

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

*"Enseñar la Explotación de la
Tierra, no la del Hombre"*

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**"ESTUDIOS DE CRIOCONSERVACIÓN MEDIANTE
ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN Y VITRIFICACIÓN, Y
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Laelia speciosa* (H.B.K.)
Schltr)."**

TESIS PROFESIONAL

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA:

CARMEN MEDINA MENDOZA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

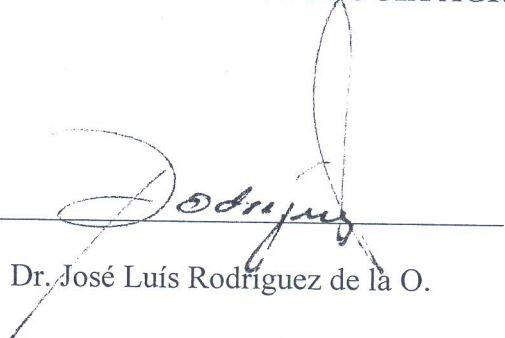
Chapingo, México, Septiembre de 2008



“ESTUDIOS DE CRIOCONSERVACIÓN MEDIANTE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN Y VITRIFICACIÓN, Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr.” Tesis realizada por la C. Carmen Medina Mendoza bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

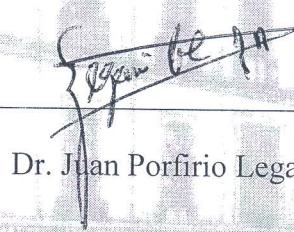
DIRECTOR:


Dr. José Luís Rodríguez de la O.

ASESOR:


Dr. Juan Martínez Solís

ASESOR:


Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme lograr una meta más en mi vida.

A mi familia, por todo el apoyo que siempre me han brindado incondicionalmente.

A la familia Espinosa Martínez, por su cariño y apoyo.

A la familia Ramón, por permitirme ser parte de su familia.

A mis grandes amigos (Nery, Chio, Laura, Lydia, Rosita, Ramón), gracias por todo su apoyo y amistad.

El principio de la sabiduría es el temor de Jehová, porque el da la sabiduría, y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia (Pr. 1:7, 2:6). Nunca se aparten de ti la misericordia y la verdad; átalas a tu cuello, escríbelas en la tabla de tu corazón; y hallaras gracia y buena opinión ante los ojos de Dios y de los hombres (Pr. 3:3-4).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por darme la oportunidad de lograr mis metas.

A todos mis maestros del Departamento de Fitotecnia y en especial a los del posgrado en Biotecnología por ser parte de mi formación académica.

A todo el equipo de los laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales y de Biotecnología Agrícola, técnicos y compañeros de trabajo.

Al Dr. José Luís Rodríguez de la O, por sus consejos, amistad y apoyo durante la elaboración de la fase experimental y elaboración de la tesis.

Al Dr. Juan P. Legaria Solano por su amistad y apoyo brindado durante la fase experimental de la tesis y revisión de la misma.

Al Dr. Juan Martines Solís por su contribución en la revisión de la tesis.

Al Dr. Jaime Sahún Castellanos por su apoyo en los análisis estadísticos de la tesis.

Al Dr. Miguel Ángel Cruz Serrato por sus valiosos aportes para la mejora de la tesis.

A mis compañeros de posgrado Cecilia Cabrera e Ismael López por compartir gratos momentos.

DATOS BIBLIOGRÁFICOS

El autor de la presente tesis es Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, originaria del estado de Hidalgo. Nació el 30 de julio del 1983. Realice mis estudios en la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo en la generación 1998-2001. Realice mis estudios de licenciatura (2001-2005) en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia con la tesis titulada “Evaluación de Medios de Cultivo *In Vitro* para la germinación de semillas de *Laelia anceps* ”. Realice una maestría en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, en el Programa de Biotecnología Agrícola (2006-2007) obteniendo el título de Maestra en Ciencias en Biotecnología Agrícola con la tesis titulada “Crioconservación Mediante Encapsulación-Deshidratación y Vitricación, y Caracterización molecular de *Laelia speciosa*”

Estudios de Crioconservación Mediante Encapsulación-Deshidratación y Vitricación de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr)

Studies Cryopreservation by Encapsulation-Dehydration and Vitricación of *Laelia speciosa* (HBK) Schltr)

Carmen Medina Mendoza¹, José Luis Rodríguez de la O².

RESUMEN

Dentro de la diversidad que México posee, se encuentran las orquídeas, de las cuales el 44 % son endémicas. Los bancos de germoplasma son una alternativa para el rescate y preservación de innumerables recursos. Por ello la importancia de establecer condiciones *in vitro* que permitan rescatar, multiplicar y preservar a la orquídea *Laelia speciosa*. Se evaluaron medios de cultivo *in vitro* para la micropropagación, y crioconservación mediante encapsulación-deshidratación y vitricación de protocormos. Las mejores condiciones de micropropagación incluyó el medio básico de Murashige y Skoog (1962) con extracto de malta (500 mg·l⁻¹), el mejor sustrato para la aclimatación fue Tezontle rojo + peat most. La encapsulación de protocormos con 3 % de alginato de sodio y 0.75 M de cloruro de calcio fue útil para la crioconservación mediante un pre-tratamiento de 0.75 M durante 24 h, expuestas a silica gel por 5 h obteniendo un contenido de humedad de 25 %, lo que produjo sobrevivencias del 100 % y 80 % de regeneración. Mediante un pre-cultivo de 0.3 M de sacarosa durante 3 d, 20 min en tratamiento de carga y deshidratación con PVS2 por 60 min se obtuvo 100 % de sobrevivencia y regeneración.

Palabras Clave: Germinación, multiplicación, semilla sintética, regeneración.

ABSTRACT

Within the diversity that Mexico has, are orchids, of which 44% are endemic. The gene banks are an alternative to the rescue and preservation of countless resources. Hence the importance of establishing *in vitro* conditions that allow rescue, multiply and preserve the orchid *Laelia speciosa*. We evaluated growth media for micro-encapsulation and cryopreservation through dehydration and vitrification protocorms. The best conditions micropropagation include the basic and Murashige Skoog (1962) with malta extract (500 mg · l⁻¹), the best substrate for acclimatization was Tezontle red + peat most. The encapsulation of protocorms with 3% of sodium alginate and 0.75 M calcium chloride was instrumental in cryopreservation through a pre-treatment of 0.75 M for 24 hours, exposed to silica gel for 5 hours getting a moisture content of 25% , Resulting in survival of 100% and 80% of regeneration. Through a pre-cultivation of 0.3 M sucrose for 3 d, 20 minutes in treatment of loading and dehydration with PVS2 for 60 minutes was 100% survival and regeneration.

Keyword: germination, multiplication, seed synthetic, regeneration

1. Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo Km. 38.5 Carretera Mexico-Texcoco. Chapingo. México. Email: carmm16@hotmail.com

2. Profesor-investigador del Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 38.5 Carretera Mexico-Texcoco. Chapingo. México.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivo general.....	2
2.2. Objetivos particulares	2
2.3 Hipótesis	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1. Generalidades de la familia Orquidaceae.....	3
3.1.1. Origen	3
3.1.2. Importancia Económica	3
3.1.3. Taxonomía y morfología	4
3.1.4. <i>Laelia speciosa</i> (H. B. K.) Schltr.	6
3.1.5 <i>Cattleya aurantiaca</i> (Batem.) Lindl.....	8
3.1.6 Problemática en la familia Orquidaceae	10
3.1.7 Germinación de semillas.....	11
3.1.8 Métodos de propagación <i>in vitro</i>	13
3.1.9 Medios de cultivo <i>in vitro</i>	14
3.2 Semilla sintética o artificial.....	15
3.2.1 Tipos de semillas sintéticas.....	16
3.2.2 Producción de semillas sintéticas	17
3.2.3 Calidad de la semilla sintética	18
3.2.4 Encapsulación con alginato	19
3.2.5 Antecedentes en la encapsulación de orquídeas	20
3.3 Conservación de recursos.....	21
3.3.1 Conservación <i>in situ</i> y <i>ex situ</i>	21
3.3.2 Conservación <i>in vitro</i>	22
3.3.3 Principales problemas de la conservación de recursos	24
3.4 Conservación a largo plazo	24
3.4.1 Criopreservación.....	25
3.4.2 Principios básicos de la crioconservación.....	27
3.4.3 Selección y preparación del germoplasma para crioconservar	32
3.4.4 Congelamiento	35
3.4.5 Congelamiento lento	35
3.4.6 Congelamiento ultra rápido	36
3.4.6.1 Técnica de Encapsulación-Deshidratación.....	37
3.4.6.2 Técnica de vitrificación.....	39
3.4.7 Antecedentes en crioconservación de orquídeas.....	41
3.4.8 Perspectivas	44
3.5 Diversidad genética.....	44
3.5.1 Marcadores moleculares	45
3.5.2 Marcadores moleculares de ADN	46
3.5.3 Marcadores moleculares RAPDs	47
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51

4.1 Ubicación de la fase experimental.....	51
4.2 Manejo <i>in vitro</i>	51
4.2.1 Pruebas de germinación	51
4.2.2 Medios de multiplicación	53
4.2.3 Aclimatación.....	54
4.3 Pruebas de crioconservación	56
4.3.1 Encapsulación-deshidratación	56
4.3.2 Vitricación	58
4.4 Caracterización molecular	59
4.4.1 Purificación de ADN	59
4.4.2 Evaluación de la cantidad y calidad del ADN	61
4.4.3 Obtención de los patrones RAPD	63
4.4.3.1 Mezcla de reacción de la PCR para la obtención de los patrones RAPDs	63
4.4.4 Análisis estadístico	65
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
5.1 Micropropagación <i>in vitro</i> de la orquídea <i>Laelia speciosa</i>	66
5.1.1 Germinación <i>in vitro</i>	66
5.1.1.1 Hinchamiento del embrión	66
5.1.1.2 Apertura de la testa	68
5.1.1.3 Protocormo con una hoja	69
5.1.1.4 Protocormo con dos hojas	70
5.1.1.5 Semillas germinadas y sin germinar	72
5.1.2 Multiplicación <i>in vitro</i>	73
5.1.3 Aclimatación.....	76
5.2 Pruebas de Crioconservación de la Orquídea <i>Laelia speciosa</i>	77
5.2.1 Encapsulación-Deshidratación.....	77
Curva de deshidratación estándar para dos concentraciones de sacarosa	77
Sobrevivencia en la técnica de encapsulación-deshidratación	79
Regeneración en la técnica de encapsulación-deshidratación.....	80
5.3.1 Vitricación	82
Sobrevivencia en la técnica de vitricación	82
Regeneración en la técnica de vitricación	83
5.3 Caracterización Molecular de <i>C. aurantiaca</i> y <i>L. speciosa</i>	85
5.3.1 Cuantificación de ADN	85
5.3.2 Verificación del gel de calidad	86
5.3.3 Análisis RAPD	87
VI. CONCLUSIONES.....	93
VII. LITERATURA CITADA.....	94

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Aditivos empleados en la germinación de semillas de <i>L. speciosa</i>	52
Cuadro 2. Reactivos utilizados en la preparación de los amortiguadores.....	60
Cuadro 3. Soluciones utilizadas para cargar y teñir geles de agarosa.....	62
Cuadro 4. Mezcla de reacción PCR para obtención de los patrones RAPDs.....	64
Cuadro 5. Programa térmico de PCR.....	65
Cuadro 6. Comparación de las proporciones en la etapa de hinchamiento (HE) del embrión de siete tratamientos y cinco fechas de evaluación durante el proceso de germinación de semillas de <i>L. speciosa</i>	67
Cuadro 7. Comparación de las proporciones en la etapa de apertura de la testa (AT) de siete tratamientos y cinco fechas de evaluación durante el proceso de germinación de semillas de <i>L. speciosa</i>	68
Cuadro 8. Comparación de las proporciones en la etapa de protocormo con una hoja (P1H) de siete tratamientos y cinco fechas de evaluación durante el proceso de germinación de semillas de <i>L. speciosa</i>	70
Cuadro 9. Comparación de las proporciones en la etapa de protocormo con dos hojas (P2H) de siete tratamientos y cinco fechas de evaluación durante el proceso de germinación de semillas de <i>L. speciosa</i>	71
Cuadro 10. Comparación de proporciones del total de la semilla germinada (G) y sin germinar (SG) de siete tratamientos en <i>L. speciosa</i>	72

