidendrum anisatum* y *Bletia campanulata* son empleadas para curar la disentería, y *Laelia autumnalis* es para curar la tos a partir de una infusión (Hágsater et al. 2005). Algunas tienen también un uso ceremonial como *Laelia*, *Barkeria*, *Oncidium*, *Prosthechea* y *Rhynchostele* para el arreglo de altares (Solano, Cruz, Martínez, & Rivera, 2010), constituyendo un elemento muy importante de uso ya que su floración anual coincide con fechas importantes en las comunidades.

Su conocimiento respecto a sus propiedades, usos y características ha sido un tema de escaso estudio, por lo que es necesario realizar trabajos que contribuyan al conocimiento de la diversidad biológica y cultural de las orquídeas.

2.1.5 *Chysis bractescens*

2.1.5.1 Información taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Orchidales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Bletiinae

Género: *Chysis*

Especie: *Chysis bractescens* LINDL. (1840)

2.1.5.2 Sinónimos:

Chysis thorvaldsenii Liebm., 1847,

Thorvaldsenia speciosa Liebm., 1844,

Chysis aurea bractescens (Lindl.) P.H.Allen, 1955 (Royal Botanic Gardens of Kew & Missouri Botanical Garden, 2013)

2.1.5.3 Descripción

Chysis Bractescens es una planta epífita que pierde sus hojas durante la primavera, es robusta, hasta de 80 cm de alto. Raíces gruesas y pubescentes, que pueden llegar a medir 4 mm de diámetro. Rizoma alargado, los pseudobulbos fusiformes, formados por 10-12 entrenudos, hasta de 30 cm de largo y 2.5-4 cm de grosor. Inflorescencia de 10-20 cm de largo, con 4-8 flores casi todas abiertas al mismo tiempo, de 6-7 cm de diámetro, fragantes, vistosas de color blanco marfil con los ápices y labelo teñidos de amarillo pálido. Polinario de aproximadamente 3 mm de largo, con 8 polinios desiguales, amarillos. Cápsula elipsoide, con 3 quillas de 3.2 a 6 cm de largo y 1.9 a 4 cm de grosor. Es la única especie del género con flores blancas (Figura 1) (Lindley, 1841).



Figura 1. Flores (derecha) y raíces (izquierda) de *Chysis bractescens*

Crece en climas cálido-húmedos con lluvias todo el año, abundantes en el verano, o con una disminución marcada en la precipitación durante el invierno. Estos climas son generalmente Af(m)(i')gw", Af(m)(e)w", Am(i')gw" o Am(i')g, en el sistema de Köppen modificado por García (CONABIO/Estadigrafía, 1997). La precipitación media anual va desde unos 1900 mm en el Valle del Usumacinta, hasta 4700 en la región de Los Tuxtlas, mientras que la temperatura media anual es de 23 a 26 °C (Soto & Solano, 2007). No obstante, esta especie se ha encontrado en otros climas.

Su estructura floral sugiere que son polinizadas por abejas grandes y no se descarta la posibilidad de que sean *Euglossine*, ya que las flores son muy fragantes y la eficiencia de polinización es alta (Soto, 2007).

2.1.5.4 Distribución

Chysis bractescens está presente en Guatemala, Belice, El Salvador, Honduras y Nicaragua (Kew World Checklist of Selected Plant Families), en México, se encuentra en los estados de Veracruz (Los Tuxtlas, aparentemente en el Cañón de Río Blanco), Chiapas (El Ocote, Montes Azules, Chan Kin, Bonampak) y en Oaxaca, específicamente en la Sierra Mixe (Fig.2), (CONABIO, 2008).

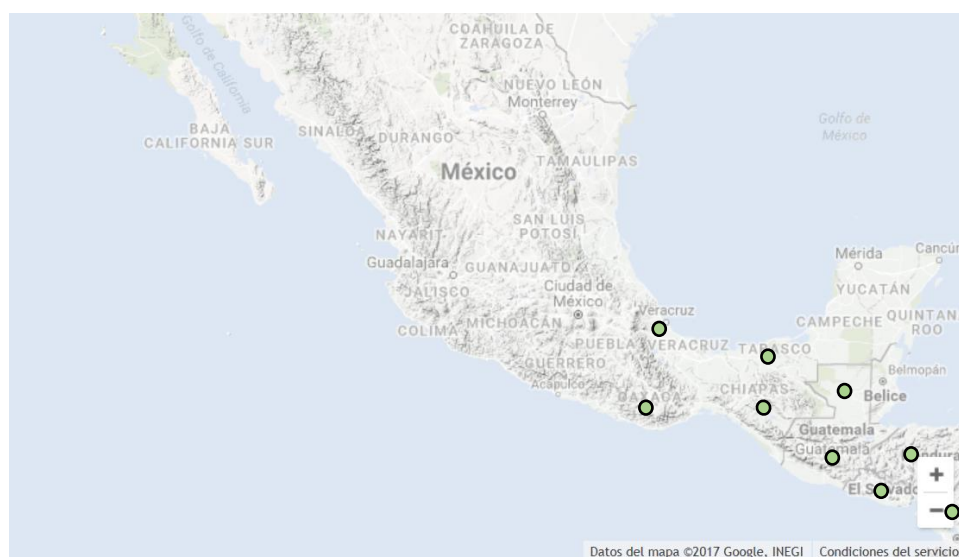


Figura 2. Distribución mundial de *Chysis bractescens*

2.1.6 *Rhyncholaelia glauca*

Información taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Laeliinae

Género: *Rhyncholaelia*

Nombre científico: *Rhyncholaelia glauca*

Sinónimos:

- *Bletia glauca* (Lindl.) Rchb.f. (1862)
- *Laelia glauca* (Lindl.) Benth. (1880)
- *Brassavola glauca* (Royal Botanic Gardens of Kew & Missouri Botanical Garden, 2013)

2.1.6.1 Descripción

Rhyncholaelia glauca es una planta epífita de crecimiento simpodial. Con pseudobulbos cortos, ligeramente achatados, cuenta con una sola hoja apical, erecta, oblonga, de color verde grisáceo, coriácea. La inflorescencia es apical, erecta, cubierta con una vaina tubular grande. Emite una sola flor que supera los 10 cm de tamaño, vistosa, perfumada, de buena textura y larga duración, de color

verde olivo a blanca, generalmente los pétalos son ligeramente más pálidos que los sépalos (Barbosa, 1881). El labelo es de color blanco o amarillento con una mancha rosa o varias rayas rojizas (Figura 3). Su floración es en primavera, en los meses de abril y mayo.

Polinario de 3 x 2 mm., con 12 polinios de color amarillo. Cápsula ovoide, conspicua con 6 quillas, el cuerpo de 4 a 5.4 cm de largo y de 18 a 26 mm de grosor, con un rostro (cunículo) apical de 50 a 70 mm de largo (Ames & Correl 1874).

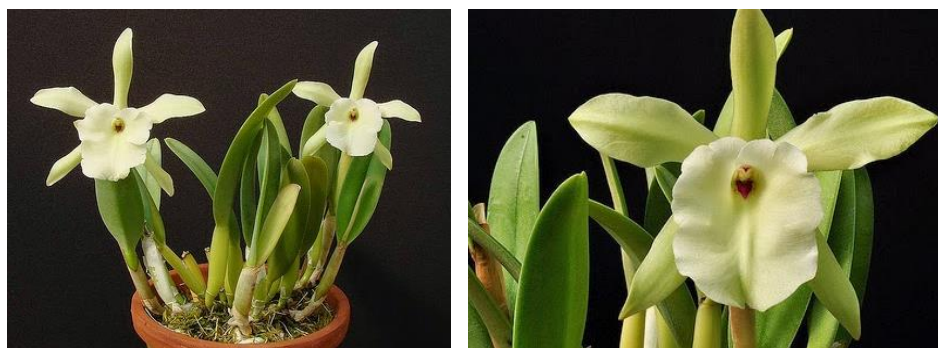


Figura 3. *Rhyncholaelia glauca* (Lindl.) Schlechter 1918

En cuanto a la temperatura de los ambientes donde crece, presentan para el verano temperaturas medias de 17 °C de mínima y máximas de 25 °C. Durante el invierno los promedios son de 20 °C y 13 °C. Por el rango de elevación del hábitat se induce que *R. glauca* debería adaptarse bien a condiciones más frías que lo indicado.

La humedad relativa en su hábitat es alta durante todo el año, alrededor del 80 %. Las precipitaciones son abundantes en la temporada de crecimiento de la planta, que van desde mediados de primavera hasta el inicio del otoño. Luego de esta temporada disminuyen, teniendo un invierno bastante escaso de lluvias, coincidente con la temporada de reposo de la planta, la humedad ambiente se mantiene elevada gracias a la bruma que se presenta en horas matinales (Jones, 1958).

2.1.6.2 Distribución

Esta especie habita desde México hacia el sur, se encuentra reportada para Guatemala, Belice y Honduras. Tiene presencia en una amplia zona, aunque no siempre está en forma abundante. Crece en bosques de montañas, a una elevación superior a los 1000 msnm. y hasta los 1500 msnm. Rara vez se le suele encontrar en elevaciones menores, aunque en ocasiones aparece habitando bosques tropicales con vegetación densa. En México, se encuentra en los estados de Chiapas, Veracruz y Oaxaca, crece en bosques tropicales deciduos, más bien fríos, entre 700 a 1600 m de altura. La CONABIO (2008) la reporta también para el Estado de Jalisco (Figura 4) probablemente como introducida.

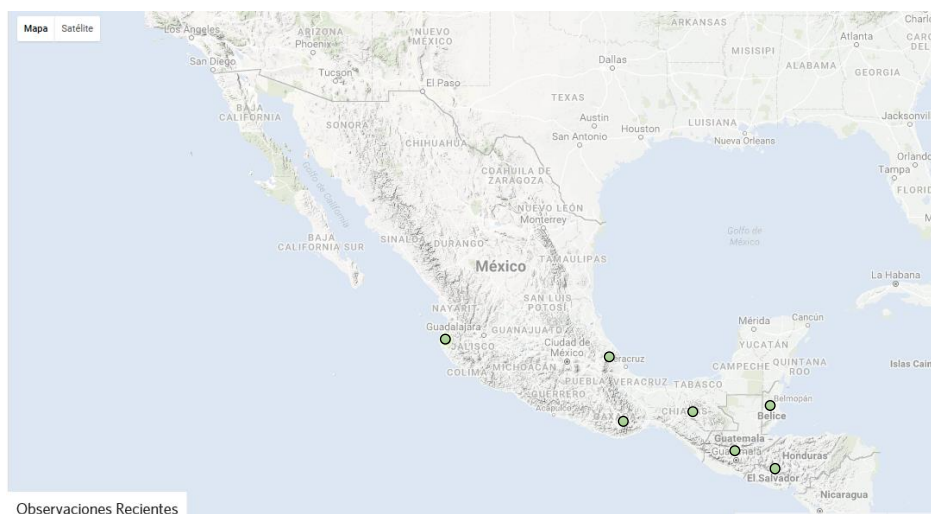


Figura 4. Distribución de *Rhyncholaelia glauca*

2.2 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia notípica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Los marcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que lógicamente no afecte al carácter en estudio (SIDTA 1999). Para Valadez y Kahl (2000) un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o

peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de estas, utilizando electroforesis o cromatografía, y un marcador genético como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente (por ejemplo, un gen que ocasiona resistencia para algún antibiótico). Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp & Edwards, 1998).

Algunos ejemplos de marcadores son: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR), Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO), Número variable de repeticiones en tándem (VNTR), Nucleótidos de caracteres cuantitativos (QTN), Polimorfismo en nucleótidos individuales (SNP), Sitios con marca de secuencia (STS) (Rallo, Belaj, De la Rosa, & Trujillo 2002).

2.2.1 Inter secuencias simples repetidas (ISSRs)

Es un marcador molecular conocido como inter secuencias simples repetidas (ISSRs por sus siglas en inglés) que nos permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Son marcadores semiarbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o primer complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y trinucleótidos. El iniciador es un di ó trinucleotido repetido (Culler & Wolfe, 2001). Los dos métodos que se utilizan en la electroforesis de ISSRs son: a) gel de agarosa visualizado con bromuro de etidio, y b) geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata. Las bandas que se obtienen

con este marcador van de 100 a 2000 pb. Las bandas de los ISSRs son consideradas marcadores dominantes. La presencia de la banda representa el genotipo dominante y consiste en la presencia o ausencia de los productos amplificados.

Los ISSRs han sido utilizado en especies cultivadas desde 1994, pero sólo recientemente se han utilizado en estudios de la variación poblacional en especies silvestres (Wolfe & Liston, 1998; Wolfe, Xiang, & Kephart, 1998). Es una técnica relativamente fácil de montar y altamente repetible.