Cuadro 11. Estadístico T de Kruskal-Wallis para efecto de tres tratamientos de multiplicación de <i>L. speciosa</i> para seis variables.....	74
Cuadro 12. Estadístico T de Kruskal-Wallis para efecto de cuatro tratamientos en la etapa de aclimatación de <i>L. speciosa</i> y seis variables.....	76
Cuadro 13. Comparación de proporciones de sobrevivencia en nueve tratamientos y tres etapas de la técnica de encapsulamiento-deshidratación de protocormos de <i>L. speciosa</i>	79
Cuadro 14. Comparación de proporciones de regeneración en nueve tratamientos y dos etapas de encapsulación-deshidratación de protocormos de <i>L. speciosa</i>	81
Cuadro 15. Comparación de proporciones de sobrevivencia en tres tratamientos y tres etapas de la técnica de vitrificación en protocormos de <i>L. speciosa</i>	82
Cuadro 16. Comparación de proporciones de regeneración en vitrificación de protocormos de <i>L. speciosa</i>	83
Cuadro 17. Valores obtenidos de absorbancia de cada muestra de ADN para <i>C. aurantiaca</i> y <i>L. speciosa</i>	84
Cuadro 18. Valores obtenidos de absorbancia de cada muestra de ADN para <i>L. speciosa</i>	85
Cuadro 19. Iniciadores empleados de la serie A (Operon Technologies inc. Alameda, California, USA), y sus secuencias.....	88
Cuadro 20. Número de bandas amplificadas con los iniciadores de las series A en <i>C. aurantica</i> y <i>L. speciosa</i>	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a) Semillas y b) Protocormos de orquídea <i>Laelia speciosa</i>	6
Figura 2. Planta de <i>L. speciosa</i> , mostrando cada una de sus estructuras.....	7
Figura 3. Flor de <i>Catleya aurantiaca</i>	10
Figura 4. Manejo <i>in vitro</i> de la orquídea <i>Laelia speciosa</i>	55
Figura 5. Protocolo de Encapsulación-deshidratación.....	57
Figura 6. Protocolo de Vitricación.....	59
Figura 7. Proceso de germinación de semillas de <i>L. speciosa</i>	70
Figura 8. Multiplicación <i>in vitro</i> de la orquídea <i>L. speciosa</i>	74
Figura 9. Aclimatación de plántulas de la orquídea <i>L. speciosa</i>	76
Figura 10. Curva de deshidratación estándar de capsulas.....	77
Figura 11. Técnica de encapsulamiento-deshidratación.....	81
Figura 12. Vitricación de protocormos de la orquídea <i>L. speciosa</i>	83
Figura 13. Gel de calidad de las 15 acepciones de <i>C. aurantiaca</i> y <i>L. speciosa</i>	86
Figura 14. Patrones RAPD obtenidos con los iniciadores OPA 10, OPA 3, OPA 2 y OPA 4.....	87
Figura 15. Dendrograma construido usando el coeficiente de similitud de Jaccard con los patrones de bandas RAPD de <i>C. aurantiaca</i> y <i>L. speciosa</i>	90

I. INTRODUCCIÓN

México es un país con grandes contrastes geográficos y gran diversidad de climas que determinan una flora muy diversa, siendo cuarto lugar en biodiversidad a nivel mundial y centro de origen de innumerables recursos bióticos. Una parte de esta diversidad son las orquídeas, cuya exotividad, reviste interés económico y son consideradas las ornamentales más codiciadas a nivel mundial (Ávila y Oyama, 2002). La amplia distribución del taxa hace que sea de los más vulnerables por la destrucción de sus hábitats. Dentro de las 35,000 especies de la familia, 1,106 se encuentran en nuestro país, de las cuales 44 % son endémicas (Téllez, 2005). A nivel mundial existe una gran problemática por la pérdida de recursos fitogenéticos, siendo los bancos de germoplasma una alternativa para el rescate y preservación de recursos. La crioconservación es la conservación de especies vegetales como complemento a las colecciones y bancos de germoplasma clásicos. Proceso que consiste en la preparación, mantenimiento y preservación a largo plazo del material vegetal, en condiciones de temperatura de -196 °C (nitrógeno líquido). Es un método rápido, sencillo, no altera la estabilidad genética y reduce sustancialmente el esfuerzo y costos que representa el mantenimiento de colecciones de germoplasma vegetal *in vivo*, así como el rescate de especies en peligro de extinción. Trabajos realizados por: Engelmann (1991) y (2000), Thammasiri (2000), Wood *et al.* (2000), Flachslund (2004), Ishikawa *et al.* Y (2004), Hirano *et al.* (2005), emplean técnicas para la crioconservación de orquídeas, de los cuales se han obtenido resultados satisfactorios. Debido a que *Laelia speciosa* es una especie que se encuentra en categoría de riesgo en la NOM-059-ECOL-2001, es por ello la necesidad de conservación de recursos endémicos de nuestro país.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Establecer las condiciones *in vitro* que permitan rescatar, multiplicar, preservar y caracterizar molecularmente a la orquídea *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr).

2.2. Objetivos particulares

1. Desarrollar un protocolo para el cultivo *in vitro* de la orquídea *Laelia speciosa*.
2. Emplear las técnicas de encapsulación-deshidratación y vitrificación para realizar pruebas de crioconservación de protocormos de orquídeas.
3. Caracterizar molecularmente a las orquídeas *Catleya aurantiaca* y *Laelia speciosa*, con la técnica de RAPDs.

2.3 Hipótesis

1. La evaluación de medios de cultivo *in vitro* nos permiten adaptar las condiciones ideales para el desarrollo de *Laelia speciosa*, debido a que se estandarizan las condiciones para su mejor desarrollo.
2. La técnica de encapsulación-deshidratación se presenta como la mejor alternativa para la conservación de germoplasma a largo plazo de la orquídea *Laelia speciosa*, por la mejor protección de los tejidos.
3. La técnica de RAPDs agrupar a las especies de acuerdo al género al cual pertenecen mediante un análisis de agrupamiento.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Generalidades de la familia Orquidaceae

3.1.1. Origen

El término orquídea se deriva del griego *Orchis* (testis), derivado de los tubérculos subterráneos de ciertas orquídeas silvestres nativas de la antigua Grecia. La familia *Orchidaceae*, son monocotiledóneas que comprenden entre 600 y 800 géneros con unas 35,000 especies. Están distribuidas en zonas tropicales y templadas de todo el mundo y se cuentan con más de 50,000 híbridos (Téllez, 2005).

La flora orquideológica de México comprende 1,106 especies y subespecies, distribuidas en 159 géneros. Una de sus características más sobresalientes es la alta proporción de especies endémicas aproximadamente 444 especies o subespecies (Soto y Arenas, 1996).

3.1.2. Importancia Económica

Las orquídeas constituyen un importante recurso para la creciente industria de flores en nuestro país. Holanda es el primer productor de orquídeas. Tailandia fue el primer país en desarrollar este cultivo y Malasia el país que actualmente posee la mayor superficie de producción; por otra parte Japón es el primer importador mundial de flores cortadas, y le sigue Europa, donde Italia ocupa el primer lugar (Téllez, 2005).

México exportó orquídeas a 16 países en el periodo de 1990-1999, Estados Unidos, Canadá, Alemania y Japón resultaron los compradores más consistentes. En el periodo

de 1994-1999 la cantidad de plantas exportadas disminuyó paulatinamente, por otro lado aumentado el volumen de flores exportadas; esto es bueno pues se esta dejando de exportar germoplasma para exportar solamente flores (Cruz *et al.*, 2003).

3.1.3. Taxonomía y morfología

Son plantas herbáceas, perennes, terrestres o epífitas y hasta subterráneas; es un grupo único de plantas, bastante diferentes vegetativamente, pero se agrupan de acuerdo con sus características florales (Larson, 1982). Existen dos grupos de orquídeas de acuerdo al hábito de crecimiento: monopoidales, tienen un crecimiento vertical y presentan raíces aéreas para poder detenerse (Lecoufle, 1999); y simpoidales, tienen un desarrollo horizontal, presentan rizomas y pseudobulbos que producen rizomas (Caneva, 1991).

Raíz: Son en un principio cilíndricas y luego se aplanan; su epidermis está constituida por una sola capa de células, cubre el velamen, formado por seis o doce capas de células alargadas en sentido radial, con espacios aéreos (León, 1987).

Tallo: Puede ser un rizoma, tubérculo, pseudobulbo, o cormo; pueden ser erguidos, postrados o trepadores (Tapia, 1985).

Hojas: Son en la mayoría de las especies gruesas, pero hay delgadas y presentan una estructura de protección contra pérdidas de agua (Bechtel, 1981).

Flor: Tiene un modelo estructural único y puede haber desde las grandes de varios centímetros, hasta las que miden milímetros. Pueden ser solitarias o en inflorescencias

como racimos, espigas, panojas, y por su ubicación, terminales o axilares (Alderete, 1988). El cáliz está compuesto de tres sépalos coloreados. La corola la componen tres pétalos internos, dos de ellos laterales y simétricos y uno posterior de forma variable, llamado labelo, que puede ser entero o lobulado, dentado o espoloneado (Caneva, 1991). El androceo y el gineceo están unidos y forman una columna, en cuyo ápice se localiza la antera con la polinia, estructura donde se aglutina el polen. Por debajo de la antera se encuentra el estigma donde se deposita la polinia durante la polinización. El ovario es ínfero, trícarpelar, trilocular, multiovulado y de placentación parietal (Arditti, 1992).

Semillas: Son extremadamente livianas y se producen en grandes cantidades (Figura 1a). La mayoría están en un rango de 0.05 a 6 mm de largo, con diámetro de 0.01 – 0.9 mm. Se sabe que el peso de las semillas está en el rango de 0.31–24 µg. El número de semillas registrado por fruto oscila desde 20 hasta 4 millones. La testa es usualmente transparente, con las células de las testas lisas o reticuladas (Arditti y Ghani, 2000). Los embriones son mucho más pequeños que la testa, por lo que el volumen de la semilla puede estar ocupado hasta un 96 % por aire (Arditti, 1992). Se calcula que en la naturaleza sólo germina el 5 %, formando protocormos (Figura 1b) (Arditti, 1982).

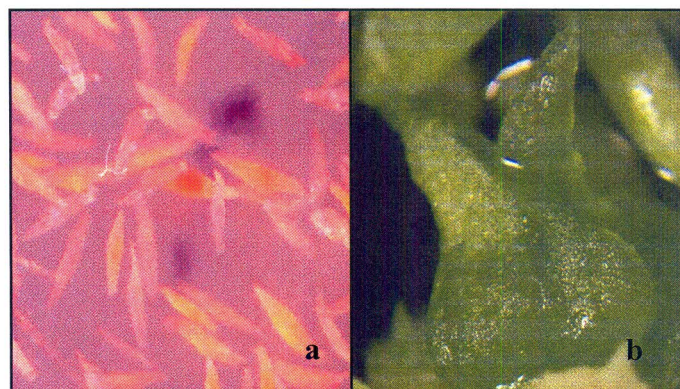


Figura 1.a) Semillas y b) Protocormos de orquídea *Laelia speciosa*

Las orquídeas prácticamente se encuentran en cualquier lugar del mundo; en selvas pluviales tropicales, sabanas, y estepas, así como en las tierras bajas calurosas y regiones montañosas frías de hasta 5,000 m de altitud, pero la mayoría se concentran en zonas tropicales y subtropicales del Oriente Asiático, además de Centroamérica y Sudamérica. En la actualidad hay mas de 35,000 especies silvestres (Röllke, 2002).

3.1.4. *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr.

Es una hierba epífita que produce flores grandes de 10 a 16 cm de diámetro. Se le considera como una de las especies más bellas del género y quizá una de las más notables de las orquídeas como se muestra en la Figura 2. Hay una infinita variedad floral poco conocida, tanto en su tamaño, como en su forma, textura y ante todo en su colorido. El diseño del labelo es tan variable como las huellas digitales y por tanto se puede decir que cada flor es diferente y única. Las flores blancas son raras, pero si se conoce un buen número de ellas y muy hermosas (Ávila, 1996).

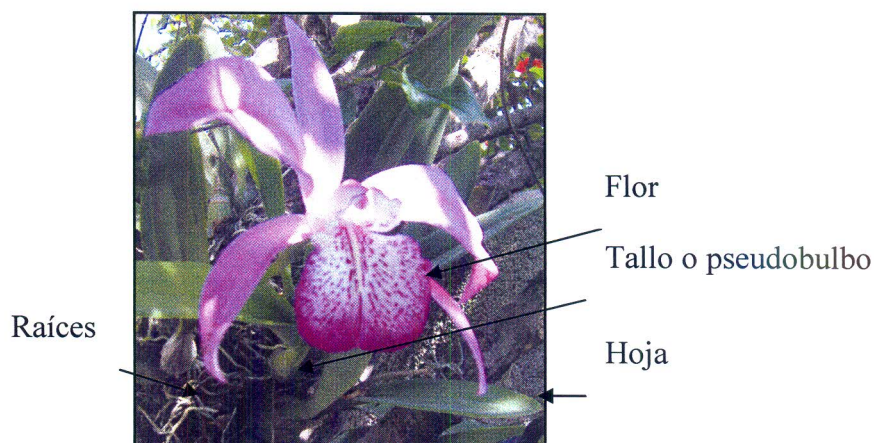


Figura 2. Planta de *L. speciosa*, mostrando cada una de sus estructuras.