Por otro lado, las limitaciones de los ISSRs son: que las bandas son leídas como marcadores dominantes, es decir, cuando tenemos la presencia de la banda no se sabe si el individuo es homocigoto o heterocigoto dominante, que la diversidad genética está basada considerando que cada banda representa un *locus* con dos alelos y que el alelo dominante está en equilibrio de Hardy-Weinberg con un alelo recesivo (Lynch & Milligan, 1994).

2.2.1.1 ISSR y orquídeas

Los marcadores ISSR se han usado ampliamente en estudios de diversidad y estructura genética de muchas especies, porque son más reproducibles, estables, simples y más fáciles de trabajar (George, Sharma, & Yadon, 2009; Fang, Guo, Shen, & Li, 2012). Algunos estudios que involucran a la familia *Orchidaceae* han evaluado la diversidad genética y la conservación de poblaciones nativas, el uso de marcadores ISSR en la investigación de la diversidad en aloenzimas de *Piperia yadonii* y *Goodyera rosulacea*, revelaron baja variación entre individuos y destacaron la necesidad inmediata para el desarrollo de estrategias de conservación (George *et al.*, 2009). Además, se usaron en estudios con *Cymbidium* sp (Sharma *et al.*, 2011), y se usaron marcadores de microsatélites para estudiar *Dendrobium loddigesii* (Cai, Feng, Hou, Xing & Ding, 2012).

Pinheiro *et al.* (2012) usaron este marcador para investigar la diversidad en poblaciones de *Cattleya labiata* del noreste de Brasil.

2.3 Conservación de recursos fitogenéticos

Los Recursos Fitogenéticos son la base para desarrollar nuevas variedades y tecnologías, se definen como el material genético de origen vegetal que tiene un valor real o potencial destinado a la alimentación y la agricultura, estos recursos han sido conservados y desarrollados por los agricultores de forma tradicional (SNICS, 2015), son parte de la diversidad biológica que el ser humano ha utilizado desde los comienzos de la civilización con el fin de satisfacer sus necesidades de alimentación, abrigo y salud. El valor de la diversidad biológica y de sus componentes, está definido por un valor ecológico, genético, social, económico, científico, cultural y recreativo (CONAMA, 2009).

Los objetivos ligados a la conservación de germoplasma están dirigidos a preservar el potencial de caracteres de importancia económica actual, la adaptabilidad y variabilidad genética (Seguel, 2001).

Estimar el valor de los recursos fitogenéticos es establecer las bases para una negociación justa y equitativa de los beneficios obtenidos a partir de su desarrollo comercial, éste es el objetivo que establece el Protocolo de Nagoya, teniendo en cuenta todos los derechos sobre dichos recursos y tecnologías y por medio de la financiación apropiada, contribuyendo por ende a la conservación de la diversidad biológica y la utilización sostenible de sus componentes. Su valor puede ser definido por su uso directo, indirecto y de existencia.

Existen dos principales formas de conservación, la conservación *in situ* y la *ex situ*

2.3.1 Conservación *in situ*

La conservación *in situ* de la diversidad biológica se realiza en las áreas en que ésta ocurre naturalmente, es decir, de poblaciones de plantas que crecen en sus hábitats originales, que constituyen sus reservas genéticas, procurando mantener la diversidad de los organismos vivos, sus hábitats y las interrelaciones entre los organismos y su ambiente (Rivas, 2001).

La conservación *in situ* de la biodiversidad y de los recursos fitogenéticos son parte fundamental de una estrategia destinada a mantener y mejorar la calidad de vida en el planeta.

2.3.2 Conservación *ex-situ*

Los sistemas de conservación *ex situ* surgen como una medida complementaria a los mecanismos de conservación *in situ*, orientados principalmente a resguardar el material genético de las especies de importancia para mejoramiento genético, la industria alimenticia, farmacéutica, entre otros, permitiendo la conservación de especies vulnerables a erosión genética. La conservación *ex situ* se refiere al mantenimiento de los organismos fuera de su hábitat natural (Seguel, 2001) en bancos de semillas, bancos genéticos *in vitro*, bancos de genes, colecciones de campo y jardines botánicos.

Existen varias estrategias de conservación de recursos fitogenéticos, las cuales dependerán del tipo de germoplasma y de sus objetivos. La conservación, no se limita a la consecución y posesión física de los materiales, sino que requiere asegurar la existencia de éstos en el tiempo en condiciones viables y con sus características genéticas originales (Jaramillo & Baena, 2000).

Una parte esencial en sistemas de conservación de germoplasma *ex situ*, como los bancos de semillas, es la ejecución de pruebas cuantitativas de germinación y crecimiento a partir de las cuales se establece la viabilidad y longevidad de una muestra de semillas, de este modo se obtiene el conocimiento con respecto a la capacidad de sobrevivencia de estas. Este tipo de conservación minimiza el envejecimiento, evita la destrucción del material, disminuye la pérdida de viabilidad y permite disponer de material para la reproducción de germoplasma silvestre (Santos, Aguirre, Campos, & Martínez, 2006).

Algunos opinan que la conservación *ex situ* ha sido la principal aproximación para preservar la diversidad genética asociada a los recursos fitogenéticos cultivados a nivel mundial. Esto se justifica porque un recurso genético conservado *ex situ* tiene más probabilidades de ser investigado, caracterizado y utilizado, que si está

en conservación *in situ* (Berreta, 2010). Esto se debe a que se encuentran más al alcance. No obstante, urge la conjugación de ambas formas de conservación.

2.3.3 Conservación a largo plazo

Las técnicas de refrigeración retardan el proceso de deterioro, ya que bajas temperaturas permiten el almacenamiento de organismos vivos en un estado de suspensión animada por periodos extensos. Este proceso de congelamiento a ultra bajas temperaturas ha probado ser un método eficiente para detener el reloj biológico de los organismos y se le llama crioconservación o sistema criogénico de almacenamiento (Pritchard, 1995). Este método consiste en llevar material biológico desde su temperatura normal, hasta ultra bajas temperaturas (generalmente en Nitrógeno líquido a -196°C). A esta temperatura la división celular y los procesos metabólicos cesan, por lo que el material puede estar almacenado por tiempo indefinido sin que sufra modificaciones o alteraciones. Sin embargo, el éxito del proceso dependerá del acondicionamiento que se le dé al material para que resista tanto el congelamiento como el descongelamiento. El acondicionamiento consiste en provocar una deshidratación protectora en las células y tejidos de manera que se evite o disminuya la formación de cristales de hielo que provoca grandes daños en las células (Villalobos & Engelman, 1995).

El almacenamiento en nitrógeno líquido es utilizado para conservar diferentes materiales, como protoplastos, callos, polen, embriones, ápices y en el caso de orquídeas semillas y protocormos (Takagi, 2000).

En general, las semillas, embriones y ejes embrionarios se crioconservan previa deshidratación por aire; los ápices y meristemos se someten a un proceso de vitrificación o encapsulación-deshidratación, y los callos y cultivos en suspensión se tratan con un proceso de vitrificación (Gartland, Mchugh, Fenning, & Gartland, 2000).

La crioconservación presenta ventajas comparado con otras técnicas de conservación 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 cuidar del llenado del tanque) y, una vez almacenadas las muestras, éstas no se manipulan, lo que disminuye significativamente los costos de regeneración (Villalobos & Engelman 1995). Sin embargo, es necesario tener en cuenta siempre, el suministro de nitrógeno líquido de manera oportuna.

2.3.4 La crioconservación en orquídeas

El desarrollo urbano, agrícola e industrial, ha producido alteraciones en el entorno, lo cual ha repercutido en la reducción de áreas de bosques en los últimos 40 años, por lo que es importante plantear nuevos paradigmas en educación, conservación, rescate, reproducción y uso sostenible de las orquídeas (Cantú, 2003).

La búsqueda de protocolos para una conservación de orquídeas ha arrojado como resultado una gran cantidad de investigaciones en la crioconservación de protocormos, semillas y polinios.

Hirano, Godo, Mii, e Ishikawa en 2004, trabajaron con semillas inmaduras de *Bletilla striata* con la técnica de vitrificación, al igual que Carvalho en 2006, quien además de trabajar con semillas, utilizó polen. Popov, Popova, Vladimirovna, y Kolomeytseva en 2004, crioconservaron en nitrógeno líquido semillas de *Bratonia*.

Thammasiri (2000), utilizó semillas de *Doritis pulcherrima* Lindl para crioconservarlas con la técnica de vitrificación y PVS2. El 62 % de semillas tratadas con la disolución desarrollaron plántulas normales, mientras que sin aquel tratamiento no hubo sobrevivencia.

Los estudios realizados hasta ahora indican que la crioconservación de orquídeas es relativamente nueva y un área de investigación importante.

Biopiratería

En los años 90 la Fundación Internacional de Desarrollo Rural (RAFI por sus siglas en inglés) definió a la biopiratería como el uso de leyes de propiedad intelectual (patentes y derechos de obtentor) para tener el control monopólico sobre recursos

genéticos que se basan en el conocimiento y la innovación de agricultores y pueblos indígenas.

La biopiratería es un gran negocio, según un valor aproximado, las ganancias que esta actividad ilícita genera, tomando en cuenta el valor de los diferentes productos provenientes de actividades derivadas de la biodiversidad, se estima que oscila entre los 500 y los 800 mil millones de dólares.

En México no se han registrado casos de biopiratería en orquídeas, sin embargo, eso no quiere decir que no existan, es arriesgado afirmarlo, pero al existir una gran venta ilegal de estas especies al extranjero es más osado negarlo.

2.4 Literatura citada

- Ames O., & Correl D. (1874). Orchids of Guatemala and Belize. (tomo 3) (p.412). Chicago: Natural History Museum.
- Arditti, J. (1967). Factores affecting the germination of orchid seed. *Botanical Review*, 33, 1-97
- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of Orchid Biology* (103-134). EUA; John Wiley y Sons.
- Arnold, C., Rosetto, M., Mc Nally, J., & Henry, R. (2002). The application of SSRs characterized for grape (*Vitis vinífera*) to conservation studies in *Vitaceae*. *Am. Bot.* 89, 22-28.
- Barbosa R. J. (1881). The Genera and Species of Orchidaceous Plants 2: 161.
- Berreta, A., Albín, A., Díaz, R. & Gómez, P. (2010). Recursos fitogenéticos: desafíos y oportunidades. In Berretta, A. y Rivas, M. (eds.). *Estrategia en los recursos fitogenéticos para los países del cono sur* (pp.7-19). Montevideo, Uruguay: PROCISUR, IICA.
- Brown, R. (1810). *Prodromus florae Novae Hollandiae* (p. 185) J. Johnson, London.
- Cai, X., Feng, Z., Hou, B., Xing, W. & Ding, X. (2012). Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Dendrobium loddigesii* Rolfe, an endangered orchid in China. *Biochemical Systematics and Ecology*, 43, 42-47.

- Cameron K. M., & Chase, M.W. (1999). Nuclear 18S rDNA sequences of Orchidaceae confirm the subfamilial status and circumscription of Vanilloideae. In Wilson K. L., & Morrison D. A. (eds.). *Monocots: Systematic and Evolution* (pp. 457-464). Melbourne, Australia: CSIRO Press.
- Cantú, C., Wright R. G., Scott J. M. & Strand. E. (2003). Conservation assessment of current and proposed nature reserves of Tamaulipas state, Mexico. *Natural Areas Journal*, 23, 220-228.
- Carvalho V. S. (2006). *Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas*. (Tese Doutorado Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,). Consultada en <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/1079>
- Chase M.W., Duval M. R., Hills H.G., Consan J. G., Cox A. V., Eguiarte L. E., Hortwall J. T., Fay M. F., Caddick R.L., Cameron K.M., & Hoot, S. (1995). Molecular phylogenetics of Lilianae. In: Rudall P. J., Cribb P.J., Cutler D. F., & Humphries C.J. (eds.). *Monocotyledons: Systematics and Evolution*. (pp. 109-137). Kew. England: Royal Botanic Gardens.
- Chase M.W., Cameron K.M., Barrett R.L., & Freudenstein J.V. (2003). DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification. In Dixo K.W., Kell S.P., Barrett R.L. & Cribb P.J. (eds.). *Orchid conservation* (pp. 69-89). Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo), Sabah.
- CONABIO (2008). Disponible en www.conabio.gob.mx/naturalista.mx/taxa
- CONAMA. (2008). Convenio sobre diversidad biológica, cuarto informe nacional de biodiversidad. Disponible en <https://www.cbd.int/doc/world/cl/cl-nr-04-es.pdf>
- Cox T. L. D. (2013). Orquídeas: Importancia y uso en México. *Bioagrociencias*, 6, 4-7.
- Culley M.T., & Wolfe A.D. (2001). Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (*Violaceae*), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, 86, 545-556.
- Dressler R. L. 2005. How many orchid species? *Selbyana*, 26, 155-158.
- Dressler R. L., & Chase M.W. (1995). Whence the orchids? In: Rudall P.J., Cribb P.J., Cutler D.F., & Humphries C.J. (eds.). *Monocotyledons: Systematics and Evolution* (pp.217-226). England: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Esquinas A. J. T., (1982). *Los recursos fitogenéticos una inversión segura para el futuro* (3ª ed.) (p. 18). Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.
- Fang, H., Guo, Q., Shen, H. & Li, Y. (2012). Genetic diversity evaluation of *Chrysanthemum indicum* L. by medicinal compounds and molecular biology tools. *Biochem. Syst. Ecol.* 41, 26-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2011.12.013>

- Flores-Palacios, A. & Brewster P. (2002). *Introducción al cultivo de orquídeas*. Instituto de Ecología A. C. y Asociación Mexicana de Orquideología, A.C. P. 240.
- Gartland J. S., Mchugh A. T., Fenning T. M., & Gartland K, M. A. (2000). Regeneration of phenotypically normal English elm (*Ulmus procera*) plantlets following transformation whit an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Tree Physiology*, 20, 901-907.
- George, S., Sharma, J. & Yadon V. L. (2009). Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *Am. J. Bot.*, 96, 2022-2030. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.0800368>
- Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar G. A., Jiménez, R., López M. A. & Dressler R. L. (2005). Las orquídeas de México. *Instituto Chinoín*, A.C. (p. 103). México, D.F.
- Hirano, T., Godo, T., Mii, M. & Ishikawa, K. (2004). Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports*, 23, 534- 539.
- IVORRA J. A. (2007). Orquídeas de Almería. Disponible en www.almerinatura.com/orquídeas/. Consultado el 22 de enero de 2018
- Jaramillo, S. & Baena, M. (2000). *Material de Apoyo a la Capacitación en Conservación Ex Situ de los Recursos Fitogenéticos* (p. 128). Cali, Colombia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos.
- Jones H. G. (1958). *Brassavola* or *Rhyncholaelia*? *The Orchid Review*, 66, 246 - 247.
- KARP, A. & Edwards, K. (1998). DNA markers: a global overview. In Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P. M. (eds.). *DNA markers: protocols, aplicaciones and overviews* (pp. 1-13). New York: Wiley-Liss, Inc.
- Kew World Checklist of Selected Plant Families. Disponible en http://wcsp.science.kew.org/synonymy.do?name_id=40375
- Lindley, J. (1841). *Edwar's Botanical Register* (p. 23). Universidad de Oxford.
- Lozano, M. A., Zulueta, R., Lara, L. & Trejo, D. (2008). ¿Por qué son tan fascinantes las orquídeas? *La ciencia y el hombre*, 21. Consultado en <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol21num2/articulos/orquideas/index.html>

- Lynch, M. & Milligan B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3, 91-99.
- Menchaca G., R. A. (1989). *Germinación in vitro de vainilla (Vanilla planifolia Andrews)* (p. 26). (Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana. México).
- Panis, B. & Lambardi, M. (2005). Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). En: Ruane, J. & A. Sonnino (Eds.), *The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forest, animal and fishery genetic resources in developing countries* (pp. 61-78) Turin: FAO.
- Pinheiro R. L., Rabbani C. A. R., da Silva C. A.V., Ledó da S. A., Pereira G. K.L. & Diniz C. L. E. (2012). Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. *Plant Syst Evol.*, 298, 1815–1825.
- Popov A. S., Popova, E., Vladimirovna N.T. & Kolomeytseva G. L. (2004). The development of juvenile plants of the hybrid orchid *Bratonia* after seed cryopreservation. *CryoLetters*, 25, 205-212.
- Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica. Convention on Biological Diversity. (2010). Disponible en <https://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-es.pdf>
- Pritchard H. W. (1995). Cryopreservation of Seeds. In Day, J.G. & McLellan, M. R. (eds.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 38 (pp. 133-144). Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Rallo, P., Belaj, A., De la Rosa, R. & Trujillo, I. (2002). Marcadores moleculares. Córdoba, España. Consultado en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo/junio_2000/almazara/almazara1.htm
- Rivas, M. (2001). Conservación in situ de los recursos fitogenéticos. In Berreta, A. & Rivas, M. (Coords.), *Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur* (pp. 63-76). Montevideo, Uruguay: PROCISUR.
- Romero-González, G. A., Fernández-Concha, G. C., Dressler R. L., Magrath L. K. & Argus G. W., (2003). Orchidaceae Jussieu. *Flora of North America*, 26, 16-27. Consultada en http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=10638
- Royal Botanic Gardens of Kew and Missouri Botanical Garden. The Plant List website. (2013). Disponible en <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-40375>

- Ruiz M. M. (2013). *¿Cómo prevenir y enfrentar la biopiratería?* (p. 2). Perú: UICN, PNUMA, FMAM.
- Santos, H. L., Aguirre L. E., Campos C. J. E. & Martínez G. M. (2006). Conservación in situ de la flora mexicana: la orquídea *Laelia albida*, en una reserva de la biosfera. *Ciencia y desarrollo en internet*. Consultado en <http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/Revista/ArticulosCompleto/pdf/Orquidea.pdf>
- Seguel B. I. (2008). Bancos de germoplasma nativo. In CONAMA (eds.). Biodiversidad de Chile, Patrimonio y desafíos (pp. 572-579). Santiago de Chile: ocho Libros
- SEMARNAT. 2011. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001. Protección ambiental Especies nativas de México de flora y fauna silvestres -Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 582(4):1-80 (2ª. sección, 6 marzo). Disponible en http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_orquideas.html
- Sequeira, R. (1980). Algunos datos históricos sobre las orquídeas. In Asociación Peruana de Orquideología (Ed.), *Orquídeas: su cultivo* (pp. 3-7). Perú: Delta, S.A.
- Sharma S. K., Kumaria, S., Tandon, P. & Rao S. R. (2011). Single primer amplification reaction (SPAR) reveals inter- and intra-specific natural genetic variation in five species of Cymbidium (Orchidaceae). *Gene*, 483, 54-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2011.05.013>
- SIDTA. (1999). Los marcadores moleculares en ingeniería genética y en mejora vegetal. España. Disponible en: <http://www.jcyl.es/jcyl/cag/dgiadr/svidta/boletin/dic99/bold.html#los%20marcadores%20moleculares%20en%20ingenieria%20genetica>
- SNICS. (2015). Consultado en: <http://snics.sagarpa.gob.mx/rfaa/Paginas/recursos-fitogeneticos.aspx>.
- Solano A. R., Cruz, G., Martínez, A. & Rivera L. L. (2010). Plantas utilizadas en la celebración de la semana santa en Zaachila, Oaxaca, México. *Polibotánica*, 29, 263-279.
- Soto-Arenas, M. A., Hágsater, E., Jiménez, R., Salazar, G. A., Solano, R., Flores, R. & Contreras E. I. (2007). Las orquídeas de México: catálogo digital (p. 128). Instituto *Chi- noin*, A.C., México, D.F.
- Soto-Arenas, M. A. y Solano-Gómez, A. R. (2007). Ficha técnica de *Chysis bractescens*. In: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada

sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F.

Suárez B.E. & Mora L. J. (2007). *Como cultivar orquídeas en su casa* (p. 225). San José Costa Rica: Mundo Grafico.

Takagi, H. (2000). Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. In Engelmann, F. & Takagi, H. (eds). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm* (pp.178-193). Rome: Japan International Research Center for Agricultural Sciences/ International Plant Genetic Resources Institute.

Thammasiri, K. (2000). Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification. *CryoLetters*, 21, 237-244.

Téllez V., M. A. A., Flores V. L. & Esparza, E. (2008). *Orquídeas Terrestres del Pedregal* (p. 14). México, D.F: UNAM.

Téllez V., M. A. A. (2011). *Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México* (pp. 28-32). México: UACH.

Valadez M. E. & Kahl, G. (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas* (p. 147). México. Mundiprensa.

Villalobos V. M. & Engelmann, F. (1995). Ex situ conservation of plant germoplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 375-380.

Wolfe, A.D., Xiang, Q.Y. & Kephart, S.R. (1998). Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) Using Hypervariable Intersimple Sequence Repeat (ISSR) Bands. *Molecular Ecology*, 7, 1107-1125.

Wolfe A.D. & Liston, A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In Soltis P. S. & Doyle J. J. (eds.), *Plant Molecular Systematics* (Vol. 2) (pp. 43-86). New York: Chapman Hall.

3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR POR MEDIO DE ISSR DE DOS ESPECIES DE ORQUÍDEAS MEXICANAS (*Chysis bractescens* y

Rhyncholaelia glauca)

MOLECULAR CHARACTERIZATION THROUGH ISSR OF TWO MEXICAN ORCHIDS SPECIES (*Chysis bractescens* and *Rhyncholaelia glauca*)

3.1 RESUMEN

La importancia de la familia *Orchidaceae* reside en su uso como plantas de ornato y en su papel en la dinámica y diversidad de los ecosistemas. *Chysis bractescens* Lindl. (1840) pertenece a la categoría de especies amenazadas (NOM-059-SEMARNAT-2011) y *Rhynchoaelia glauca* (Lindl.) Schltr. (1918) tiene un gran potencial económico. El objetivo de este estudio fue el de obtener la huella genómica de ambas especies por medio de marcadores moleculares tipo ISSR con fines de protección vegetal. A partir de hojas jóvenes se realizó la extracción de ADN con el método CTAB. La amplificación se llevó a cabo mediante el uso de 15 iniciadores tipo ISSR. Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 2 %. El polimorfismo general obtenido fue de 96.5 % y el análisis de agrupamiento permitió separar a las plantas muestreadas correctamente a nivel de especie. En el AMOVA se encontró que la mayor variabilidad genética (51.96 %) se presentó dentro de las especies y el índice de diversidad de Shannon-Weaver estimado fue de 5.11, lo cual sugiere un valor alto de variabilidad genética presente en estas especies. Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que los marcadores ISSRs fueron capaces de diferenciar genéticamente entre estas dos especies de orquídeas, por lo que resultaron de utilidad para la obtención de sus huellas genómicas.

Palabras clave: Huella genómica, AMOVA, ISSR, índice de Shannon-Weaver.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Araceli Munguía Méndez
Director de Tesis: Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

MOLECULAR CHARACTERIZATION THROUGH ISSR OF TWO SPECIES OF MEXICAN ORCHIDS (*Chysis bractescens* and *Rhynchoaelia glauca*)

3.2 ABSTRAC

The importance of the *Orchidaceae* family resides in its use as ornamental plants and in its role in the dynamics and diversity of ecosystems. *Chysis bractescens* Lindl. (1840) belongs to the category of threatened species (NOM-059-SEMARNAT-2011) and *Rhynchoaelia glauca* (Lindl.) Schltr. (1918) has high economic potential. The objective of this research was to obtain the genomic footprinting of both species through molecular markers of the ISSR type for plant protection purposes. DNA extraction was performed with the CTAB method from young leaves. The amplification was carried out by the use of 15 ISSR type primers. To visualize them, the samples were amplified in a 2 % agarose gel. The general polymorphism obtained was of 96.5 % and the cluster analysis (to indicate which it was) allowed to separate to the sampled plants correctly at the species level. In the AMOVA it was found that the highest genetic variability (51.96 %) occurred within the species and the estimated Shannon-Weaver diversity index was 5.11, which suggests a high value of genetic variability present in these species. The results obtained in the present investigation showed that the ISSR markers were able to differentiate genetically between these two species of orchids, so it is useful for obtaining their genomic footprinting.

Key words: Genomic footprint, AMOVA, ISSR, Shannon-Weaver index.

Thesis of: Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Araceli Munguía Méndez
Advisor: Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

3.3 INTRODUCCIÓN

La familia de las orquídeas representa el 7 % de todas las especies del planeta (Rech, Rosa & Rosa-Junior, 2011) y es considerada por muchos botánicos como la más evolucionada dentro de la clase Liliopsida (*Monocotyledonae*) (Raven, Evert & Eichhor, 2007). Está formada de cinco subfamilias (Chase *et al.*, 2003) que, de acuerdo con su orden de aparición en el árbol evolutivo de la familia, son *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Orchidoideae* y *Epidendroideae* (Figura 5).

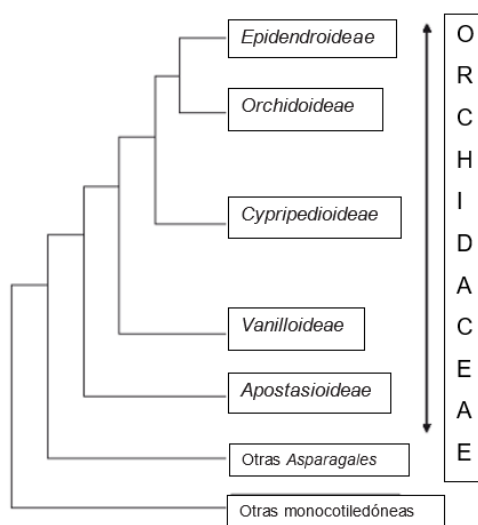


Figura 5. Árbol filogenético de la familia de las orquídeas que muestra las relaciones entre las distintas subfamilias (basado en Chase *et al.*, 2003. Citado por Téllez, 2011).