Se desarrolla en condiciones soleadas, frías y secas. Se localiza en los estados de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas (Halbinger y Soto, 1997).

Es una planta epífita, simpoidal, que mide entre 18 a 20 cm. Las hojas miden entre 13 a 15 cm, son rígidas. Los pseudobulbos de unos 6 a 30 cm de longitud, son ovoides, y están claramente separados. Cada pseudobulbo desarrolla una o dos hojas céreas y aspecto de cuero de unos 20 cm de longitud. La inflorescencia es en racimo y puede tener una longitud de 30 cm y llevar ocho flores, las cuales son rosas ó púrpuras con un labelo púrpura (Halbinger y Soto, 1997).

Florece en primavera u otoño. Los miembros de este género son fácilmente cultivados y son resistentes a las sequías. El cultivo de cada especie requiere condiciones específicas que corresponden con las de su hábitat natural. Muchas de ellas se pueden situar en placas, por lo que sus raíces pueden recibir corrientes de aire y aguantar ciclos de humedad ó sequía (Halbinger y Soto, 1997).

En México se conocen más de 1,200 especies de orquídeas (Hágsater *et al.*, 2005), de las cuales 181 se registran en alguna categoría de riesgo en la Norma Oficial vigente (NOM-059-ECOL-2001); 72 son endémicas, 58 en categoría de amenazadas, 107 requieren protección especial (*Laelia speciosa*), 15 en peligro de extinción y una extinta en la naturaleza (*Laelia gouldiana*) (Diario Oficial de la Federación, 2001).

3.1.5 *Cattleya aurantiaca* (Batem.) Lindl

La Familia Orchidaceae se divide en seis Subfamilias, donde una de las más importantes es la Epidendroideae por ser la más evolucionada y además comprende al 90 % de las especies de las orquídeas americanas. Dentro de Epidendroideae existen varias tribus y subtribus, una de las cuales es la Subtribu *Laeliinae*, que incluye el género *Cattleya* (García, 1995).

El género *cattleya* es originario de las alturas medias de América Central y Sur América. En el mundo se encuentran cerca de 65 especies diferentes (Kuan y González, 1993). Las especies de este género se han dividido en dos grupos: las *Cattleyas* labiadas o unifoliadas, que tienen una sola hoja que sale del ápice del pseudobulbo, sus flores son grandes y pétalos anchos y vistosos. Normalmente producen dos o tres flores, que se mantienen por 1 a 4 semanas, ocurriendo un máximo de dos floraciones al año. Las especies más representativas de este tipo son *C.mossaie*, *C. aurantica* (Figura 3), *C. trianaei*, *C. dowiana*, *C. gaskelliana*, *C. lawranceana*, *C. lueddmanniana*, *C. mendellii*, *C. percivaliana*, *C. schroederae*, *C. warnerii*, *C. warscewiczii*, *C. luteola*, *C. maxima* (Horich, 1980).



Figura 3. Flor de *Catleya aurantiaca*.

El otro grupo es el de las bifoliadas, porque tienen dos y algunas veces tres hojas, muy diferentes al tipo labiata (Horich, 1980). Tiene flores pequeñas (en racimos de veinte o más flores) pero frecuentemente de color más intenso y variado que las unifoliadas, además de tener mejor textura. Dentro de este grupo se puede encontrar entre otros a *C. bicolor* y *C. skinneri*. Los híbridos entre estos dos grupos han producido flores donde se combinan las mejores características de ambas (Kuan y González, 1993).

La mayoría de este grupo crece como epífitas en el lindero de los bosques o en la copa de los árboles, donde reciben luz fuerte pero indirecta (Kuan y González, 1993). Son plantas perennes con rizoma corto cubierto por brácteas apegaminadas y caducas. Las raíces son cilíndricas, verdes al inicio formando un velamen de varias capas, grisáceo o blanco verdoso en la madurez. Los pseudobulbos son redondeados, cilíndricos o fusiformes, cubiertos por brácteas papiráceas basales caducas, los cuales constituyen una defensa contra la sequía periódica. Las hojas pueden ser lanceoladas o elípticas, obtusas, coriáceas o carnosas, lisas, sésiles (Rodríguez *et al.*, 1986).

En el caso de cattleyas con inflorescencia, ésta es terminal, racimosa, subtendida por una bráctea espatácea, generalmente con pocas flores, grandes y llamativas, resupinadas. Las flores poseen un ovario pedicelado y cilíndrico. Los sépalos son iguales, libres, patentes o ligeramente reflexos. Los pétalos son semejantes a los sépalos aunque generalmente más anchos. El labelo es sésil, simple o trilobulado. Los lóbulos laterales envuelven la columna. En algunas especies los lóbulos laterales y el medio son totalmente diferentes, en otras son continuos. La columna es fuerte, cilíndrica o subclaviforme, ligeramente arqueada, terminada en tres dientes. La antera es terminal, incumbente, operculada de

dos celdas, cada una de ellas divididas por un septo longitudinal. Los polinios son cuatro, céreos, elíptico-ovados, paralelos y ligeramente comprimidos, con caudículas prominentes. El estigma es entero (Rodríguez *et al.*, 1986). Para florecer necesitan luz abundante, pero no directa. La luz acelera el proceso de crecimiento de la planta para la floración (Horich, 1980). Toleran climas calientes si se les da la adecuada ventilación y humedad. La temperatura perfecta es entre 65 y 75° F (Horich, 1980) y la humedad relativa de 50 % y 80 % es ideal (American Orchid Society, 1995).

3.1.6 Problemática en la familia Orquidaceae

La familia Orchidaceae es uno de los taxa más vulnerables debido a la destrucción y transformación de sus hábitats, aunado a ello existe una gran cantidad de extracción masiva de plantas silvestres, debido a su alto valor comercial (Ávila y Oyama, 2002).

Cada año se venden plantas o segmentos de éstas en las carreteras y en los mercados del sur y centro de México (Hernández, 1992). Se considera que el número de flores con uno o dos pseudobulbos, vendido en la Ciudad de México es del orden de miles, a cientos de miles, cada temporada; en la época de máxima floración se estima que se venden alrededor de 1,500 flores diarias. En el estado de Michoacán se calcula que se extraen alrededor de 6,000 plantas o segmentos de éstas al año, las cuales generalmente están destinadas a morir. La extracción de flores ha traído severas consecuencias en la producción de semillas de las poblaciones silvestres, e incluso, en algunos sitios las poblaciones están declinando porque el reclutamiento de nuevos individuos es nulo (Ávila, y Oyama, 2002).

3.1.7 Germinación de semillas

Las semillas de orquídeas son minúsculas y contienen pocas reservas de alimento. Usualmente estas semillas no germinan en medio naturales a menos que sean infectadas por una micorriza, la misma que abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente grandes para fabricar su propio alimento. Cuando la semilla germina produce una masa indiferenciada de células llamada protocormo (Figura 1b). Los protocormos de las orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que posibilita producir parte de su alimento (Sheena, 2000).

La germinación se define como el momento en que la radícula rompe la testa; en cambio, los analistas de semillas que se rigen por las Normas Internacionales de la ISTA, la definen como el momento en que las plántulas surgidas de las semillas están completas y se puede apreciar la integridad de sus estructuras. Desde el punto de vista agronómico se considera que la germinación termina cuando las plántulas normales se han desarrollado lo suficiente para emerger del terreno (Moreno, 1996).

Hay dos tipos básicos de germinación *in vitro*: simbiótica y no simbiótica (Sheena, 2000). En la germinación simbiótica, las semillas se siembran con una pequeña porción del hongo micorriza apropiada. El hongo crece en el medio, coloniza a las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que se espera alimente al protocormo hasta que éste produzca hojas y se vuelva autotrófico. Esta técnica es usada para la propagación de orquídeas en zonas templadas. Tiene la ventaja de usar un medio simple, y las plantas micorrizales suelen ser más fuertes y resistentes a infecciones que sus contrapartes cultivadas asimbióticamente (Sheena, 2000).

La germinación asimbiótica es usualmente usada en la propagación de orquídeas tropicales, las mismas que tienden a crecer fácilmente en comparación con sus parientes en zonas templadas. El medio usado para la germinación asimbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada pues no existe la intermediación del hongo (Sheena, 2000).

El cultivo de tejidos *in vitro* ha revolucionado la propagación vegetativa de las orquídeas, esta técnica tiene la ventaja de producir miles de plantas en lapsos más cortos, permite seleccionar aquellos materiales vegetales libres de enfermedades; además, se tiene una mayor uniformidad y da posibilidad de una rápida multiplicación de un genotipo importante (Pierik, 1990).

La germinación de las semillas tiene lugar de la siguiente forma: el embrión absorbe agua a través de la testa aumentando de volumen. Después se inicia la división celular, el embrión rompe la cubierta seminal. Posteriormente se forma una estructura de tipo protocormo, a partir del agregado de células y sobre aquél puede distinguirse un meristemo del vástago. Tan pronto se inicia la división de órganos, comienza un periodo de crecimiento intenso. Con la presencia de luz el protocormo adquiere un color verde y se desarrollan hojas. Las raíces auténticas se desarrollan de forma endógena y los rizoides pierden función y desaparecen (Pierik, 1990).

3.1.8 Métodos de propagación *in vitro*

A partir de la obtención de los cuerpos protocórmicos (PLBs, protocorm like bodies) que tienen mucha semejanza (formación de rizoides, formación espontánea o inducida de protocormos) a los que se forman después de la germinación de las semillas, se produjo una revolución en la propagación de las orquídeas, ya que a veces este protocormo se divide en forma espontánea, pero ésto generalmente se consigue dividiéndolo en porciones, de ésta forma se produjeron millares de plantas, a partir de un explante, esto es posible dado que el protocormo se encuentra a la mitad de desarrollo (Sheena, 2000).

Por medio del cultivo de un punto de crecimiento se disecta de la planta y se cultiva en un medio estéril especial, se forma una masa de proliferación de tejido y se desarrollan pequeños protocormos. Antes de que se desarrolle el tallo, el protocormo se corta en secciones que son transplantadas a un nuevo medio con intervalos mensuales y por medio de una selección consecutiva se prosigue este proceso de multiplicación. Cuando un protocormo se deja de cortar, forma plántulas (Hartmann y Kester, 1971).

Se puede sembrar semillas a partir de cápsulas verdes o a partir de semillas secas (Shenna, 2000). Siembra a partir de cápsulas verdes. El interior de las cápsulas de orquídeas se mantiene estéril si las cápsulas están intactas. La ventaja de este método es que no se requiere de la esterilización de las semillas. Además, algunas semillas tomadas de cápsulas casi maduras podrían germinar más rápido que las provenientes de cápsulas maduras a causa de los mecanismos de dormancia. Siembra a partir de semillas secas. Una vez que la cápsula es abierta, las semillas dejan de ser estériles y requieren de un proceso de esterilización. Comúnmente, se utiliza una solución de hipoclorito de sodio.

Las semillas se agitan dentro de la solución, luego se enjuagan con agua destilada y se siembran en el medio preparado.

3.1.9 Medios de cultivo *in vitro*

Esencialmente, los medios de cultivo comparten aproximadamente los mismos elementos, sólo que en diferentes proporciones según las necesidades de la especie. Estos componentes son: sacarosa, macroelementos, microelementos, vitaminas, agar, aminoácidos y reguladores de crecimiento (Pierik, 1990).

El medio debe tener consistencia dura, ya que las semillas deben sembrarse sobre el medio y no dentro de éste ya que se puede presentar deficiencia de oxígeno. Las semillas de la mayoría de las especies germinan mejor a un pH de 4.5, recomendándose un rango 4.8-5.8 (Arditti, 1972). Según investigaciones recientes, el mejor medio para la germinación de semillas de orquídeas *in vitro* es Murashige y Skoog (1962) pues al compararlo con el Knudson (1925) y Vacin y Went (1993), presenta el menor número de días para que las semillas se tornen verdes y con mayor peso seco (Zeigler, 1967).

Actualmente se utilizan algunos reguladores de crecimiento para estimular el desarrollo de PLBs como son los siguientes; ANA $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + BA $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Serrano, 2004), extracto de malta ($500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) + kinetina ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), caseína hidrolizada ($500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) + kinetina ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), sulfato de adenina ($160 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) + BA ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), 2,4-D ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), 2,4-D ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), BA ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), sulfato de adenina ($80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) + BA ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) (Aguilar, 2006).