Ésta última es la que cuenta con mayor diversidad de especies, géneros y estrategias evolutivas. El 80 % de las orquídeas, es decir, más de 570 géneros y cerca de 19 800 especies pertenecen a esta subfamilia, entre los géneros representativos se incluyen *Bulbophyllum*, *Catasetum*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Encyclia*, *Maxillaria*, *Oncidium*, *Pleurothallis* y *Vanda*. La delimitación de los géneros en estos grupos es notoriamente problemática, con excepción de las orquídeas “zapatillas”. En México los grupos principales de orquídeas epidendroides son los Malaxidae, las Bletiinas, las Laeliinas, las Pleurothallidinas,

las Oncidiinas, las Maxillariinas y las Catasetinas, además de muchos otros más pequeños (Téllez, 2011). *Chysis bractescens* y *Rhyncholaelia glauca* son dos especies de orquídeas que pertenecen a la tribu *epidendreae* y a las subtribus *Bletiinae* y *Laeliinae*, respectivamente (figura 6) (Chase *et al.*, 2015).

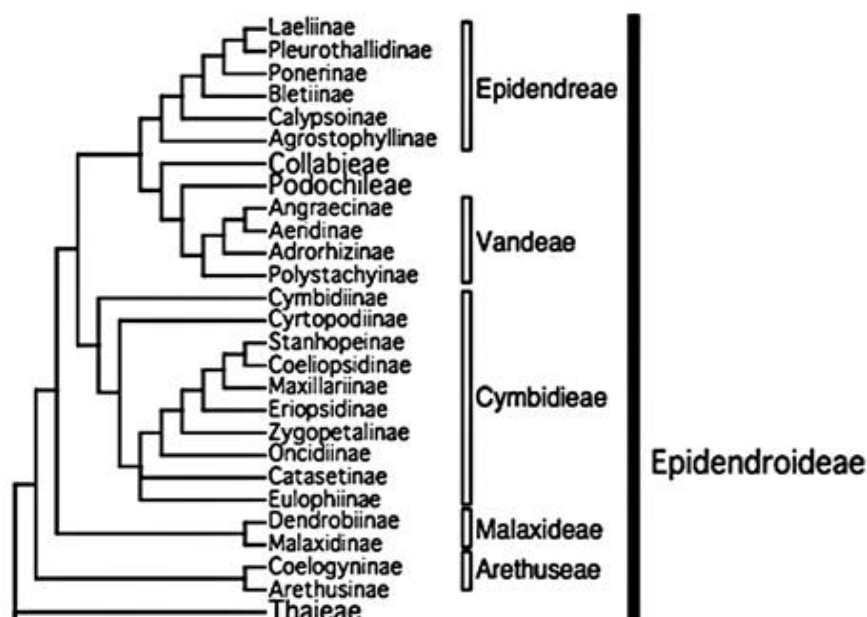


Figura 6. Resumen de clasificación para tribus y subtribus de la subfamilia *Epidendroideae*.

Orchidaceae constituye uno de los grupos de plantas más diversos a nivel mundial con alrededor de 25, 000 especies (Dressler, 2005) distribuidas principalmente en las regiones tropicales. En México se han registrado alrededor de 1,260 especies y 170 géneros (Hágsater *et al.*, 2005) y se estima que alrededor del 40 % son endémicas (Soto, 1996). El saqueo para su venta ilegal provoca que las poblaciones de orquídeas disminuyan y con ello su variabilidad genética, cuya pérdida puede reducir su capacidad para adaptarse a los cambios bióticos y abióticos, intensificando su proceso de extinción (George, Sharma & Yadon, 2009). La gran demanda de estas especies hace necesario tomar medidas para su protección con objeto de evitar la biopiratería; es decir, proteger este valioso recurso vegetal con la finalidad de que estas especies sean de uso común para la

investigación y que su explotación comercial se lleve a cabo de forma racional. Los marcadores moleculares de ADN han resultado útiles para la obtención de los perfiles moleculares de diversas especies vegetales. Dentro de ellos los marcadores tipo ISSR (Inter secuencias simples repetidas, Inter Simple Sequence Repeat por sus siglas en inglés), los cuales en comparación con otros marcadores son más reproducibles, más estables, más simples y más fáciles de trabajar (Fang, Guo, Shen & Li, 2012). Estos marcadores se han usado en otras ornamentales como *Nierembergia linariaefolia* (Escandón, Pérez de la Torre, Soto & Zelener, 2005) y en *Calibrachoa caesia* (Pérez, García, Heinz & Escandón, 2012). Dentro del grupo de las orquídeas los ISSR han sido útiles para estimar la diversidad genética en *Piperia yadonii* (Sheeja, Jyotsna & Verm, 2009) y distintas especies de *Epidendrum* y *Encyclia* Hook de la tribu Laeliinae (Arrigoni et al., 2015).

Por lo que el objetivo de este trabajo fue obtener las huellas genómicas de estas dos especies de orquídeas endémicas de México por medio de marcadores moleculares tipo ISSRs con fines de protección.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Material vegetal

El material vegetal de *Rhyncholaelia glauca* (10 colectas) que se utilizó para realizar este estudio fue obtenido en Chavarrillo (19.42° 52' 78" N, 96.79°13'89" O), localidad correspondiente al municipio de Emiliano Zapata ubicado en el estado de Veracruz, mientras que las diez plantas de *Chysis bractescens* evaluadas fueron colectadas en la sierra Mixe de Oaxaca (17°13'52.5" N, 95°21'40" O). Las plantas fueron colocadas en macetas y ubicadas en la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) "Chapingo" localizada en la Universidad Autónoma Chapingo para su conservación.

3.4.2 Extracción y cuantificación de ADN genómico

La extracción del ADN se llevó a cabo por el método CTAB (Doyle, 1991). Para ello primero se pesaron 0.3 g de hojas jóvenes que luego se cortaron en trozos pequeños (en el caso de *R. glauca* los trozos fueron mucho más pequeños debido a que posee hojas suculentas), éstos se lavaron con alcohol al 70 % y se pusieron a escurrir en toallas sanitas; una vez que estaban secos, se colocaron en un mortero, se les agregó nitrógeno líquido y con la ayuda del pistilo se pulverizaron. El polvo resultante se transfirió a microtubos de 1.5 mL que contenían 700 µL de amortiguador de extracción previamente precalentado a 65 °C, y se volvieron a colocar en el termoblock a 65 °C durante 20 minutos. Una vez que transcurrió este tiempo se dejó enfriar, se agregaron 200 µL de acetato de potasio y se dejaron en hielo durante 30 minutos, inmediatamente después se centrifugó a 21 000 xg durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a microtubos de 1.5 mL y se les agregó cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó durante 2 minutos. Posterior a esto se centrifugó a 12 000 xg durante 10 minutos, la fase acuosa que quedó en la parte superior se separó y se colocó en otro microtubo, se le agregó 500 µL de isopropanol frío, se agitó suavemente por inversión hasta obtener el precipitado que corresponde a los ácidos nucleicos. Éste se colocó a -20 °C durante 30 minutos, pasado este tiempo se centrifugó a 8 000 xg por cinco minutos, se decantó el sobrenadante cuidadosamente y se escurrió sobre una toalla sanita. Se adicionaron 700 µL de STE y se dejó reposar toda la noche a 4 °C para que los ácidos nucleicos se disolvieran. Pasado este tiempo se añadieron 4 µL de RNasa para eliminar el ARN, se mezcló suavemente y se colocó a 37 °C por una hora. Posteriormente se agregaron 70 µL de acetato de sodio 3 M y 700 µL de isopropanol frío, se agitó suavemente hasta obtener el precipitado de ADN, se colocó a -20 °C durante 30 minutos, posterior a esto se centrifugó a 8 000 xg durante 10 minutos, se decantó con cuidado y se agregaron 500 µL de etanol al 70 % (grado reactivo), se agitó para disolver las sales. Finalmente se centrifugó nuevamente a 8 000 xg por diez minutos, se decantó, escurrió y dejó secar sobre una toalla sanita para después disolver en 100 µL de TE.

La cantidad y pureza del ADN se determinaron por medio de un Nanodrop Thermo Scientific Modelo LITE y para comprobar su calidad se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % y se corrió por 1 hora a 180 voltios. Posteriormente fue teñido con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un fotodocumentador Digidoc-It® Imaging System.

3.4.3 Obtención de patrones ISSR

Para la obtención de patrones ISSR se realizaron las reacciones en cadena de la Taq ADN polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) con 40 iniciadores y se seleccionaron los 15 que produjeron bandas nítidas y bien definidas, los cuales se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Iniciadores ISSR usados para la obtención de las huellas genómicas de *Ch. bractescens* y *R. glauca*.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	Ta (°C)	Marca
ISSR 1	(CA) ₈ AAGG	60	Sigma
ISSR 2	(CA) ₈ AAGCT	60	Sigma
ISSR 3	(GA) ₈ CTC	58	Sigma
ISSR 4	(AG) ₈ CTC	58	Sigma
ISSR 5	(AC) ₈ CTA	60	Sigma
ISSR 6	(AC) ₈ CTG	58	Sigma
ISSR 7	(AG) ₈ CTG	60	Sigma
ISSR 8	(AC) ₈ CTT	56	Sigma
ISSR 10	(GA) ₈ T	50	Sigma
LOL 2	(CT) ₈ GC	56	Invitrogen
LOL 7	(GA) ₆ CC	48	Invitrogen
PHV 6	CCA(CT) ₈	60	Invitrogen
PHV 7	(GTG) ₂ (TG) ₆ T	60	Invitrogen
PI04	(CT) ₈ AGC	58	Invitrogen
M-1	(CA) ₆ GG	48	

Ta= temperatura de alineamiento

Para reducir errores de pipeteo se procedió a preparar una mezcla maestra de reacción con amortiguadores y los componentes que se detallan en el Cuadro 2, con excepción del ADN genómico. Posteriormente se colocaron 22.5 µL de la mezcla a microtubos para PCR y a cada uno de ellos se les adicionó 2.5 µL del

ADN homogeneizado a una concentración de 10 ng/μL, lo cual proporcionó un volumen total de 25 μL por microtubo.

Cuadro 2. Componentes de la mezcla de reacción en cadena de la Taq ADN

Componente	Concentración inicial	Concentración Final	1 reacción (1X, 25 μL)
H ₂ O grado molecular	-	-	5.2
DNTP's	500 μM c/u	200 μM	10
Amortiguador de PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	3.0 Mm	3
Iniciador	10 ng/μL	30 ng	1.5
Enzima	5 U-μL ⁻¹	1.5 U/reacción	0.3
ADN genómico	10 ng/μL	25 ng	2.5
Total			25

polimerasa (PCR) para la obtención de patrones ISSR.

Los tubos se agitaron levemente por inversión y se colocaron en un termociclador TECHNE TC412, para amplificar el ADN bajo el programa que se presenta en el Cuadro 3, usando la temperatura de alineación recomendada para cada iniciador.

Cuadro 3. Condiciones de temperatura de los ciclos de amplificación de la PCR para la obtención de patrones ISSR.

Fase	T °C	Tiempo	Ciclos
Predesnaturalización	93	1 min	1
Desnaturalización	93	20 seg	
Alineamiento	†	1 min	40
Extensión	72	20 seg	
Extensión final	72	6 min	1
Enfriamiento	10	∞	-

† Dependió de cada iniciador

Una vez que el programa concluyó se retiraron los tubos, se colocaron en una gradilla y se conservaron a 4 °C para posteriormente llevar a cabo la separación de productos amplificados. Ésta se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, los cuales se corrieron por 1 hora a 180 voltios y posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio y se fotodocumentaron tal como se señala en la sección de cuantificación y evaluación de la integridad del ADN.

3.4.4 Análisis estadístico

Los perfiles electroforéticos de los marcadores ISSR fueron transformados en una Matriz Básica de Datos (MBD) binaria. La presencia de un fragmento en un individuo en particular fue representada con 1, mientras que la ausencia del mismo fragmento se reportó como 0.

Con la MBD se procedió a calcular las distancias y similitudes entre pares de colectas y finalmente se seleccionó el índice de similitud de Jaccard transformado en distancia ($\sqrt{1 - S}$). Con las distancias genéticas obtenidas se realizó un análisis de agrupamiento mediante el método de varianza mínima de Ward. Con objeto de explorar la distribución de la variabilidad genética se calculó un análisis molecular de varianza (AMOVA). Adicionalmente se calculó el índice de Shannon-Weaver para evaluar la biodiversidad presente. Todos estos análisis fueron obtenidos mediante el uso del programa InfoGen® (Universidad de Córdoba, Argentina).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Análisis de agrupamiento

Aunque el objetivo principal de este trabajo fue la obtención de las huellas genómicas de las dos especies de orquídeas evaluadas con fines de protección vegetal, adicionalmente se calcularon las distancias genéticas de Jaccard ($\sqrt{1 - S}$) entre pares de accesiones y se realizó un análisis de agrupamiento utilizando el método de varianza mínima de Ward. En el dendograma que se obtuvo (Figura 5) se muestra que a una altura de corte de 1.8 se forman dos grupos bien

diferenciados. El primero de ellos estuvo conformado con todas las accesiones de RG (*Rhynchoaelia glauca*) mientras que el grupo II se integró con las de CB (*Chysis bractescens*). Estos resultados indican que los marcadores tipo ISSR fueron útiles para identificar variaciones genéticas a nivel intraespecífico en ambas especies de orquídeas a pesar de que ambas pertenecen a la subfamilia (*Epidendroidea*). Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con lo reportado por Arrigoni *et al.* (2015), quienes utilizaron marcadores ISSR para evaluar exitosamente la variabilidad genética intra e interpoblacional entre diferentes especies de los géneros *Cattleya*, *Epidendrum* y *Encyclia*, todas ellas pertenecientes a la tribu *Laellinae* de orquídeas.

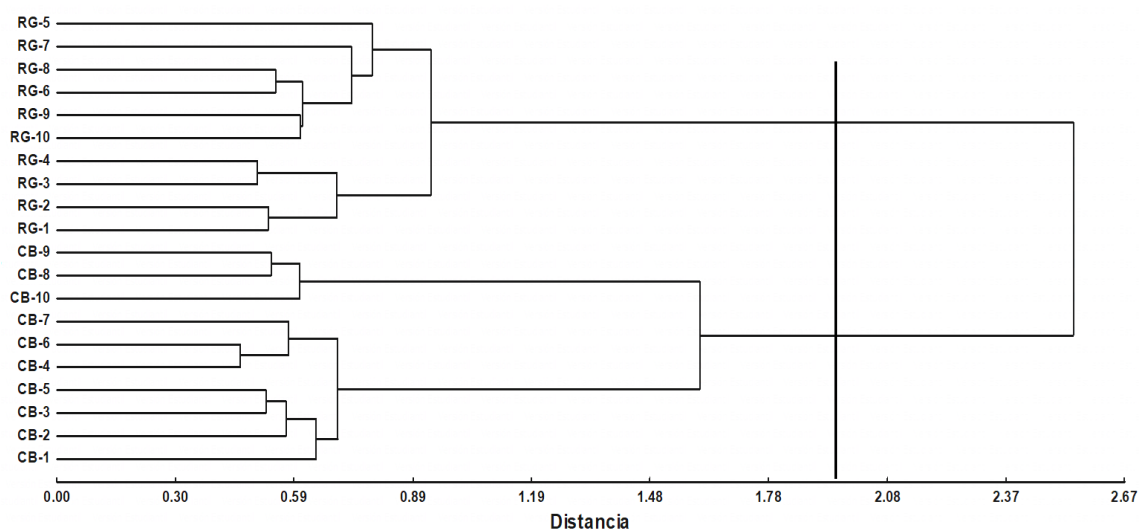


Figura 7. Dendrograma construido con el método de agrupamiento de varianza mínima de Ward y distancia de Jaccard ($\sqrt{1 - S}$) en orquídeas de las especies *Rhynchoaelia glauca* y *Chysis bractescens*.

3.5.2 Análisis molecular de varianza (AMOVA)

Los resultados que se obtuvieron en el análisis molecular de varianza (AMOVA) muestran que la mayor variabilidad genética se encontró dentro de las especies (51.96 %), mientras que de manera inesperada la menor variabilidad se obtuvo entre especies (Cuadro 4). La cercanía genética encontrada entre *Ch. bractescens* y *R. glauca* puede deberse a que ambas especies de orquídeas pertenecen a la misma subfamilia (*Epidendroideae*) y a la misma tribu (*Epidendreae*), además de

que diversos estudios recientes han mostrado que las orquídeas forman un solo grupo que incluye todos los descendientes de un ancestro común (Cameron *et al.*, 1999).

Cuadro 4. Análisis molecular de varianza (AMOVA) en orquídeas de las especies *Rhyncholaelia glauca* y *Chysis bractescens*.

F.V.	SC	gl	CM	p-valor	Componentes de Varianza	Variación (%)
Entre especies	294.36	1	147.18	<0.0001	22.53	48.04
Dentro de especies	414.39	17	24.38	<0.0001	24.38	51.96
Total	708.75	19	37.30		46.91	100.00

En relación con la alta variabilidad genética encontrada dentro de cada especie se puede considerar que, si bien las orquídeas tienden a propagarse principalmente de manera vegetativa, es decir, a partir del desarrollo de pseudobulbos provenientes de yemas, en las especies silvestres también se presenta la reproducción sexual por semilla.

De manera general, la reproducción asexual implica la duplicación íntegra del sistema cromosómico y del citoplasma asociado a la planta progenitora, y se basa en la capacidad de regeneración de plantas a partir de células somáticas que en consecuencia reproducen toda la composición genética de la planta progenitora (Patiño & Marín, 1993). Así, en 2006 Ávila y Oyama, comparando diferentes áreas geográficas de México, encontraron distancias genéticas que van de 0.007 a 0.057 en *Laelia speciosa*. Los ejemplares con los que se trabajaron no provenían de diferentes áreas geográficas, pero sí de una superficie amplia; se ha establecido que comúnmente las especies generalizadas tienen mayores niveles de variación que las especies endémicas presentes en un rango geográfico estrecho (Borba, Felix, Solferini & Semir, 2001). Así como que, por lo general, las poblaciones más grandes tienen mayor diversidad (Cozzolino, Cafasso, Pellegrino, Musacchio & Widmer, 2003). La composición y la dinámica de las poblaciones fundadoras

también se han relacionado con la diversidad genética; si la población fundadora contiene pocos individuos, entonces será genéticamente pobre, pero múltiples poblaciones fundadoras y / o poblaciones fundadoras grandes y diversas tendrán altos niveles de diversidad (Squirrel *et al.*, 2001). Por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que las especies estudiadas probablemente provinieron de poblaciones grandes y diversas. y que el saqueo que se ha realizado de sus poblaciones no ha reducido de manera importante su variabilidad genética.

3.5.3 Descriptiva de marcadores

Al analizar los perfiles moleculares de los diez ejemplares muestreados para cada una de las especies de orquídeas evaluadas, *R. glauca* y *Ch. bractescens* (Cuadro 5), se comprobó que ninguna muestra se encuentra duplicada. Mediante el uso de 15 iniciadores ISSR se obtuvo un total de 209 bandas, de las cuales 122 fueron polimórficas, lo cual representó un polimorfismo general del 58.37 %. El iniciador que más bandas amplificó fue el ISSR 8 con 25 bandas en total, de las cuales 19 fueron polimórficas, con un 34.8 % de amplificación a través de todas las muestras. El valor más alto de contenido de información polimórfica también fue obtenido por el iniciador ISSR 8, junto con PHV 6 (0.32), por lo que serían los más recomendables a utilizar en estudios posteriores de caracterización molecular de orquídeas. La menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar (PDICMA) por iniciador también fue encontrada para el iniciador ISSR 8. Esto indica que dicho iniciador mostró un alto grado de confianza en la identificación de individuos pertenecientes a *C. bractescens* y *R. glauca* al ser comparados simultáneamente. De manera contraria, los iniciadores ISSR 6 y M-1 mostraron los valores más bajos de capacidad discriminatoria y contenido de información polimórfica.

Cuadro 5. Análisis descriptivo de 15 iniciadores ISSR utilizados para obtener perfiles moleculares de *R. glauca* y *Ch. bractescens*.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	BP	BM	BT	PMF(95)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA
ISSR 1	(CA) ₈ AAGG	9	4	13	0.69	0.31	0.02	43.08	1.3E-08
ISSR 2	(CA) ₈ AAGCT	14	5	19	0.74	0.25	0.02	33.68	2.0E-07
ISSR 3	(GA) ₈ CTC	10	6	16	0.63	0.25	0.03	28.13	4.8E-06
ISSR 4	(AG) ₈ CTC	6	8	14	0.43	0.28	0.03	45.00	7.6E-05
ISSR 5	(AC) ₈ CTA	6	8	14	0.43	0.26	0.03	39.29	1.5E-04
ISSR 6	(AC) ₈ CTG	1	4	5	0.20	0.16	0.02	78.00	1.0E-01
ISSR 7	(AG) ₈ CTG	9	4	13	0.69	0.28	0.02	30.00	3.9E-10
ISSR 8	(AC) ₈ CTT	19	6	25	0.76	0.32	0.02	34.80	4.8E-12
ISSR 10	(GA) ₈ T	7	4	11	0.64	0.27	0.02	33.64	3.3E-09
LOL 2	(CT) ₈ GC	12	6	18	0.67	0.21	0.01	37.22	1.1E-05
LOL7	(GA) ₆ CC	7	4	11	0.64	0.22	0.01	46.36	1.7E-05
PHV 6	CCA(CT) ₈	3	10	13	0.23	0.32	0.02	45.38	5.0E-03
PHV 7	(GTG) ₂ (TG) ₆ T	9	5	14	0.64	0.20	0.02	27.86	6.9E-05
PI04	(CT) ₈ AGC	8	6	14	0.57	0.20	0.02	13.57	2.2E-05
M-1	(CA) ₆ GG	2	7	9	0.22	0.22	0.01	42.11	2.2E-02
Total		122	87	209				36.22	2.8E-81

BP: bandas polimórficas, BM: bandas monomórficas, BT: bandas totales, PMF(95): proporción de loci polimórficos, PIC: contenido de información polimórfica, EE:Error estándar, AMP: porcentaje de amplificación, PDICMA: probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar.

En la Figura 8 se muestran las huellas genómicas obtenidas mediante el uso del iniciador ISSR 8 de las plantas de orquídeas muestreadas pertenecientes a las especies *Rhyncholaelia glauca* y *Chysis bractescens*. En ella se pueden apreciar los patrones de bandas bien definidos y claramente distintos entre las dos especies evaluadas, por lo que se podría sugerir al Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS), el uso de este iniciador para la obtención de perfiles moleculares de orquídeas con fines de protección de estas especies endémicas mexicanas.

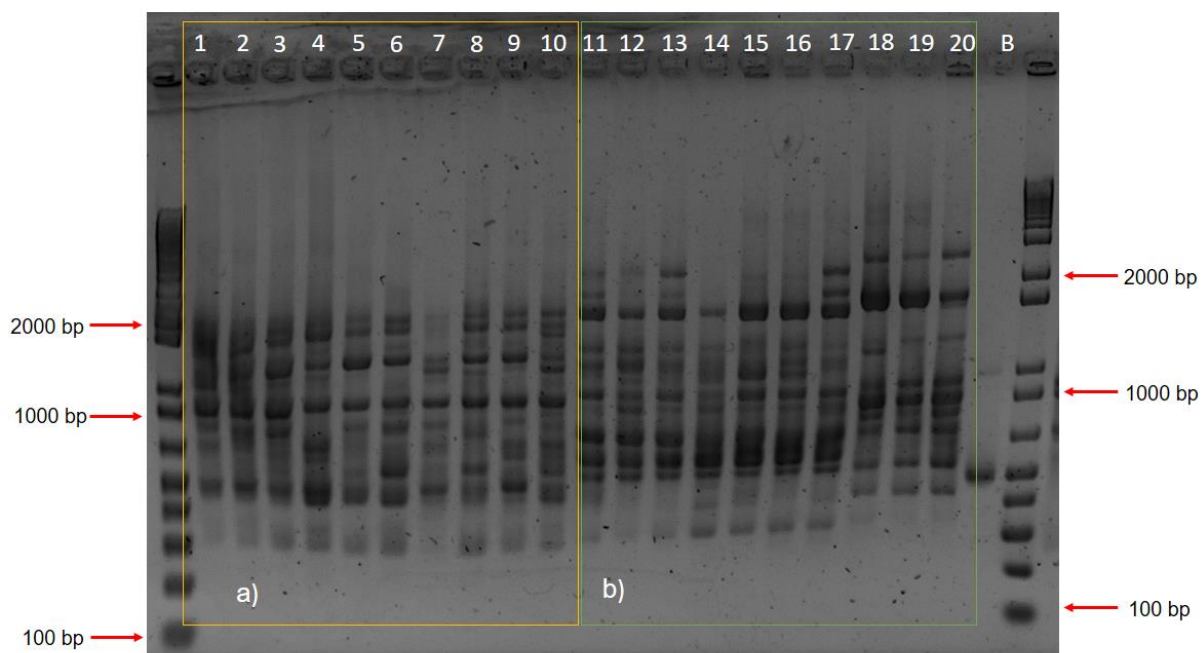


Figura 8. Huellas genómicas de las especies de orquídea a) *Rhyncholaelia glauca* y b) *Chysis bractescens* obtenidas mediante el uso del iniciador ISSR 8

3.5.4 Índice de diversidad de Shannon-Weaver

Uno de los índices más utilizados para cuantificar la biodiversidad específica es el de Shannon, también conocido como Shannon-Weaver (Shannon y Weaver, 1949). Este índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa. Conceptualmente es una medida del grado de incertidumbre asociado a la selección aleatoria de un individuo en la comunidad. El cálculo de este índice permite dimensionar la diversidad genética, considerando un valor de cero cuando sólo se presenta un alelo en la población y conforme aumenta el número de alelos éste incrementa su valor y con ello la diversidad genética presente (Pla, 2006).