Luz: Es el principal factor que determina la calidad de las plántulas, ya que propiciará la fotosíntesis y el crecimiento. Se recomienda usar de 12 a 16 horas de fotoperíodo, en tubos fluorescentes a una intensidad de 1290 lux (Pierik, 1990).

Temperatura: La temperatura óptima para la germinación de la mayoría de las orquídeas está entre 20 y 25 °C. Aunque algunas especies requieren de frío durante varios periodos, antes o después de ser germinadas (Pierik, 1990).

3.2 Semilla sintética o artificial

La idea de producir semillas sintéticas o artificiales, surge del fenómeno de embriogénesis somática, descrito por primera vez por Reinert y Steward (1958). Sin embargo, un gran propulsor de su utilización para la propagación a gran escala de plantas fue Murashige (1925), quien en un simposio realizado en 1977 en Ghent (Bélgica), presentó formalmente la idea de la producción de las semillas sintéticas, entendiendo como tal a un simple embrión somático encapsulado. Esta semilla se diferencia de la semilla verdadera en que el embrión es somático (producido por el fenómeno conocido como embriogénesis somática) y no cigótico, y que si tiene endospermo y cubierta, éstos son artificiales. Esta semilla, puesta en condiciones adecuadas, germina y se convierte en una planta (Rey y Mroginski, 2004).

Una semilla sintética o artificial debe considerarse aquella en donde se tenga a un embrión somático encapsulado en estado de latencia, preferentemente con un bajo contenido de humedad, con un endospermo artificial que contenga reservas nutritivas, sustancias e incluso microorganismos que aseguren su liberación y manejo tecnológico

adecuado en invernadero o en campo. Sakamoto *et al.* (1994) menciona que las semillas sintéticas son definidas como embriones somáticos encapsulados, los cuales funcionan similarmente a las semillas y pueden desarrollarse bajo condiciones estériles.

El requerimiento más importante para que una semilla artificial pueda ser usada en la propagación clonal masiva de plantas es la alta conversión, además de presentar sincronización en la maduración y uniformidad bajo practicas de siembra en charolas o semilleros, en invernadero o en campo (Sakamoto *et al.*, 1994).

3.2.1 Tipos de semillas sintéticas

Las semillas sintéticas pueden fabricarse de diferentes maneras. Básicamente pueden utilizarse embriones hidratados, tal como resultan del proceso de embriogénesis somática, o bien, pueden ser desecados. En algunos casos, estos embriones están protegidos por cubiertas protectoras (Rey y Mroginski, 2004). De esta manera se pueden distinguir cinco tipos básicos de semillas sintéticas:

- 1) Semillas sintéticas con embriones desecados sin cubierta.** Se trata de un sistema muy simple donde los embriones son desecados hasta alcanzar porcentajes de humedad del 8 al 20 % y no están provistos de ningún tipo de cubierta protectora.
- 2) Semillas sintéticas con embriones somáticos desecados y provistos de cubierta protectora.** Se utilizan embriones recubiertos con polyoxietileno y luego desecados.
- 3) Semillas sintéticas con embriones hidratados sin cubierta.** Consiste en la utilización de los embriones somáticos tal como resultan del proceso de embriogénesis somática, sin ningún tipo de cubierta protectora.

4) Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados suspendidos en un gel.

Consiste en la inclusión de varios embriones en un tubo que contiene un gel viscoso.

5) Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados y provistos de una cubierta protectora. Es el sistema más usado. Los embriones no están sujetos a la desecación, que constituye la principal causa de los bajos valores de conversión en plantas. Una de las técnicas más utilizadas consiste en lograr la formación de una cubierta protectora de alginato de calcio, compuesto que no es tóxico para el embrión y permite una rápida encapsulación. El proceso es muy simple y consiste básicamente en sumergir a los embriones somáticos en una solución de alginato de sodio al 3 %, pasándolos luego a una solución acomplejante de 0.1 M de CaCl_2 .

3.2.2 Producción de semillas sintéticas

Se han desarrollado dos sistemas para la obtención de semillas sintéticas (Saiprasad, 2001), que son los siguientes;

a) Sistema hidratado (encapsulamiento)

- Establecimiento de embriogénesis somática
- Maduración de la embriogénesis somática
- Producción masiva de embriones somáticos
- Estandarización de la encapsulación
- Estandarización del endospermo artificial
- Producción masiva de la semilla sintética
- Establecimiento en invernadero y campo

b) Dsecación

- Promoción de desarrollo de embriones somáticos en un medio con alta osmolabilidad.
- Deshidratación gradual de embriones somáticos
- Cultivo posterior después de la deshidratación para adquirir foto-autotropismo natural y los materiales de reserva.

3.2.3 Calidad de la semilla sintética

Otro aspecto de gran importancia tecnológica es el contar con semillas sintéticas que, además de no generar variantes somaclonales, tengan un alto porcentaje de conversión en plantas cuando éstas son sembradas en el suelo. Este aspecto se ve afectado por varios factores, entre los que figuran el tipo de embrión, la calidad del endospermo sintético, la dureza de la cápsula y la protección contra agentes patógenos. Generalmente, la carencia de embriones de calidad es el factor limitante para la producción de semillas sintéticas. Los mismos deben poder generarse rápidamente, en grandes cantidades, sin fusionarse entre sí, ni formar callos. Deben desarrollarse de manera sincronizada y convertirse rápidamente en plantas. Es altamente deseable que conserven su viabilidad por largo tiempo en condiciones de laboratorio o preservados en refrigeradores comerciales (Rey y Mroginski, 2004). El endospermo sintético tiene que proteger y nutrir al embrión hasta que germine y pueda crecer autotróficamente y generalmente está compuesto de los mismos medios de cultivo que se usan para inducir la germinación *in vitro* de los embriones. Estos medios contienen macro y micronutrientes, vitaminas, sacarosa y sustancias reguladoras de crecimiento (Rey y Mroginski, 2004).

3.2.4 Encapsulación con alginato

El alginato es una cadena linear, hidrofílica. El principio del proceso de encapsulamiento es que las gotas de alginato de sodio conteniendo los embriones somáticos, cuando son puestos en una solución de CaCl_2 , se forman gotas redondas y firmes, esto se debe al intercambio de iones entre el Na^+ en alginato de sodio con Ca^{2+} en la solución de CaCl_2 . La dureza o rigidez de la cápsula depende principalmente del número de iones de sodio intercambiados con los de calcio. En general, 3 % de alginato de sodio en CaCl_2 , ha dado dichas características para la producción de semillas sintéticas (Saiprasad y Polisetty 2003). El tamaño y forma de las cápsulas se controla con el diámetro de la punta de una pipeta y las concentraciones de los reactivos. Posteriormente, el embrión encapsulado se coloca en un medio de conversión (germinación), para obtener una plántula (Instituto Politécnico Nacional, 1997).

Las concentraciones tanto de alginato como de cloruro son importantes, ya que de acuerdo con Sitakama y Pradeep (2000), altas concentraciones de alginato 6-8 % no son convenientes porque las gotas se endurecen tanto como para causar retraso en la germinación, mientras que gotas formadas usan bajas concentraciones (2 %), son muy frágiles al momento de ser manejadas. En cuanto al CaCl_2 , bajas concentraciones (25-50 mM) afecta la calidad de la cápsula.

La concentración adecuada tanto para el alginato de sodio como para el cloruro de calcio, así como el tiempo requerido para endurecer las cápsulas, varía dependiendo de la especie, células, tejido u órgano utilizado (Piccioni y Standardi, 1995).

3.2.5 Antecedentes en la encapsulación de orquídeas

Existen avances favorables en la encapsulación de PLBs en *Spathoglottis alicata*, *Dendrobium spp.*, *Phaius torkenvillae*, *Geodorum densiflorum*, se ha encontrado una buena forma de manejar y almacenar PLBs, en esta última orquídea, la cual se trata de una especie en peligro de extinción. En *Geodorum sp.*, 30 días después de la germinación, los PLBs fueron puestos en el medio Knudson C, en una solución de alginato al 4 % endureciendo las gotas en una solución de 50 mM de CaCl_2 , por un tiempo de 15 a 20 min. En *Dendrobium* “Sonia” las mejores encapsulaciones de los PLBs fueron en 3 % de alginato de sodio en 75 mM de CaCl_2 (Data *et al.*, 1999; Saipraisad y Polisetty, 2003).

Los PLBs encapsulados de la orquídea *Geodorum* contienen el medio Knudson C, suplementado con agua de coco (15 %), peptona ($2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), BAP ($2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y ANA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), mostraron inducción al crecimiento después de dos semanas. Subsecuentemente, los PLBs emergieron rompiendo la matriz de alginato, estableciendo contacto con el medio de cultivo, es decir un subcultivo en el mismo medio y después de 6 a 8 semanas se obtuvieron plántulas; en este estado se tuvo un 80 % de germinación. Estas semillas fueron almacenadas a una temperatura de 4 °C, en cajas petri, reduciendo su porcentaje de viabilidad conforme se mantienen más tiempo en almacenaje; en 180 días presentaron un porcentaje de conversión del 70 % (Data *et al.*, 1999).

La orquídea *Dendronium* “Sonia” en una matriz de encapsulamiento preparada con medio MS (1/3) suplementado con $0.44 \mu\text{M}$ de BA y $0.54 \mu\text{M}$ de ANA, dio 100 % de reconversión de PLBs a plantas después de haber sido almacenadas. Una viabilidad

mayor de 85 % de los PLBs encapsulados se puede llegar a observar a 75 días en 4 °C en PLBs encapsulados de *Dendrobium*, *Oncidium*, y *Catleya* a 4 °C llegar a mostrar un 88 % de germinación después de 75, 60 y 30 días, respectivamente. Todas las plantas sobreviven agregando al medio porciones de carbón de madera o porciones de ladrillo (Saiprasad y Polisetty, 2000). Serrano (2004) encapsuló PLBs de *Phalaenopsis* sp., con alginato de sodio a 3 % y utiliza cloruro de calcio a 75 mM ($11 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) en un tiempo de 10 a 15 minutos. La capacidad de conversión y un tamaño compacto de las unidades encapsuladas dan como resultado una planta bajo condiciones no estériles (Mamiya y Sakamoto, 2001), por lo que sugieren realizar un tratamiento de pre-encapsulamiento, agregando AIA ($28.5 \mu\text{M}$) en medio MS con 3 % de sacarosa durante una semana.

3.3 Conservación de recursos

3.3.1 Conservación *in situ* y *ex situ*

El desarrollo urbano, agrícola e industrial, ha producido alteraciones en el entorno, lo cual ha repercutido en la reducción de las áreas de bosques en los últimos cuarenta años, por lo que es importante plantear nuevos paradigmas en educación, conservación, rescate, reproducción y uso sostenible de las orquídeas (García, 2000).

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 el mejoramiento genético, la industria alimenticia, farmacéutica, maderera, etc., permitiendo la conservación de especies vulnerables a procesos de erosión genética. La conservación *ex situ* se refiere al mantenimiento de los organismos fuera de su hábitat natural, conservando especies

amenazadas y recursos genéticos en bancos de semillas, bancos genéticos *in vitro*, bancos de genes, colecciones de campo y jardines botánicos (Seguel, 2001).

Existen variadas estrategias de conservación de recursos fitogenéticos, las cuales dependerán del tipo de germoplasma y de los objetivos de la misma. 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 y Baena, 2000).

Existen sistemas de conservación *ex situ* en donde la finalidad es preservar organismos en un medio distinto a aquel en el cual evolucionaron. Una parte esencial en sistemas de conservación de germoplasma *ex situ*, como los bancos de semillas o almacenamiento a largo plazo, 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 las mismas. 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 *et al.*, 2006).

3.3.2 Conservación *in vitro*

Otro sistema *ex situ* se realiza por medio del cultivo de tejidos vegetales, el cual se basa en la totipotencialidad celular para la obtención de plantas completas. Con estas metodologías se pueden controlar relativamente los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos de los tejidos. El mantenimiento de células, tejidos u órganos

ocurre *in vitro*, el explante desarrollara las distintas partes de la planta hasta obtener un individuo completo. Cada cierto tiempo hay que tomar un nuevo explante y repetir el proceso, lo que genera una técnica que requiere trabajo continuo, además de ser un método caro que debe optimizarse para cada especie (Santos *et al.*, 2006).

Al elegir el procedimiento se debe tener siempre presente la especie de que procede, su ciclo ontogénico, la parte utilizada de la planta (semillas, tejidos, células o protoplastos), su estado vegetativo y su futuro destino: cultivo y el tiempo que el material vegetal tiene que permanecer conservado (Santos *et al.*, 2006).

En el almacenamiento del material vegetal, normalmente se usan los siguientes posibles procedimientos:

Crecimiento lento: es ampliamente aplicable, puede ser usado en tallos organizados.

Consiste en la depresión de metabolitos por medios físicos o químicos.

Interrupción del crecimiento por medio de criopreservación: su mayor éxito se alcanza en cultivos celulares y de meristemo de tallo. Consiste en la preservación del material vegetal por congelación.

Dsecación por el frío (liofilización), este método se usa excepcionalmente, particularmente al polen, y es más amplia su aplicación en microbiología.

Con respecto al uso del cultivo *in vitro* como técnica de conservación, la posibilidad de que se genere variación somaclonal, es decir, alteraciones genéticas de los materiales conservados *in vitro* en relación a la planta madre, situación no deseada desde el punto de vista de la conservación de germoplasma. Algunas de estas variaciones son heredables mientras que otras son epigenéticas, de los tipos reversibles y no hereditarios.

La variación somaclonal puede ser atribuida a diversos factores como los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento, el tipo de explante y el número de subcultivos. Por lo tanto, es importante manejar los factores que inducen variación somaclonal y evaluar posibles alteraciones, utilizando análisis citológicos y/o moleculares en los materiales conservados *in vitro* (Seguel, 2001).

3.3.3 Principales problemas de la conservación de recursos

Existe una infraestructura mínima adecuada para la conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos, es decir, bancos de germoplasma de semilla, y en algunos la infraestructura para la mantención de colecciones *in vitro*. El problema común es la falta de recursos para desarrollar actividades propias de mantenimiento de las colecciones, situación que conduce a que los bancos de germoplasma sean solamente depósitos de semillas (Seguel, 2001).

3.4 Conservación a largo plazo

La conservación de germoplasma comienza a ser una herramienta de gran utilidad para la conservación de recursos fitogenéticos. Las técnicas basadas en el cultivo *in vitro* se están haciendo imprescindibles para la conservación *ex situ*. Más de cuarenta géneros y sesenta especies de plantas leñosas han sido objeto de intensos estudios para lograr protocolos viables de crioconservación. El paso más crítico para lograr un protocolo viable es reducir el contenido de humedad del material a conservar evitando así la formación de cristales de hielo (Toribio *et al.*, 2000).

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 membranas de las células (Villalobos y Engelman, 1995).

En plantas, la posibilidad de crioconservar desde células hasta órganos ha sido demostrada ampliamente, al igual que su utilidad para la conservación de germoplasma y de material generado en condiciones de laboratorio (McLellen y Day, 1995; Abdelnour, 1996). A partir de que se reportan las primeras investigaciones en crioconservación de tejidos vegetales resistentes a las bajas temperaturas, se han desarrollado y aplicado estas técnicas a otras especies vegetales. El almacenamiento en nitrógeno líquido es utilizado para conservar diferentes materiales, con características específicas, como puede ser, suspensión de células, protoplastos, callos, polen, embriones, ápices, y para el caso de orquídeas semillas o protocormos (Engelmann, 1991; Sangran-Norreel *et al.*, 1991; Takagi, 2000). No obstante los recientes progresos en los estudios de criobiología de material vegetal, la crioconservación de plantas no tolerantes al frío, en especial las tropicales, ha sido menos investigada a causa de la sensibilidad a las bajas temperaturas y a la desecación (Takai, 2000).

La obtención de un protocolo ideal para criopreservar es dependiente del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la célula o el tejido, puesto que este proceso está afectado por diferentes variables como especie, tipo y estadio de la célula a congelar.

Las células tienen diferentes tamaños y manejan diferente composición de solutos, y el éxito de la criopreservación está correlacionado con la complejidad de los sistemas biológicos congelados (Ávila, 2006).

La crioconservación es considerada un método alternativo para la conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos. Los resultados obtenidos en este campo han demostrado su disponibilidad y aplicación a muchas otras especies (Niino *et al.*, 1998). Esta técnica es práctica y asegura el requerimiento de espacios pequeños, en donde el material almacenado queda protegido de la contaminación y las necesidades de mantenimiento son muy pocas, representando una opción de almacenamiento a largo plazo y costos bajos (Rao, 2004).

3.4.2 Principios básicos de la crioconservación

El método de congelación, la deshidratación y la utilización de sustancias crioprotectoras, son los recursos existentes para reducir al máximo los daños que se producen en la célula durante el proceso de congelación. Al formarse el hielo causa por sí mismo daños celulares, estos se agravan debido a que se produce el fenómeno de recristalización, que consiste en que los cristales de hielo se forman en el interior de la célula y durante el proceso de congelación se derriten y vuelven a formarse dando lugar a estructuras termodinámicamente más estables, es decir, cristales más grandes con un efecto sumamente dañino que provoca una extensa destrucción de estructuras protoplasmáticas y la lisis celular (Westendorp y Encina, 2004).

El agua se congela a 0 °C y existe en ellas un núcleo para la cristalización (partículas de polvo, macromoléculas o la misma pared del contenedor) conocido por los criobiólogos como núcleo heterogéneo (Meryman y Williams, 1985). En ausencia de este núcleo, el agua puede ser sub-enfriada a -40 °C, temperatura que es conocida como temperatura de nucleación homogénea de hielo, esto se refiere al proceso en que, por debajo de los 40 °C, todo el agua existente en el tejido se convierte en hielo. A temperaturas más bajas de -40 °C, ocurren agrupaciones de moléculas de agua, formando cristales de hielo expandiéndose por todo el material biológico. Cuando el agua se convierte en hielo (nucleación) se presentan eventos exotérmicos (desprendimiento de calor en forma desordenada) los cuales liberan energía como calor latente de fusión (Meryman y Williams, 1985).

En el sistema de congelación lenta, el hielo comienza a formarse desde el exterior hacia el interior de la célula. El agua sale hacia el exterior del citoplasma y la vacuola, provocando una diferencia de potencial osmótico que causa un aumento de concentración del soluto en el interior celular, y esto va en detrimento de la posibilidad de supervivencia de la célula. En el caso del sistema de congelación rápida ocurre lo contrario: se forma hielo desde el interior celular al exterior. El agua entra y la diferencia de potencial osmótico provocada es menor que en el método lento, por lo que los daños celulares debido a una alta concentración de solutos no son tan críticos y los daños por el hielo persisten (Westendorp y Encina, 2004).

Cuando la temperatura no es tan baja como para que se forme hielo en el tejido, tiene lugar el llamado daño por enfriamiento, relacionado con el hecho de que los fluidos

celulares de la plantas pueden mantenerse en estado líquido a temperaturas inferiores al punto de congelación, fenómeno conocido como sobreenfriamiento. Los daños por enfriamiento incluyen lesiones generalizadas en las membranas celulares, producidas porque los lípidos que las componen sufren una transición de fase y pasan del estado de líquido cristalino, que es el fisiológico, al de sólido cristalino o gel. Las alteraciones en las membranas van acompañadas por considerables cambios en su permeabilidad. También se dañan las mitocondrias y compartimientos intracelulares en los que ocurre la respiración (Westendorp y Encina, 2004).

A temperaturas muy bajas, se forma hielo en los líquidos intra o extracelular y se produce el llamado daño por congelamiento. La formación de hielo intracelular es casi siempre letal, presumiblemente porque los cristales de hielo lesionan las membranas internas de las células; el fenómeno, sin embargo, es poco frecuente, ya que requiere descensos bruscos de la temperatura, que pocas veces acontecen en la naturaleza. Generalmente, la aparición de hielo ocurre en las soluciones acuosas del espacio extracelular, en las cuales el hielo formado no incluye las sales, que permanecen en el agua no congelada, con el consiguiente aumento de su concentración en ella; esto último provoca la transferencia, por ósmosis, de agua desde las células al medio extracelular y la consecuente deshidratación celular, causante de alteraciones metabólicas generalizadas. La velocidad de descongelamiento, si es elevada, contribuye al daño, porque la célula no logra reparar a tiempo las fisuras ocasionadas por el congelamiento (Westendorp y Encina, 2004).

La crioconservación de tejidos biológicos es posible solo si se evita la formación de los cristales de hielo intracelularmente, si esto no ocurre, causa daños irreversibles a las membranas celulares, dando como resultado una destrucción de su permeabilidad (Panis y Lambarri, 2005). La formación de cristales solo puede evitarse con vitrificación, que se refiere al proceso de transición de una solución acuosa a un estado amorfo, cristalino o viscoso (Panis y Lambardi, 2005). Para que una célula se vitrifique debe reunir dos aspectos que son: tasa rápidas de congelamiento y una solución celular altamente concentrada. Las tasas altas de congelamiento ($6\text{ }^{\circ}\text{C/seg}$) se alcanzan normalmente poniendo los explantes en crioviales y sumergiéndolos rápidamente en nitrógeno líquido, mientras que las tasas de congelamiento ultra rápidas ($60\text{-}130\text{ }^{\circ}\text{C/seg}$) se logra con el protocolo de vitrificación de gota, en donde las muestras son inmersas directamente a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ sobre gotas de solución crioprotectora colocadas en laminas de papel aluminio (Schafer y Shumacher, 1997).

De acuerdo con Mazur (1984), los períodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son: la fase inicial del enfriamiento y el período de retorno a condiciones fisiológicas. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación en general, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre $10\text{ y }16\text{ }^{\circ}\text{C}$ alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossmann y Santaló, 1991). Las bajas temperaturas y la rapidez con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP), la

disminución de temperatura desde 25 °C a 10 °C reduce en un 60 % la actividad de las bombas dependientes de ATP y la difusión facilitada o como transporte, en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico (Ávila, 2006).

La difusión es el proceso mediante el cual las moléculas de una sustancia tienden a alcanzar una distribución homogénea en todo el espacio que les es accesible. La ósmosis es el movimiento del agua desde soluciones con baja concentración hasta soluciones con alta concentración de soluto; y la presión osmótica es la presión hidrostática que se genera a través de una membrana con un gradiente de concentración al lado y lado (Ávila, 2006). La lesión celular crio-inducida se explica en función de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación, Merryman propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico), el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce la relación a el aumento de la osmolaridad extracelular; a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad, en este caso los crioprotectores actuarían reduciendo, la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada (Ávila, 2006).

3.4.3 Selección y preparación del germoplasma para crioconservar

La adquisición del germoplasma es de suma importancia para poder almacenarlo a largo plazo. Esta técnica es aplicable a semillas frescas o partes vegetativas (ápices y yemas), tomando en cuenta su previo manejo *in vitro* (Benson, 1999). Se deberán tomar en cuenta factores como la estructura genética de la población y el germoplasma disponible. Se pueden almacenar ápices, meristemos, semillas, embriones cigóticos y somáticos, pólen y células (Seguel, 2001). Debe ser seleccionado de plantas sanas y, en el caso de proceder de material de cultivo *in vitro*, los parámetros de cultivo se deben optimizar antes de la crioconservación, ya que el éxito de este proceso va a depender tanto de los tratamientos utilizados antes de someter al material al nitrógeno líquido, como de los utilizados una vez recuperado el material. Por lo tanto, es de suma importancia poner especial atención en la composición de los medios de cultivo donde se incuba el material vegetal antes y después de introducirlo en nitrógeno líquido para su conservación (Sakai y Cols., 1993).

Material vegetal. Etapa fisiológica. Las células vegetales con crecimiento exponencial son más tolerantes al congelamiento que aquellas obtenidas durante la etapa de detención del crecimiento, debido a las características que presentan, como son: células pequeñas, contienen pocas y pequeñas vacuolas, por lo que contienen menor cantidad de agua, adquiriendo un citoplasma denso y en el que existe un alto balance entre núcleo y citoplasma (Withers, 1985). Origen del material vegetal. Se prefiere el material proveniente de cultivo *in vitro*, debido a que los explantes están en tamaño pequeño libre de contaminación (Engelmann, 1991). Periodo de cultivo *in vitro*. La permanencia de los tejidos bajo cultivo *in vitro* por periodos prolongados antes de la crioconservación,

reduce significativamente la sobrevivencia al congelamiento por ejemplo en ápices de papa (Harding *et al.*, 1991). El pretratamiento corresponde a un cultivo por un corto tiempo, bajo condiciones que preparen antes de los procesos de congelamiento (Engelmannn, 1991). Este se aplica al explante como crioprotección, ya que por sí sólo el material biológico no es capaz de soportar la crioconservación y generalmente la sobrevivencia aumenta cuando se usan varias estrategias combinadas (Benson, 1999).

Para la crioprotección se recurre a agentes químicos como son los crioprotectores, sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (punto en el cual una composición solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará mas deshidratada y el gradiente osmótico al que será sometido es menor (Ávila, 2006). Los crioprotectores se dividen de acuerdo a su permeabilidad en la célula en: a) Penetrantes son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. Son utilizados el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanodiol (PROH). El dimetil sulfóxido es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock (1959), el DMSO se ha usado como un crioprotector. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana; su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos (Ávila, 2006).

b) No-penetrantes: Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son sacarosa, glucosa y dextrosa, generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se reduciría por su concentración molar (Ávila, 2006).