El índice de Shannon-Weaver obtenido en el presente estudio fue de 5.11 (Cuadro 6) el cual se considera elevado, lo cual sugiere que existe una gran diversidad genética en las poblaciones de orquídeas muestreadas. Los índices de diversidad

dentro de especies fueron también altos y muy similares entre sí. Esto indica que la disminución del hábitat y el saqueo de orquídeas para su comercio ilegal no han disminuido la variabilidad genética en las poblaciones silvestres de *R. glauca* y *Ch. bractescens*. En un estudio realizado en poblaciones de orquídea de la especie *Cymbidium goeringii*, Chung et al. (2014) encontraron que la fragmentación del hábitat reduce la diversidad alélica y con ello el polimorfismo. El alto grado de polimorfismo encontrado en el presente estudio sugiere que la reducción del hábitat y disminución de las poblaciones de orquídeas aún no han reducido la variabilidad genética (no obstante, otros índices podrían darnos resultados diferentes) de las poblaciones naturales de manera importante. Sin embargo, sería conveniente realizar estudios considerando un mayor número de localidades de colecta para poder tener una estimación más precisa de los cambios en la estructura y variación genética de estas especies.

Cuadro 6. Índice de diversidad de Shannon-Weaver en *R. glauca* y *Ch. bractescens*.

Especie	Número de muestras	I	L _i	L _s	I _{Boot}	EE _{Boot}
<i>Rhyncholaelia glauca</i>	10	4.74	4.62	4.76	4.69	0.04
<i>Chysis bractescens</i>	10	4.94	4.77	5.00	4.88	0.06
Total	20	5.11	5.01	5.13	5.07	0.03

L_i: Límite inferior, L_s: Límite superior, I_{Boot}: 500 ciclos de remuestreo (Bootstrap) con intervalo de confianza de 0.95, EE_{Boot}: error del remuestreo.

3.6 CONCLUSIONES

Los marcadores tipo ISSR fueron útiles para explorar la variabilidad genética presente en poblaciones silvestres de orquídeas pertenecientes a las especies *Rhyncholaelia glauca* y *Chysis bractescens*.

Los resultados del presente estudio sugieren que dichas poblaciones no han sufrido cambios que alteren su estructura genética, por lo que no hay evidencia a

nivel genético de alteraciones debidas a la reducción de poblaciones y/o fragmentación del hábitat.

3.7 AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega por la revisión y conducción de este trabajo y la asesoría y apoyo técnico de la M. C. María Elisa Alvarado Cano y al Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández del Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido, Departamento de Fitotecnia, UACH, así como al Ing. Isaías Gil Vázquez por su apoyo en el resguardo del material vegetal.

3.8 LITERATURA CITADA

- Arrigoni-Blank, M. F., Santos, M. S., Blank, A. F., Rabbani, A. R. C., Silva-Mann, R., Santos, J. B., Costa, A.S. & Menezes T. S. A. (2015). Analysis of genetic diversity of *Laeliinae* (Orchidaceae) in the state of Sergipe using ISSR markers. *Genet. Mol. Res.* 15 (2). Disponible en <https://www.geneticsmr.com/author/mf-arrigoniblack-657>.
- Ávila D. I. & Oyama, K. (2007). Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 94, 184-193.
- Borba, E. L., Felix, J. M., Solferini V. N. & Semir, J. (2001). Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany*, 88, 419-428.
- Cameron, K. M., Whitten W. M., Kores P. J., Jarrell D.C., Albert, V.A., Yucawa, T., Hills H.G. & Goldman D.H. (1999). A phylogenetic analysis of the *Orchidaceae*: Evidence from rbcL nucleotide sequences. *Amer. J. Bot.*, 86,208-224.
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., Van den Berg, C. & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of *Orchidaceae*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177, 151–174.
- Chung, M. Y., Nason, J. D., López-Pujol, J., Yamashiro, T., Yang, B.-Y., Luo, Y.-B. & Chung, M. G. (2014). Genetic consequences of fragmentation on populations of the terrestrial orchid *Cymbidium goeringii*. *Biological Conservation*, 170: 222-231.

- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In Hewitt G. M., Johnston, A. W. B. & Young J. P. W. (eds.). *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293). Berlin, Springer,
- Cozzolino, S., Cafasso, D., Pellegrino, G., Musacchio, A. & Widmer, A. (2003). Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. *Molecular Ecology*, 12, 2783-2792.
- Dressler R. L. 2005. How many orchid species? *Selbyana*, 26, 155-158.
- Escandón, A., Pérez de la Torre, M., Soto, M. & Zelener, N. (2005). Identificación de clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* mediante microsatélites anclados. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 34, 5 - 17.
- Fang, H., Guo, Q., Shen, H. & Li, Y. (2012). Genetic diversity evaluation of *Chrysanthemum indicum* L. by medicinal compounds and molecular biology tools. *Biochem. Syst. Ecol.* 41, 26-34.
- George, S., Sharma, J. & Yadon V. L. (2009). Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *Am. J. Bot.* 96, 2022-2030. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.0800368>
- Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar G. A., Jiménez, R., López M. A. & Dressler R. L. (2005). Las orquídeas de México (p. 103). *Instituto Chinoín*, A.C., México, D.F.
- Patiño, V. F. & Marín, C. J. (1993). Viveros forestales, Planeación, establecimiento y producción de plantas. SARH-INIFAP-Centro de Investigación Regional del Sureste. México. 159 p.
- Pérez de la T. M., García, M., Heinz, R. & Escandón A. (2012). Analysis of genetic variability by ISSR markers in *Calibrachoa caesia*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15 (5), 1-12
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590.
- Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. (1991). *Biología de las Plantas*. Barcelona, España: Reverté. 541 p.
- Rech, A. R., Rosa, Y. B. C. J. & Rosa-Junior, E. J. (2011). Levantamento e características ecológicas de *Orchidaceae* da mata ciliar do Rio Dourados, Dourados-MS. *Arvore*, 35, 717-724. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000400016>

- SEMARNAT. (2011). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001. Protección ambiental Especies nativas de México de flora y fauna silvestres -Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 582(4):1-80 (2^a. sección, 6 marzo). Disponible en http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_orquideas.html
- Shannon, C. E. & Weaver W. (1949). The mathematical theory of communication. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU. 144 p.
- Sheeja, G., Jyotsna, S. & Vern L. Y. (2009). Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) Assessed with ISSR Polymorphisms. *American Journal of Botany*, 96, 2022-2030
- Soto-Arenas, M. A. (1996). México. In: Hágsater, E. & Drumont, V. (eds.) *Orchids*. IUCN/SSC (pp 52-58). UK: Cambridge.
- Squirrell, J., Hollingsworth, P. M., Bateman, R. M., Dickson, J. H., Light, M. H. S., MacConail, M. & Tebbitt, M. C. (2001). Partitioning and diversity of nuclear and organelle markers in native and introduced populations of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 88, 1409–1418.
- Téllez V., M. A. A. (2011). *Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México* (pp. 28-32). México: Universidad Autónoma Chapingo.

4. CRIOCONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE DOS ORQUÍDEAS

MEXICANAS (*Rhyncholaelia glauca* y *Chysis bractescens*)

CRIOCONSERVATION OF SEEDS OF TWO MEXICAN ORCHIDS

(*Rhyncholaelia glauca* and *Chysis bractescens*)

4.1 RESUMEN

El 90 % de las 7.4 millones de accesiones almacenadas en condiciones *ex situ* se mantienen como semilla en bancos de germoplasma, sin embargo, no todas las semillas pueden ser conservadas en los cuartos fríos de éstos. Es el caso de las orquídeas como *Rhyncholaelia glauca* (Lindl.) Schltr. (1918) y *Chysis bractescens* Lindl. (1840). El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad de semillas después de ser crioconservadas en nitrógeno líquido. Las semillas fueron pretratadas con cuatro disoluciones crioprotectoras y una solución de carga. Fueron sumergidas en nitrógeno líquido y después se tiñeron con cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio (CTT) al 2 %. De los resultados del conteo de las semillas se obtuvo que el tratamiento, que consiste en semillas sin ninguna solución, presentó un mayor número de embriones coloreados con 82 % para *Ch. bractescens* y *R. glauca* con 58.2 %. Los porcentajes de viabilidad más bajos se obtuvieron para el tratamiento 10 compuesto por el tratamiento de carga + DC3 (Dimetilsulfóxido 1 % + polietilenglicol 1 % + glicerol 30 %) con 11.4 % en *Chysis bractescens* a 40 minutos y para el tratamiento 15 que se compuso del tratamiento de carga + DC3 (Dimetilsulfóxido 1 % + polietilenglicol 1 % + glicerol 30 %) con 6.6 % en *Rhyncholaelia glauca* a 20 minutos. No obstante que los datos reflejan que las semillas de dichas especies pueden ser crioconservadas, sería recomendable evaluar otros protocolos.

Palabras clave: *Rhyncholaelia glauca*, *Chysis bractescens*, crioconservación, cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio, viabilidad de semillas.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Araceli Mungia Méndez

Director de Tesis: Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

CRIOCONSERVATION OF SEEDS OF TWO MEXICAN ORCHIDS

(*Rhyncholaelia glauca* and *Chysis bractescens*)

4.2 ABSTRAC

Ninety percent of the 7.4 million accessions stored under ex situ conditions are kept as seed in germplasm banks, however not all seeds can be conserved in their cold rooms. This is the case of orchids such as *Rhyncholaelia glauca* (Lindl.) Schltr. (1918) and *Chysis bractescens* Lindl. (1840). The objective of this study was to evaluate the viability of seeds after being cryopreserved in liquid nitrogen. The seeds were pretreated with four cryoprotective solutions and a loading solution. They were immersed in liquid nitrogen and then stained with 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (CTT) 2 %. From the results of the count of the seeds it was obtained that the treatment, consisting of seeds without any solution, presented a greater number of colored embryos with 82 % for *Ch. Bractescens* and *R. glauca* with 58.2 %. The lowest viability percentages were obtained for the treatment 10 composed of loading solution + DC3 (1 % Dimethylsulfoxide + 1% polyethylene glycol + 30 % glycerol) with 11.4 % in *Chysis bractescens* at 40 minutes and for the treatment 15 that was composed of charge treatment + DC3 (1% Dimethylsulfoxide + 1 % polyethylene glycol + 30 % glycerol) with 6.6 % in *Rhyncholaelia glauca* at 20 minutes. Although the data reflect that the seeds of these species can be cryopreserved, it would be advisable to evaluate other protocols.

Keywords: *Rhyncholaelia glauca*, *Chysis bractescens*, cryopreservation, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, seed viability.

Thesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Araceli Munguía Méndez
Advisor: Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

4.3 INTRODUCCIÓN

Hay muchas técnicas disponibles para la conservación de los recursos fitogenéticos de las especies en peligro de extinción. La conservación de semillas es actualmente una de las más usadas, el 90 % de los 7.4 millones de accesiones almacenadas en condiciones *ex situ* se mantienen como semilla en bancos de germoplasma, que para ser conservadas durante periodos muy largos requieren ser deshidratadas y almacenadas a bajas temperaturas. Las semillas que toleran estas condiciones se denominan ortodoxas (Roberts, 1973), sin embargo, no todas tienen el mismo comportamiento, las que algunas plantas producen, entre ellas algunas orquídeas, son incapaces de resistir la desecación y a menudo también son muy sensibles al frío (Chin, 1988), a éstas se les conoce como recalcitrantes (Roberts, 1973). Es debido a estas diferencias que la comunidad internacional ha prestado atención al desarrollo de nuevas tecnologías de almacenamiento, incluidas la conservación *in vitro* y la crioconservación (Engelmann & Engels 2002).