La adición del criopreservante *per se* genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los ACP (agentes crioprotectores) y después se hidrata. La definición de los parámetros biofísicos de cada célula y el estudio de la interacción con los ACP durante la congelación y descongelación de las células deben ser definidos para establecer los límites físicos que aseguren la supervivencia de la célula (Ávila, 2006). Para incrementar los efectos de la utilización de los crioprotectores, el material vegetal puede precultivarse en un medio que contenga altas concentraciones de azúcares que reducirán el contenido hídrico de la célula, disminuyendo así la formación de hielo intracelular. El trabajo preliminar para la conservación en cada especie es determinar su tolerancia a la deshidratación y ajustar los protocolos de congelación para obtener una elevada supervivencia y viabilidad del material crioconservado y poder manejar los bancos de germoplasma (Benson, 1999).

Se pueden identificar dos grandes grupos de procedimientos utilizados para la criopreservación. Los métodos clásicos, que consisten en el pretratamiento del material con sustancias crioprotectoras como el dimetil sulfoxido (DMSO), el glicerol, la

sacarosa y el polietilenglicol, así como mezclas de ellas durante unos minutos, horas o días para lograr la deshidratación lenta de las células. El pretratamiento es seguido por un congelamiento controlado que se lleva a cabo lentamente (0.3 a 2 °C/min) hasta -40 °C, luego se almacenan las muestras en NL (Abdelnour, 1999). Los métodos modernos evitan la formación de hielo durante los procesos de crioconservación, los cuales se basan en vitrificación (Benson, 1999).

3.4.4 Congelamiento

Las técnicas empleadas en los mecanismos físicos que contribuyen a proteger al material biológico durante el proceso de crioconservación se conocen como métodos clásicos o métodos modernos. Las técnicas clásicas implican deshidratación inducida durante el congelamiento, mientras que las técnicas modernas se basan en la vitrificación. La mayoría de los sistemas empleados en la crioconservación contienen altas cantidades de agua intracelular, y éstos son mayoritariamente, muy sensibles al daño por congelamiento (Engelmann, 1997).

3.4.5 Congelamiento lento

El método de congelación lento, también llamado método convencional de precongelamiento, consiste en someter el material a un descenso gradual de temperatura desde -10 °C hasta -30 °C ó -40 °C antes de introducir el material en nitrógeno líquido. Esto puede realizarse bajando la temperatura a saltos térmicos relativamente amplios (5 °C en 5 min), o bien, a saltos térmicos muy pequeños (0.5 °C en 5 min), siendo este último más lento, y dando lugar a una baja de temperatura aparentemente continua. En el método de congelación rápido, el material se congela inicialmente a -40 °C, para pasarlo posteriormente al NL (Sakai y Cols, 1991).

La mayoría de los procedimientos clásicos de congelamiento requieren del uso de un costoso aparato de congelamiento programable para alcanzar las condiciones precisas de deshidratación por congelamiento. Sin embargo, no siempre es necesario un aparato sofisticado para obtener alta sobrevivencia y una disminución gradual de la temperatura. Withers y Kinas (1970) desarrollaron un aparato para el congelamiento, que ofrece condiciones reproducibles, pero un congelamiento no lineal (Withers, 1985; Engelmann, 1997).

3.4.6 Congelamiento ultra rápido

Es una técnica nueva y posee ventajas prácticas frente a las técnicas clásicas, debido a su simplicidad y su aplicabilidad, ya que es para un amplio rango de especies (Engelmann, 1997). Aunque los métodos de congelación son variados, curiosamente casi todos los autores coinciden en que el proceso de descongelación debe realizarse de forma rápida para evitar la recrystalización, siendo el método más habitual la inmediata introducción del material congelado en agua caliente a 38 o 40 °C (Westendorp y Encina, 2004). Para la manipulación del material es necesario utilizar recipientes de materiales resistentes a las bajas temperaturas, como los crioviales de polipropileno, con capacidades entre 1.2 y 15.0 ml, tienen un sistema de cierre a rosca especialmente diseñado para soportar la rápida conversión del NL a gas (Sakai y Cols., 1993).

Los procedimientos basados en vitrificación son operacionalmente menos complejos que los clásicos. Estos procedimientos son mas apropiados para congelamiento de órganos, como ápices o embriones, las cuales contienen una variedad de tipos de células, cada uno con requerimientos específicos bajo condiciones de deshidratación inducido durante

el congelamiento. Esta técnica posee gran potencial por su amplia aplicabilidad en comparación con las técnicas clásicas, puesto que se requieren modificaciones en menor grado para optimizar los protocolos (Engelmann, 1997; Withers y Engelmann, 1997).

3.4.6.1 Técnica de Encapsulación-Deshidratación

Se basa en la tecnología desarrollada para la producción de semilla sintética; consiste en encapsular meristemas, ápices y embriones somáticos en alginato y cultivarlos en medio líquido a concentraciones altas de sacarosa durante diferentes periodos. Antes de congelarse en nitrógeno líquido, las cápsulas son parcialmente deshidratadas bajo el flujo laminar de aire estéril de una campana de flujo laminar o silica gel. Para la recuperación, las muestras se colocan en medio de cultivo estándar (Fabre y Dreuddre, 1990). Este método se sustenta en el hecho de que la encapsulación protege a los explantes haciéndolos más resistentes a tratamientos que podrían ser letales (Takai, 2000; González y Engelmann, 2006).

Esta técnica comprende las siguientes etapas: Pre-cultivo, encapsulación, pre-tratamiento, deshidratación, congelamiento, descongelamiento y recuperación.

Las plantas madre o los explantes a crioconservar deben someterse a condiciones de tratamiento, con la finalidad de incrementar su tolerancia a los procesos de estrés (González y Engelmann, 2006). En especies tolerantes a frío, las plantas madre *in vitro* o ápices pueden mantenerse a bajas temperaturas por varias semanas (Hirai y Sakai, 2000). Los explantes se mantienen durante toda la noche en medio estándar antes de proceder a su encapsulación (González y Engelmann, 2006). Para la elaboración de las semillas sintéticas, el material vegetal se deposita en alginato de sodio al 3 %, para

posteriormente, con una pipeta, absorberlas y dejar caer la gota en cloruro de calcio 0.1 M, lo que induce la polimerización del alginato en presencia de calcio y las cápsulas producidas de alginato de calcio incrustan los explantes. La solución de calcio se mantiene alrededor de 15 a 20 min después de que se ha formado la última cápsula, con la finalidad de garantizar una buena polimerización. La polimerización de las cápsulas puede examinarse a partir de las mismas cápsulas, que son translucidas inmediatamente después de su formación. Estas son transferidas al medio de precultivo cuando están totalmente opacas, y se visualiza la polimerización (González y Engelmann, 2006).

Después de la encapsulación de los tejidos, estos se ponen en envases en agitación en medio líquido basal (Murashige y Skoog, 1962) con altas concentraciones de sacarosa (entre 0.5, 0.75, 1 y 1.2 M) (Engelmann, 1997; González y Engelmann, 2006). La duración de los tratamientos con sacarosa varía desde 16 h hasta 10 días, dependiendo del material vegetal (Engelmann, 1997). Los efectos principales de los pre-tratamientos se basan en: la absorción de la sacarosa por los explantes, lo que resulta en el incremento de la concentración de los solutos internos (González y Engelmann, 2006). Posteriormente del pre-tratamiento, las cápsulas se deshidratan con papel filtro estéril para remover el exceso del medio de pre-tratamiento líquido y someterlos a una deshidratación física (González y Engelmann, 2006). Se pueden emplear dos métodos de deshidratación: la deshidratación bajo la campana de flujo laminar o en contenedores sellados con silica gel; éste último es el más empleado ya que asegura más precisión y por lo tanto, tasas de deshidratación reproducibles (Engelmann, 1997; González y Engelmann, 2006). Para determinar el contenido de humedad de las cápsulas al que se congela, es necesario contar con un peso de cápsulas a intervalos regulares. Para ello es

necesario graficar una curva de deshidratación estándar usando cápsulas vacías. En general, el contenido de agua en la cápsula, que asegura la sobrevivencia mas alta, es alrededor de 20 a 30 % (Engelmann, 1997; González y Engelmann, 2006).

Posteriormente, las cápsulas se ponen en crioviales de 1 a 2 ml para el congelamiento y estos se sumergen en nitrógeno líquido -196 °C (González y Engelmann, 2006). El descongelamiento se lleva a cabo lentamente a temperatura ambiente; se sacan de los crioviales y se colocan en cajas petri bajo el aire de la campana de flujo laminar durante 5 min, partiendo que las muestras se deshidraten antes del congelamiento, por lo que se disminuye el riesgo de recristalización en el descongelamiento (González y Engelmann, 2006). Por último, las cápsulas se siembran en medios de cultivo de regeneración y se mantienen en oscuridad durante una semana.

3.4.6.2 Técnica de vitrificación

Consiste en el pretratamiento de las muestras con soluciones concentradas de crioprotectores (sacarosa, glicerol y DMSO) por unos minutos; una de las mezclas más utilizadas es la de PVS2 (30 % w/v glicerol, 15 % w/v etilen glicol y 15 % w/v DMSO en un medio liquido de MS con 0.4 M azúcar), seguido por el congelamiento en NL para alcanzar un estado de vitrificación de los solutos internos. Para incrementar los efectos de la utilización de los crioprotectores, el material vegetal puede precultivarse en un medio que contenga altas concentraciones de azúcar. Los azúcares, reducirían el contenido hídrico de la célula disminuyendo así la formación de hielo intracelular. Como estas soluciones son toxicas para las células, es importante controlar cuidadosamente el tiempo de incubación y removerlas gradualmente después de descongelar las muestras (Sakai *et al.*, 1990).

Según Engelmann (1991), Engelmann (1997), Takagi (2000) y Panis *et al.*, (2001), el protocolo de vitrificación, de manera más detallada es el siguiente:

Seleccionar y preparar el material vegetal adecuado, debido a que la etapa fisiológica de los explantes puede influenciar en la sobrevivencia. El precultivo consiste en que los explantes son colocados en un medio sólido con altas concentraciones de sacarosa (0.3-0.6 M). El tratamiento de carga consiste en poner los explantes en medio líquido, conteniendo sustancias crioprotectoras (sacarosa, glicerol, etilen glicol) durante un tiempo que va de 5 a 90 min., según el tipo de material.

La deshidratación se realiza mediante exposición a una solución de vitrificación para plantas a 0 o 25 °C durante 5 min. o hasta 1 h. Las soluciones vitrificadoras son mezclas de crioprotectores que tienen la capacidad de vitrificar formando una estructura sólida. Los explantes contenidos en crioviales se enfrían rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido para lograr la vitrificación de los solutos internos. El descongelamiento de los explantes se realiza tan rápido como sea posible para evitar la de-vitrificación, que puede llevar a la formación de cristales de hielo, detrimental para la integridad celular (Meryman y Williams, 1985). Las muestras se sumergen baño de agua a 40 °C para la remoción de la solución vitrificadora, para reducir el shock osmótico, utilizando un medio líquido suplementado con 1.2 M de sacarosa, se agrega progresivamente para diluir la solución vitrificadora. Por ultimo se recuperan los explantes en medio de cultivo de regeneración y se mantiene la primera semana en oscuridad.

3.4.7 Antecedentes en crioconservación de orquídeas

Thammasiri (2000), utilizó semillas de la orquídea *Doritis pulcherrima* Lindl, para crioconservarlas con la técnica de vitrificación. Las semillas fueron deshidratadas en crioviales de 2 ml con la solución de vitrificación PVS2 a 25 ± 2 °C durante 50 min; la solución PVS2 fue substituida por 0.5 ml de medio de cultivo Vacin y Went modificado con 1.2 M de sacarosa, y se mantuvo en 25 ± 2 °C durante 20 min., antes de la transferencia al medio. El 62 % de semillas tratadas con la solución PVS2 desarrollaron plántulas normales, mientras sin aquel tratamiento no hubo sobrevivencia. *Ponerorchis graminifolia* var. *suzukiana* es una orquídea terrestre, especie en vías de extinción en Japón, después de seis meses de polinización, se sembraron las semillas y en formación de protocormos se transfirieron a medio de cultivo Dogashima (ND) suplementado con sacarosa 0.3 M durante 3 días y criopreservadas por el método de vitrificación PVS2 durante 60 min, la viabilidad después de la preservación fue del %. Utilizando tres procedimientos criogénicos diferentes: sumersión directa en nitrógeno líquido, vitrificación y vitrificación con precultivo, se colectaron semillas inmaduras de 2 a 4 meses después de la polinización de la orquídea *Bletilla striata*, estas se precultivaron en medio Dogashima suplementado con 0.3 M de sacarosa, durante 3 días, los resultados de sobrevivencia fueron de 92 y 81 % respectivamente. (Hirano *et al.*, 2005).