La crioconservación es un método de conservación a largo plazo, éste consiste en el almacenamiento de material vegetal a una temperatura ultrabaja, por lo general totalmente inmersa en nitrógeno líquido (-196 °C). A esa temperatura, la división celular y todos los procesos metabólicos se detienen. El material vegetal puede así ser almacenado sin alteración o modificación por periodos de tiempo muy prolongados. La crioconservación ha sido aplicada con éxito a una amplia gama de especies propagadas vegetativamente tanto de climas templados como de origen tropical, y los protocolos desarrollados suelen ser muy eficientes (Engelman, 2010). Cuando un material biológico se somete a una temperatura de congelación, mientras menor sea su contenido de agua, menor será la probabilidad de que ocurran daños letales por la cristalización de la fase acuosa en el medio intracelular (González-Arno & Engelmann 2013). Esto significa que, para los procesos criogénicos, el paso clave está asociado con la reducción máxima de agua que puede ser congelada sin sufrir daño. El método de la desecación es sencillo y apropiado para la disminución de agua en semillas. Este método consiste únicamente en dejar secar al aire libre el material vegetal. Para

obtener mejores resultados se puede complementar con precultivos en azúcares (Pence 1955), el uso de disoluciones que contengan sustancias con propiedades crioprotectoras como el dimetilsulfóxido (DMSO), la sacarosa y el glicerol. Los crioprotectores tienen la capacidad de actuar desde el interior hasta el exterior de la célula disminuyendo el punto de congelación, protegen la integridad de la membrana e incrementan la viscosidad de la solución celular (González-Arnan, Panta, Roca, Escobar & Engelman, 2008).

Las semillas de orquídeas silvestres son en su mayoría heterogéneas y su preservación ayuda a conservar la diversidad genética de sus poblaciones. Es por eso por lo que hasta ahora, se han realizado diversos trabajos relacionados con la crioconservación de semillas de diferentes especies de orquídeas.

Hsin, Han, Iuan y Chang (2013) estudiaron la crioconservación de semillas de *Bletilla formosana*, una orquídea terrestre por medio de la técnica de vitrificación, obteniendo un 91 % de germinación. En ese mismo año Esquivel y Alvarado trabajaron con *Guariante skinerii* usando la misma técnica, obteniendo un 68.37 % de germinación. Cueva y Moya (2015) realizaron un estudio con 4 géneros de orquídeas de Ecuador: *Elleanthus*, *Odontoglossum*, *Epidendrum* y *Oncidium*; mediante la evaluación de la interacción de 4 crioprotectores: C1 (1,5ml DMSO 1M), C2 (0,75ml de DMSO 1M+ 0,75ml de Sucrosa 1M), C3 (0,75ml de DMSO 1M+ 0,75ml de Glicerol 1M), C4 (0,5ml de DMSO 1M+ 0,5ml de Sucrosa 1M + 0,5ml de Glicerol 1M) y, dos técnicas de enfriamiento: Rápido (sumergidas directamente a -196°C); y, Escalonado (descenso de temperatura a -80°C y posteriormente a -196 °C en nitrógeno líquido). Los mayores porcentajes de viabilidad en la prueba de tetrazolio la obtuvieron en los géneros *Elleanthus*, *Epidendrum* y *Oncidium* con un promedio de 66.3 %, 57.9 % y 47.5 %, respectivamente.

Comparado con el tradicional método de almacenamiento, la crioconservación requiere poco espacio y no requiere de electricidad.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Material vegetal

Se usaron semillas maduras de *Chysis bractescens* y *Rhyncholaelia glauca*, contenidas aún en cápsula, colectadas directamente de la planta en la UMA “Chapingo”, ubicada en la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México con coordenadas 19°29′17.5” LN-98°53′13.8” LO. Las cápsulas fueron colocadas en sobres de papel previamente etiquetadas con fechas de polinización y de colecta hasta que liberaron a las semillas. Posteriormente se retiraron los restos de la cápsula y cualquier tipo de impureza. Para verificar su utilidad se realizó una prueba de viabilidad con Cloruro de tetrazolio.

4.4.2 Osmoprotección

Para la elaboración de las disoluciones se realizaron los cálculos y pesos de los reactivos correspondientes. Posteriormente se prepararon 4 disoluciones crioprotectoras y una disolución de carga (tratamiento de carga) en frascos de cristal de 100 ml. con tapa de rosca. Una vez preparadas las disoluciones, se filtraron con la ayuda de un filtro Millex® GV de 0.22 µm para jeringa y se pasaron a otros frascos de cristal con tapa de rosca previamente esterilizados, se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. Posteriormente se formaron 48 grupos por cada una de las especies con aproximadamente 500 semillas, y con la ayuda de una micro espátula se colocaron en criotubos de polipropileno de 2.0 ml. con tapa de rosca y faldón previamente etiquetados. Éstos se colocaron en un criocontenedor de policarbonato con tapa. Una vez ordenados, a cada criotubo se le agregó 0.5 ml. del tratamiento de carga y 1 ml. de la disolución que le correspondía de acuerdo con los tratamientos descritos en el Cuadro 7, para asegurar que las semillas se embebieran con la disolución, se agitaron ligeramente. Finalmente se dejaron reposar a temperatura ambiente durante diferentes periodos de tiempo (20, 40 y 60 minutos).

Cuadro 7. Tratamientos usados para el estudio de crioconservación de semillas de *Chysis bractescens* y *Rhyncholaelia glauca*.

Tiempo (minutos)	tratamiento	Disolución
No aplica	1	Testigo (únicamente semillas)
	2	TC ^z (2 M de glicerol 50 % y 0.4 M de sacarosa 50 %)
	3	TC + DC ^y 1 (Glicerol 30 % + polietilenglicol 15 % + dimetilsulfóxido 15 % + sacarosa 40 %)
	4	TC + DC2 (Glicerol 50 % + Sacarosa 50 %)
	5	TC + DC3 (Dimetilsulfóxido 1 % + polietilenglicol 1 % + glicerol 30 %)
	6	TC + DC4 (Dimetilsulfóxido 1 % + Glicerol 5 % + Sacarosa 5 %)
60	7	TC (2 M de glicerol y 0.4 M de sacarosa)
	8	TC + DC1 (Glicerol 30 % + polietilenglicol 15 % + dimetilsulfóxido 15 % + sacarosa 40 %)
	9	TC + DC2 (Glicerol 50 % + Sacarosa 50 %)
	10	TC + DC3 (Dimetilsulfóxido 1 % + polietilenglicol 1 % + glicerol 30 %)
	11	TC + DC4 (Dimetilsulfóxido 1 % + Glicerol 5 % + Sacarosa 5 %)
40	12	TC (2 M de glicerol y 0.4 M de sacarosa)
	13	TC + DC1 (Glicerol 30 % + polietilenglicol 15 % + dimetilsulfóxido 15 % + sacarosa 40 %)
	14	TC + DC2 (Glicerol 50 % + Sacarosa 50 %)
	15	TC + DC3 (Dimetilsulfóxido 1 % + polietilenglicol 1 % + glicerol 30 %)
	16	TC + DC4 (Dimetilsulfóxido 1 % + Glicerol 5 % + Sacarosa 5 %)
20	17	TC (2 M de glicerol y 0.4 M de sacarosa)
	18	TC + DC1 (Glicerol 30 % + polietilenglicol 15 % + dimetilsulfóxido 15 % + sacarosa 40 %)
	19	TC + DC2 (Glicerol 50 % + Sacarosa 50 %)
	20	TC + DC3 (Dimetilsulfóxido 1 % + polietilenglicol 1 % + glicerol 30 %)
	21	TC + DC4 (Dimetilsulfóxido 1 % + Glicerol 5 % + Sacarosa 5 %)

^z TC= Tratamiento de carga; ^y DC= Disolución crioprotectora

4.4.3 Crioconservación en nitrógeno líquido

Las semillas en los criotubos se sumergieron directamente en nitrógeno líquido durante una hora. Una vez transcurrido el tiempo, los criotubos fueron retirados y calentados rápidamente a baño maría a 36 ° C durante 1 minuto.

Después, se decantó en un papel filtro y se enjuagaron las semillas con agua estéril, por último, se colocaron en cajas Petri y se les agregó cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio (CTT) al 2 % hasta cubrirlas completamente, se envolvieron las cajas con papel aluminio para evitar la iluminación y se dejaron reposando por 24 horas en la obscuridad. Además, se anexó una caja Petri con semillas que no fueron sometidas a crioconservación para comparar resultados.

Finalmente se contaron las semillas teñidas en color rojo y naranja intenso con la ayuda de un microscopio estereoscópico marca Carl-6, modelo Stemi DV4 a 10x.

4.4.4 Método estadístico

Cada tratamiento contó con 500 semillas, no se consideraron a las semillas vanas. Para medir la viabilidad de las semillas se contó, de cada tratamiento, el número de embriones teñidos de color rojo intenso y naranja por cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio, y éstas representaron la supervivencia. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y un análisis de medias por medio del sistema de análisis estadístico R.

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los resultados del conteo de las semillas (Cuadro 8) se obtuvo que el tratamiento 1 (sólo semillas) presentó un mayor número de embriones coloreados en *Ch. bractescens* y *R. glauca* con 82 % y 58.2 % respectivamente. Los siguientes porcentajes más altos para *Ch. bractescens* se obtuvieron en el tratamiento 13 (80 %) y 14 (78 %), mientras que para *R. glauca* fueron los tratamientos 8 (49.6 %) y 11 (57.8 %).

Los porcentajes de coloración más bajos se obtuvieron para el tratamiento 10 (11.4 %) en *Ch. bractescens* y para el 15 (6.6 %) en *R. glauca*. Estos resultados demuestran que el método de la desecación es apropiado para crioconservar semillas de estas dos especies de orquídeas mexicanas.

Cuadro 8. Número de semillas viables por la prueba de cloruro de tetrazolio antes y después de ser sometidas a crioconservación.

Tratamiento	Semillas viables	
	<i>Chysis bractescens</i>	<i>Rhynchoaelia glauca</i>
Sin NL ^z	412 (82.4 %)	298 (59.6 %)
1	410 (82 %)	293 (58.2 %)
2	153 (30.6 %)	91 (18.2 %)
3	80 (16 %)	199 (39.8 %)
4	147 (29.4 %)	173 (34.6 %)
5	169 (33.8 %)	66 (13.2 %)
6	162 (32.4 %)	165 (33 %)
7	113 (22.6 %)	99 (19.8 %)
8	311 (62.2 %)	248 (49.6 %)
9	52 (10.4 %)	146 (29.2 %)
10	57 (11.4 %)	45 (9 %)
11	194 (38.8 %)	289 (57.8 %)
12	206 (41.2 %)	133 (26.6 %)
13	400 (80 %)	222 (44.4 %)
14	390 (78 %)	117 (23.4 %)
15	260 (52 %)	33 (6.6 %)
16	392 (78.4 %)	65 (13 %)

^z Nitrógeno líquido: Semillas que no fueron sometidas a crioconservación.

Por otro lado es necesario destacar que la coloración fue más intensa en semillas de *R. glauca* (figura 9) donde se presentaron coloraciones de naranja a rojo intenso, mientras que en *Chysis bractescens* (Figura 10), la mayoría de las semillas tendieron de naranja a naranja intenso, sin embargo, en esta última se presentaron una mayor cantidad de embriones coloreados en comparación con la primera, para observar también el vigor se sugiere el método establecido por Moreno y Cuevas. Las semillas viables se tiñeron de rojo, debido a la reducción del tetrazolio por la actividad respiratoria de las células (International Seed Testing Association, 1985), mientras que las inviables no presentaron ninguna tonalidad. Por otro lado, se pudo observar la ausencia de embrión en algunas semillas (semillas vanas).