Popov *et al.* (2004), desarrollaron plantas juveniles del híbrido *Bratonia* a partir de semillas crioconservadas, encontrando que no hay efectos en el rango de germinación debido al almacenamiento a -196 °C, y los protocormos de estas semillas crioconservadas desarrollan más rápido durante los primeros 45 días.

Semillas de las orquídeas *Dactylorhiza fuchsii* y *Anacamptis morio* fueron encapsuladas con alginato e hifas del hongo *Ceratobasidium cornigerum*. El pretratamiento dado a las cápsulas fue durante 18 h con sacarosa a concentraciones de 0.75 M, lo cual disminuyó la deshidratación en un flujo de aire estéril (23 °C, al 30 % RH (humedad relativa)) y aumentó la supervivencia de semillas y del hongo hasta 16 h de deshidratación. Posteriormente se transfirieron a crioviales y fueron almacenadas en una gama de temperaturas bajas hasta 30 días. Ni el crecimiento del embrión, ni el desarrollo del hongo fue afectado por el almacenamiento a -196 °C. Con un 20 % de humedad en las cápsulas, estas mostraron 5 y 45 % de viabilidad, respectivamente, posteriormente fueron almacenadas a -20 °C y -70 °C durante 30 días obteniendo los mismos valores de sobrevivencia. Los resultados indican que existen buenas posibilidades para el empleo de la crioconservación (Wood *et al.*, 2000).

En *Oncidium* se ha implementado la encapsulation-deshidratación de semillas y protocormos cultivados *in vitro*. Las semillas después de los 120 días después de la polinización, fueron encapsuladas contiendo medio MS al 50 % con 3 % sacarosa y 3 % de alginato y subsecuentemente pretratado (80 rpm) en medio líquido con 1.15 M (24 h) seguido de 0.25 M (48 h), 0.5 M (24 h) y 0.75 M de sacarosa (24 h). Las capsulas con semillas fueron deshidratadas en silica gel durante 5 h (19.2 % HR) y sumergidas en el NL por 1 h, descongelados a 30 °C durante 2 minutos, post-tratados usando la misma serie de medios líquidos [0.5 M (24 h), 0.25 M (48 h), 0.15 M de sacarosa (24 h)], y en el medio MS (1/2) con 0.1 M de sacarosa y 0.7 % agar. 4.8 % de las semillas criopreservadas produjeron plantas completas. Protocormos cultivados *in vitro* son

satisfactoriamente crioconservados utilizando el mismo procedimiento obteniendo 11.3 % para la producción de plantas (Flachsland, 2006).

Según Ishikawa *et al.* (2004), tratamientos en semillas de la orquídea japonesa terrestre (*Bletilla striata* Rchb.f.) fueron germinadas y cultivadas en medio sólido Dogashima (ND) durante 10 días. Los embriones se cultivaron en medio ND complementado con 0.3 M de sacarosa durante 3 días en 25 °C en oscuridad continua. Los embriones fueron cubiertos con una mezcla de 2 M de glicerol y 0.4 M sacarosa durante 15 min en 25 °C y finalmente deshidratados con la solución de vitrificación (PVS2) durante 3 h en 0 °C antes de la inmersión en el NL por 30 min. Después los embriones fueron lavados con el medio líquido ND complementado con 1.2 M de sacarosa durante 20 min. y sembrados en medio ND. La regeneración de plantas fue de 60 %.

Praweena *et al.* (2007), utilizó protocormos cultivados *in vitro* de orquídea tailandesa *Cleisostoma arietinum* (Rchb.f) cultivó en el medio Dogashima solidificado (ND) conteniendo 2 mg/l NAA y 2 mg/l BA durante dos meses. Estos protocormos fueron usados como explantes en criopreservación por encapsulación-deshidratación. El porcentaje más alto de explantes criopreservados se obtuvo al precultivar en medio semisólido ND con 0.25 M de sacarosa en oscuridad durante 1 semana y luego transferido al medio líquido ND conteniendo 0.75 M de sacarosa durante dos días, finalmente deshidratado con gel de silica en corriente de aire laminar por 5 h antes de la inmersión en el nitrógeno líquido por 1 h. El porcentaje de brotes fue del 49 %.

3.4.8 Perspectivas

En el ámbito mundial, la criopreservación ha sido utilizada hasta ahora en aproximadamente 100 especies, lo que permite suponer que en un futuro cercano se convertirá en la metodología de conservación más eficaz, segura y de bajo costo. La crioconservación se reconoce como la única opción disponible para el almacenamiento, a largo plazo, del germoplasma de especies propagadas vegetativamente y especies con semillas clasificadas como recalcitrantes e intermedias en cuanto al almacenamiento (Villalobos y Engelmann, 1995).

3.5 Diversidad genética

La variación o diversidad genética se representa con las diferencias en la constitución génica de los individuos de una población. La diversidad genética que se presenta en las poblaciones naturales permite entender cómo es que las especies se adaptan y evolucionan. Por lo tanto, la pérdida de esta variación puede reducir la capacidad de una población a adaptarse a los cambios de su ambiente. Entre los principales factores de la variabilidad genética está la distribución geográfica, los sistemas de reproducción, las formas de vida y las características de dispersión del pólen y de las semillas; todos ellos influyen fuertemente en la estructura genética de las poblaciones naturales (Santos *et al.*, 2006). Algunos de los métodos para evaluar la variación genética se basan en la observación de las características morfológicas, o bien, en los cambios en proteínas con actividades enzimáticas específicas (isoenzimas), entre otros (Santos *et al.*, 2006).

3.5.1 Marcadores moleculares

Desde la prehistoria, el hombre ha seleccionado y mejorado especies vegetales, animales y microbianas basándose en el fenotipo. Las mejoras genéticas eran posibles gracias a la variabilidad genética, a la heredabilidad del carácter que se quería aislar, a la eficacia e intensidad de la selección aplicada, y al tiempo necesario para realizar un ciclo de selección. Sin embargo, quedan muchos aspectos desconocidos, como son el número y efecto de los genes implicados en la expresión de un carácter, la localización de éstos genes, y su función fisiológica. La aparición de los marcadores moleculares está ayudando a eliminar tanto los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa (Nonnatus, 2001).

Un marcador molecular es cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético, por lo que es un locus marcado que tiene que ser polimórfico. Como marcador puede utilizarse con una doble finalidad, para marcar o señalar el locus que controla la diferencia fenotípica y/o para marcar otro locus próximo que controle algún carácter de interés (Nuez *et al.*, 2000). Son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas y el ADN. Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético forman un QTL (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables) (Sun y Wong, 2001).

Los marcadores moleculares permiten tener una gran cantidad de información sobre la diversidad genética y las relaciones filogenéticas en el germoplasma utilizado por el

mejorador; ayudando a dilucidar las clases genéticas presentes y las similitudes genéticas entre ellas, así como cuantificar la diversidad presente en dichas clases y sus relaciones evolutivas con sus parientes silvestres. El conocimiento de las relaciones genéticas entre genotipos es de gran utilidad en los programas de mejoramiento de plantas debido a que permite la organización del germoplasma, incluyendo líneas élite, y una selección parental más eficiente, permitiendo la protección legal del germoplasma de una región o país (Picca *et al.*, 2002). Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariable (Nonnatus, 2001).

3.5.2 Marcadores moleculares de ADN

Los avances de la tecnología del ADN recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades. La PCR es una de las técnicas esenciales para la preparación de huellas dactilares, si bien no vale para elaborar marcadores por sí sola. La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del ADN molde para separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con su ADN molde, y termina con la polimerización para sintetizar un nuevo ADN entre los dos oligonucleótidos. De aquí se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo (Nonnatus, 2001).

3.5.3 Marcadores moleculares RAPDs

El sistema RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) consiste en amplificar en forma aleatoria segmentos de ADN templado a partir de una sola secuencia de diez nucleótidos y funciona para la amplificación de cadenas de ADN (Santos *et al.*, 2006).

Es una de las técnicas más versátiles desde que se desarrolló, en el año de 1990. Se usa una colección de decanucleótidos para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Su pequeñez y la baja temperatura de alineamiento (36 °C) aseguran que se una a infinidad de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos fragmentos de ADN. Estos fragmentos se pueden separar en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos y proporcionarán una huella dactilar característica. Es muy cómoda, rápida, requiere poco ADN que, además, no necesita estar muy puro, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia, y se pueden distinguir rápida y simultáneamente muchos organismos. Sus inconvenientes son que los fragmentos amplificados no suelen corresponder a ADN ligado a algún carácter y no da información sobre el número de copias que el ADN genómico contiene de la secuencia amplificada (Sun y Wong, 2001). Los RAPD se heredan de manera Mendeliana y la técnica tiende a producir marcadores dominantes. Los individuos que contienen dos copias (homocigóticos). No se puede diferenciar de aquellos que solo tienen una copia (heterocigóticos). Ocasionalmente se detecta algún RAPD codominante, lo que puede ocurrir cuando hay una inserción o delección dentro del fragmento a amplificar sin alteración del lugar de hibridación (Williams *et al.*, 1990).

Demeke *et al.* (1992), encontraron que los RAPDs son útiles en la clasificación de especies en peligro de extinción. Un ensayo de diagnóstico basado en ADN, con RAPD identifica genotipos directamente y puede ayudar a mitigar complicaciones derivadas de los estudios citológicos y morfológicos (Saw *et al.*, 1999).

3.5.4 Antecedentes en Orquídeas

De los diferentes marcadores de ADN desarrollados recientemente para la investigación sobre plantas, RAPD se ha convertido cada vez más popular en los estudios de poblaciones de plantas naturales. Sin embargo, las principales ventajas del análisis RAPD superan a sus inconvenientes: análisis RAPDs puede proporcionar potencialmente un número mucho mayor de loci reproducible y altos niveles de polimorfismo (Sun y Wong, 2001).

La variación genética y la estructura de la población para tres especies de orquídeas, *Zeuxine gracilis*, *Z. strateumatica* y *Eulophia sinensis* muestran contraste con alto polimorfismo a nivel de especies en análisis RAPD, así como en algunas grandes poblaciones. Existe una alta diferenciación genética entre las poblaciones, lo que sugiere que la estructura de la población es determinada principalmente por la dinámica de colonización. Efectos de deriva genética en poblaciones pequeñas desempeñan un papel en determinar el patrón de diversidad genética de la especie (Sun y Wong, 2001).

En una reciente revisión de Nybom y Bartish (2000 citado por Sun y Wong, 2001), ha puesto de manifiesto que los parámetros genéticos estimados sobre la base de RAPDs muestran aproximadamente la misma asociación con rasgos de historia de vida, las

estimaciones entre la diversidad de la población también son considerablemente más elevados que los isoenzimas basados en estimaciones según Hamrick y Godt (1989 citado por Sun y Wong, 2001).

El valor de RAPDs para la investigación genética de la estructuración de las poblaciones se basa en la disponibilidad de loci polimórficos. Por ejemplo, la falta de diversidad de isoenzimas en dos orquídeas; *E. sinensis* y *Z. strateumatica*, puede dar lugar a deficiencias en las conclusiones a las que las poblaciones son genéticamente uniformes. Por el contrario, estimaciones basadas en RAPD indican un alto nivel de diferenciación de la población de ambas especies, lo cual es coherente con lo esperado para la estructura de la población colonizadora (Sun y Wong, 2001).

Los marcadores RAPD pueden ser informativos para evaluar la diferenciación de la población. La reproducibilidad de RAPDs ha sido a menudo cuestionada, que sin duda puede dificultar su aplicación en estudios de población. Este problema se debe en gran parte a la conocida sensibilidad de la PCR, de reactivos y las concentraciones, pH y otros parámetros de reacción. Además de las condiciones de amplificación, la generación de patrones RAPDs reproducibles y comparables de bandeo depende de la calidad del ADN (Sun y Wong, 2001).

De un total de 131 bandas que van en tamaño desde 200 a 1,400 bp fue generada usando 12 primers, de ellos, 73.3% (96 en total) fueron polimórficos entre 161 individuos, es decir, el porcentaje de bandas polimórficas (P) de esta especie es de 73.3%. La diversidad genética varía mucho entre las poblaciones con los valores P que van desde el

28.4% a 58.2%. Para evaluar la distribución global de la diversidad genética, se utilizó el programa ANOVA para analizar la matriz de distancia, mostrando diferenciación genética significativa ($p < 0.001$) entre las poblaciones. Una gran proporción de la variación genética (79.69%) residía en las poblaciones, mientras que sólo el 20.31% residían en las poblaciones (Li *et al.*, 2002).