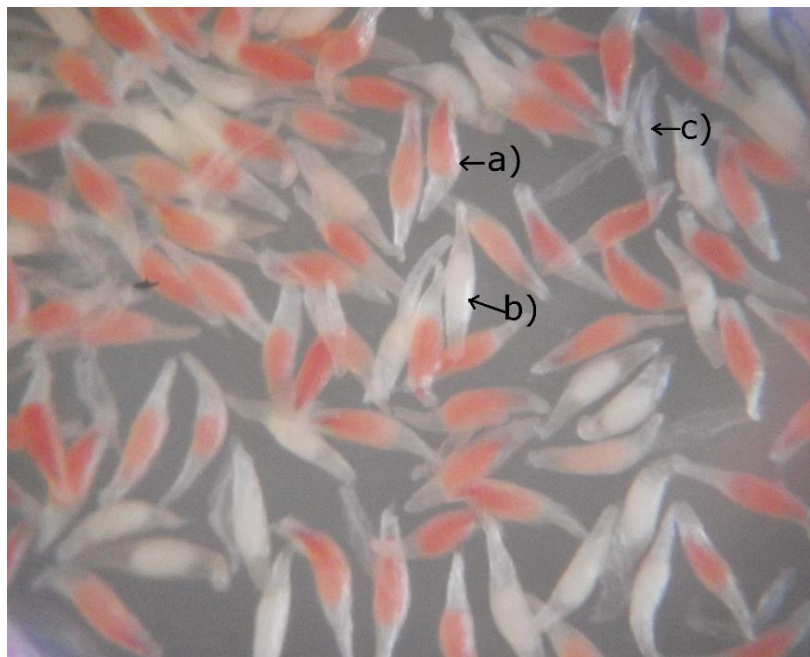


Figura 9. Semillas de *Rhyncholaelia glauca*, a) Semilla viable, b) Semilla no viable y c) Semilla vana

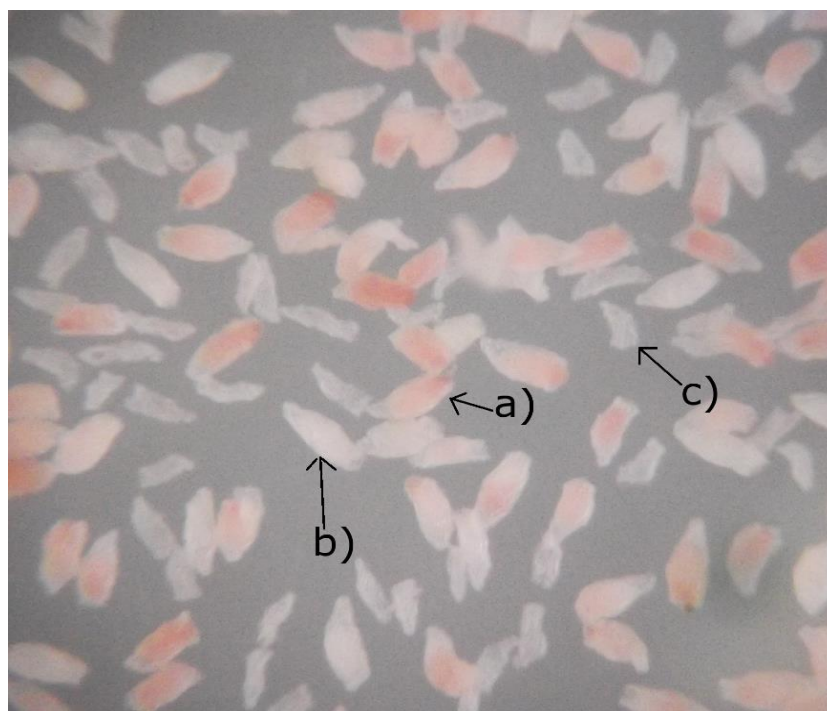


Figura 10. Semillas de *Chysis bractescens*, a) Semilla viable, b) Semilla no viable y c) Semilla vana

En la Figura 11 que corresponde al número de semillas viables de *Ch. bractescens* se observó que el factor determinante fue el tiempo de exposición a las disoluciones. Para esta especie los mejores resultados se obtuvieron a los 20 minutos con las disoluciones crioprotectoras 1,2 y 4. Un número significativo de viabilidad también se obtuvo con la disolución crioprotectora 1 con 40 minutos de exposición. Por otro lado los resultados más bajos se obtuvieron a los 60 minutos con las disoluciones crioprotectoras 2 y 3.

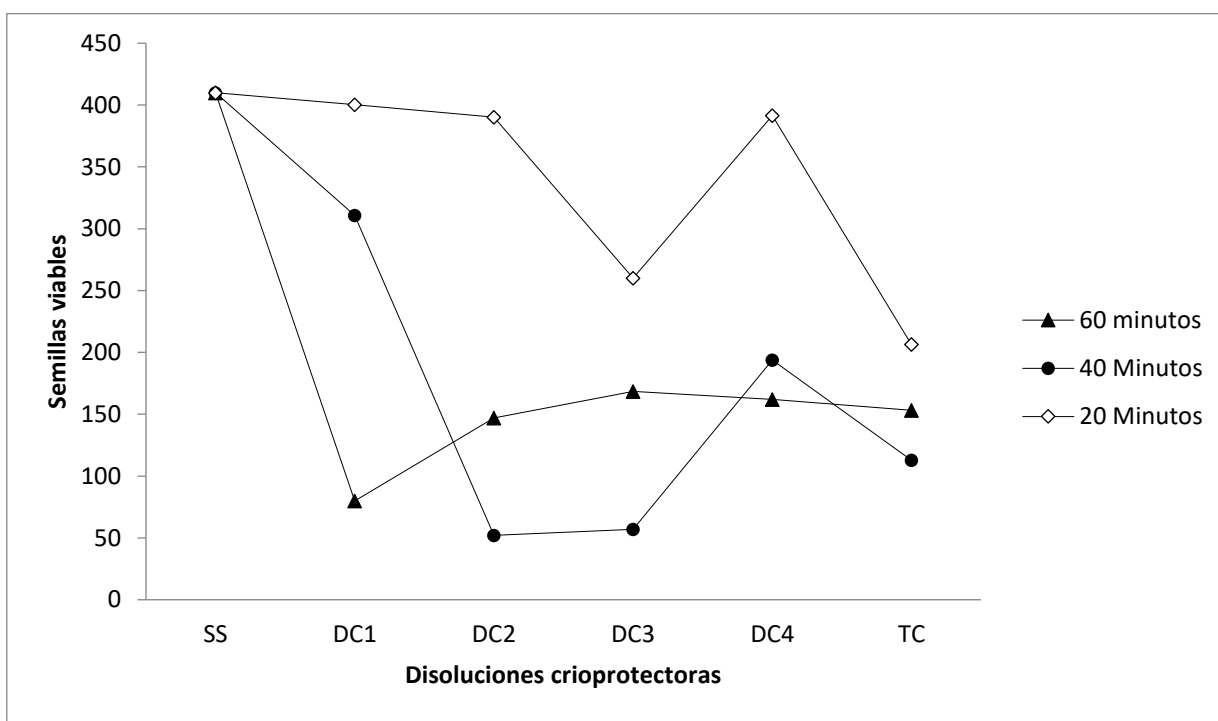


Figura 11. Semillas viables de *Chysis bractescens* después de haber sido sometidas a crioconservación bajo diferentes tratamientos.

Los mejores resultados en *R. glauca* se obtuvieron con las disoluciones crioprotectoras 1 y 4 con un tiempo de exposición de 40 minutos (Figura 5). La menor cantidad de semillas coloreadas se encontraron para las disoluciones crioprotectoras 3 con 60 y 40 minutos y 4 con 20 minutos. A diferencia de los resultados obtenidos en *Ch. Bractescens* donde claramente se observó la influencia del tiempo al que estuvieron expuestas las semillas a las disoluciones crioprotectoras en el número de semillas coloreadas, en esta especie no se presentó un factor determinante.

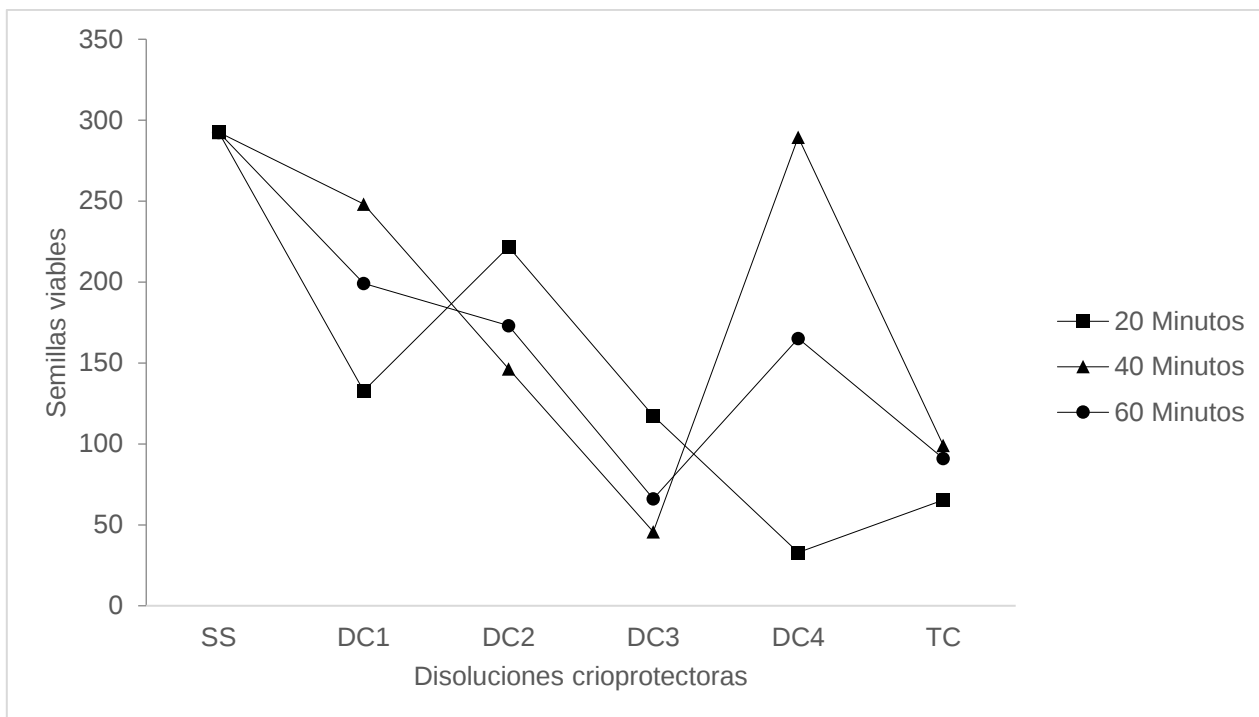


Figura 12. Semillas viables de *Rhyncholaelia glauca* después de haber sido sometidas a crioconservación bajo diferentes tratamientos.

Los resultados obtenidos podrían deberse a que la mayoría de las semillas contaban con una cantidad óptima de agua para ser crioconservadas antes de ser sometidas a los diferentes tratamientos, por lo que someterlas a disoluciones provocó una desecación mayor a la que puede ser tolerada por las semillas de *Chysis bractescens* y *Rhyncholaelia glauca*.

4.6 CONCLUSIONES

Las semillas de *Chysis bractescens* y *Rhyncholaelia glauca* presentaron mayor viabilidad sin ser sometidas a ninguna solución crioprotectora.

Ambas especies presentaron diferentes respuestas tanto al tiempo de exposición como a las diferentes disoluciones crioprotectoras, sin embargo los resultados de este trabajo reflejaron que con un tiempo de exposición de 40 minutos a la disolución crioprotectora 1 (TC + Glicerol 30 % + polietilenglicol 15 % +

dimetilsulfóxido 15 % + sacarosa 40 %) se obtuvieron buenos resultados en ambas especies de orquídeas mexicanas, es decir que las semillas de *Chyisis bractescens* y *Rhynchoaelia glauca* respondieron positivamente a la crioconservación.

4.7 AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez por la conducción y revisión de este trabajo, al Ing. Isaías Gil Vázquez por facilitar las semillas empleadas en esta investigación y al Ing. Edgar Francisco Vidal Siles por su apoyo en la realización de este experimento

4.8 LITERATURA CITADA

- Abdelnour E., A. & Alvarado U., C. (2013). Crioconservación de semillas y protocormos de especies de la familia Orchidaceae en peligro de extinción. (Informe final, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica) Consultada en https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/3148/crioconservacion_semillas_protocormos_especies_familia.pdf?sequence=1.
- Chin H., F. (1988). Recalcitrant seeds: a status report (p. 17). Roma, IT, IPGRI.
- Cueva C., E. E., & Moya A., M. B. (2015). Evaluación de tres crioprotectores para el almacenamiento en nitrógeno líquido de semillas de orquídeas nativas de Ecuador de los cuatro géneros *Elleanthus*, *Epidendrum*, *Odontoglossum* y *Oncidium*. (Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador, Quito). Consultada en <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9218>. Consultado el 01 de febrero de 2018.
- Engelmann F., & Engels J., M. M. (2002). Technologies and Strategies for ex situ conservation. In Engels JMM, Rao V. R., Brown A., H. D., Jackson M. T., (eds.), *Managing Plant Genetic Diversity* (pp. 89-104). Oxford, Cabi Publishing.
- Engelmann F. (2010). Integration of cryopreservation in plant genetic resource conservation strategies in France. *CryoLetters*, 31,82.
- Gonzalez-Arnan, M. T., Panta A., Roca W. M., Escobar R. H., & Engelmann R., H. (2008). Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 92,1-13.

- Gonzalez-Arnan, M. T., & Engelmann, F. (2013). Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. In Gonzalez-Arnan, M.T., Engelmann F. (Eds.), *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe* (pp. 25-51). Costa Rica: IICA.
- Hsin H., W., Han Y., Y., Iuan L., S., & Chang C. (2013). Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. by vitrification. *Botanical Studies*, 54:33. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-33>.
- International Seed Testing Association. (1985). *International rules for seed testing*. Seed Science and Technology. (pp. 300-520).
- Pence V. C. (1995). Cryopreservation of recalcitrant seeds. In Bajaj Y., P. S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 32 *Cryopreservation of plant germplasm I* (p. 29). Berlín.
- Roberts, H. F. 1973. Predicting the viability of seeds. *Seed Science and Technology*, 1,499-514.