Mediante el uso de RAPDs, sólo 9 de cada 19 bandas ha permitido la detección de polimorfismo de ADN entre las especies de orquídeas. El total de 88 bandas se ha generado con un rango de 150-2000 bp. Sólo 2 iniciadores (OPA-20 y OPH-04) pueden generar marcadores singularmente entre tres especies de orquídeas. El análisis de clusters de la distancia genética llevó a cabo el dendrograma en el que se indica claramente que las tres especies de orquídeas se agrupan en tres diferentes categorías (Asawatreratanakul and Asawatreratanakul, 2005).

Goodyera procera es una orquídea en peligro de extinción en Hong Kong. La información sobre su biología reproductiva y el patrón de variación genética es necesaria para desarrollar estrategias de conservación eficaces. Mediante el uso de isoenzimas y RAPDs se evaluó la variación genética y la estructura de 15 poblaciones de *G. procera*. Los datos revelaron que con isoenzimas existe baja variación en la población y especies, sin embargo, RAPDs mostró variación relativamente alta a nivel de población, y a nivel de especie (Wong and Sun 1999). Anteriormente, las clasificaciones se basaban generalmente en la morfología y citología. Mientras el análisis RAPD es útil para determinar la relación de los taxones que se encuentran en duda. Se recomienda a los análisis RAPD como una herramienta adicional para clasificar a la familia Orquidaceae (Lim *et al.*, 1999).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación de la fase experimental

La presente investigación se desarrolló en dos etapas, la primera consistió en establecer las condiciones de manejo *in vitro* y adaptar los protocolos para la conservación a largo plazo de la orquídea *L. speciosa* los cuales fueron realizados en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y la segunda fue, la de caracterización molecular de dos especies de orquídeas y esta se llevo a cabo en el laboratorio de Biotecnología Agrícola, ambos del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.2 Manejo *in vitro*

Para poder desarrollar el protocolo del manejo *in vitro* de la orquídea *L. speciosa* se trabajó con cada etapa, iniciando con la germinación, multiplicación y aclimatación como se observa en la Figura 4. En cada una de ellas se evaluaron diversos medios de cultivo con la finalidad de obtener el mejor en cada caso.

4.2.1 Pruebas de germinación

Se utilizaron cápsulas cerradas de las orquídeas *L. speciosa* proporcionadas por el Orquidario (Dr. y Gral. Alberto Oviedo Mota) el cual se localiza en Morelia Mich. De acuerdo a la metodología empleada por Sheena (2000) se sembraron las semillas en el medio de cultivo basal (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con *mio-inositol* 100 mgL⁻¹, piridoxina 0.5 mgL⁻¹, 20 mgL⁻¹ de azúcar y 8 mgL⁻¹ de agar. Se ajusto el pH a 5.7. Evaluándose los siguientes aditivos y reguladores de crecimiento, los cuales se mencionan en el Cuadro 1.

- Extracto de malta 500 mgL⁻¹
- Sulfato de adenina 100 mg L⁻¹
- BA 0.2 mgL⁻¹
- Kinetina 2 mgL⁻¹
- AIA 2 mgL⁻¹
- Vitaminas WS 10 %

Cuadro 1. Combinaciones de aditivos y reguladores de crecimiento empleadas en la germinación de semillas de *L. speciosa*.

TRATAMIENTO	COMBINACIONES
T1	BA 0.2 mg·l ⁻¹ + Kinetina 2 mg·l ⁻¹
T2	BA 0.2 mg·l ⁻¹ + AIA 2 mg·l ⁻¹
T3	BA 0.2 mg·l ⁻¹ + Vitaminas WS 10%
T4	Kinetina 2 mg·l ⁻¹ + AIA 2 mg·l ⁻¹
T5	AIA 2 mg·l ⁻¹ + Vitaminas WS 10%
T6	Extracto de malta 500 mg·l ⁻¹
T7	Sulfato de adenina 100 mg·l ⁻¹

Se sembraron las semillas en cada tratamiento. Las condiciones de incubación fueron a 25 ± 1 °C bajo un fotoperiodo de 16/8 h (día/noche) con una intensidad lumínica de 68 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, provista por lámparas fluorescentes blancas.

Las variables a evaluar se tomaron a partir de los 30 y hasta los 50 días después de la siembra, realizando evaluaciones correspondientes cada 5 días,

- Hinchamiento del embrión (HE)

- Germinación (G)
- Protocormo con una hoja (P1H)
- Protocormo con dos hojas (P2H)

Tomando en cuenta que la germinación se evaluó al momento en que la radícula rompe la testa (Moreno, 1996), se realizaron observaciones durante 5 fechas en 7 medios de cultivo *in vitro*.

Para determinar el porcentaje de germinación, se realizó un conteo de 100 semillas en cada unidad experimental a los 50 días después de la siembra, obteniendo así un promedio de la germinación en cada uno de los tratamientos. El análisis estadístico de las variables evaluadas se realizó mediante un modelo probabilístico binomial, en donde se tuvieron siete tratamientos y cinco repeticiones en cinco fechas de evaluación; se analizaron las proporciones y se compararon utilizando el estadístico Z con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

4.2.2 Medios de multiplicación

Para esta fase se establecieron cuatro medios de cultivo, utilizando como medio base, Murashige y Skoog (1962), con las siguientes variantes independientes: Medio a) 2,4-D $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + kinetina $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, b) Extracto de malta $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + kinetina $0.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y c) Caseína hidrolizada $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + kinetina $0.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Se establecieron tres medios de cultivo con cuatro repeticiones para la fase de multiplicación de la orquídea, en los cuales se sembraron protocormos con dos hojas después de los 50 días de siembra.

Durante dos meses se registraron semanalmente las siguientes variables:

- Número de brotes (NB)
- Longitud de brotes (LB)
- Vigor de brotes (VB)
- Número de raíz (NR)
- Longitud de raíz (LR)
- Número de hojas (NH)

4.2.3 Aclimatación

Para la aclimatación se emplearon plántulas con un tamaño de 5 cm de altura y por lo menos tres raíces; se transplantaron a charolas con las siguientes combinaciones de sustratos: 1) Tezontle rojo, 2) Tezontle + peat most (1:1), 3) Corteza de pino + peat most (1:1), 4) Peat most + vermiculita (2:1).

Las plántulas transplantadas se mantuvieron con la charola cubierta durante dos semanas, a partir de la tercera semana se destaparon durante la mañana y se taparon en la tarde, lo que se mantuvo durante dos meses, tiempo en que se completó la aclimatación.

Las variables fueron evaluadas cada dos semanas.

- Altura de planta (AP)
- Número de hojas (NH)
- Número de raíces (NR)

- Longitud de raíces (LR)
- Vigor de la plántula (VP)
- Color de la plántula (CP)

En la etapa de multiplicación y aclimatación se utilizó el análisis estadístico de Kruskal y Wallis, debido a que los datos no presentaban normalidad y homocedasticidad (dispersión de valores), se realizó una asignación de rangos y comparación múltiple utilizando un $\alpha=0.05$.

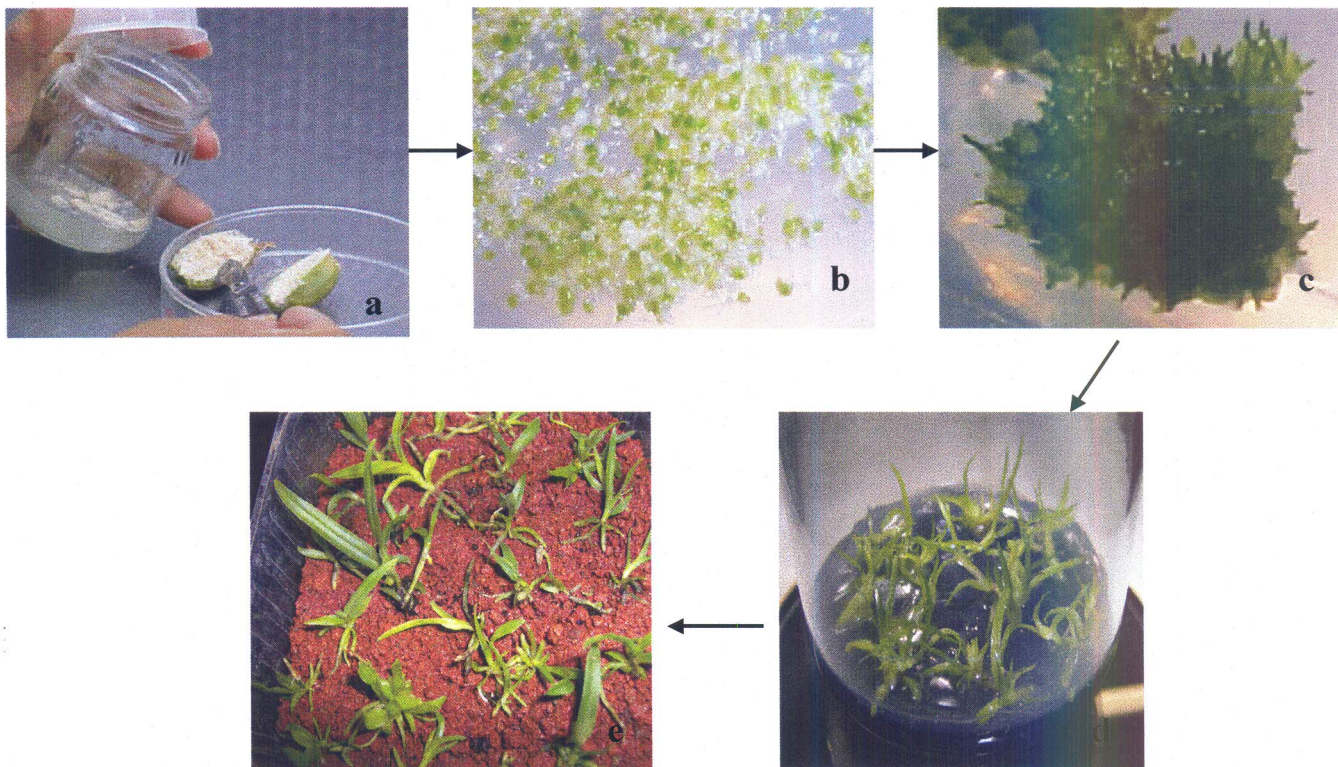


Figura 4. Cultivo *in vitro* de la orquídea *Laelia speciosa*. a) Siembra de semillas. b) Germinación. c) Multiplicación. d) Desarrollo. e) Aclimatación.

4.3 Pruebas de crioconservación

4.3.1 Encapsulación-deshidratación

Después de 50 días de siembra, se obtuvieron protocormos (0.4-0.6 ml) con dos hojas, los cuales fueron utilizados para las pruebas de crioconservación, en este caso la de encapsulación-deshidratación como se observa en la Figura 5.

Los protocormos fueron sometidos a condiciones de pre-tratamiento durante 24 horas en medio basal Murashige y Skoog 0.3 M de sacarosa. Para la elaboración de las semillas sintéticas, el material vegetal se depositó en alginato de sodio al 3 % en medio basal MS, utilizando el método de gota: el cual consiste en que se absorbe y se dejar caer la gota en cloruro de calcio 0.1 M, lo cual induce la polimerización del alginato en presencia de calcio y forman las cápsulas. Se mantiene en la solución de calcio alrededor de 15 a 20 min. después de que se ha formado la última cápsula, lo cual se puede comprobar cuando éstas tienen una tonalidad translúcida, inmediatamente después de su formación, posteriormente son transferidas al medio de precultivo.

Después de la encapsulación de los protocormos, las cápsulas se ponen en envases en agitación en medio líquido basal (Murashige y Skoog, 1962) con altas concentraciones de sacarosa (entre 0.5, 0.75, 1 y 1.2 M) durante 24 horas. Posteriormente las cápsulas se deshidratan con papel filtro estéril para remover el exceso del medio de pre-tratamiento líquido y se deshidratación físicamente en contenedores sellados con sílica gel, entre 3 y 5 h, con un contenido de humedad entre el 20 al 30 %.

Posteriormente las cápsulas se depositaron en crioviales de 2 ml y se sumergieron en nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 30 y 60 min. El descongelamiento se llevó a cabo lentamente a temperatura ambiente; se sacaron de los crioviales y se colocaron en cajas petri bajo el aire de la campana de flujo laminar durante 5 min. Las cápsulas se sembraron en medios de cultivo de regeneración y se mantuvieron en oscuridad durante una semana, por ultimo las se pasaron a la sala de incubación.

Para determinar el contenido de humedad de las cápsulas al que se congela, se realizaron pruebas con cápsulas vacías, obteniendo el peso de cápsulas a intervalos regulares y posteriormente se procedió a graficar una curva de deshidratación estándar.

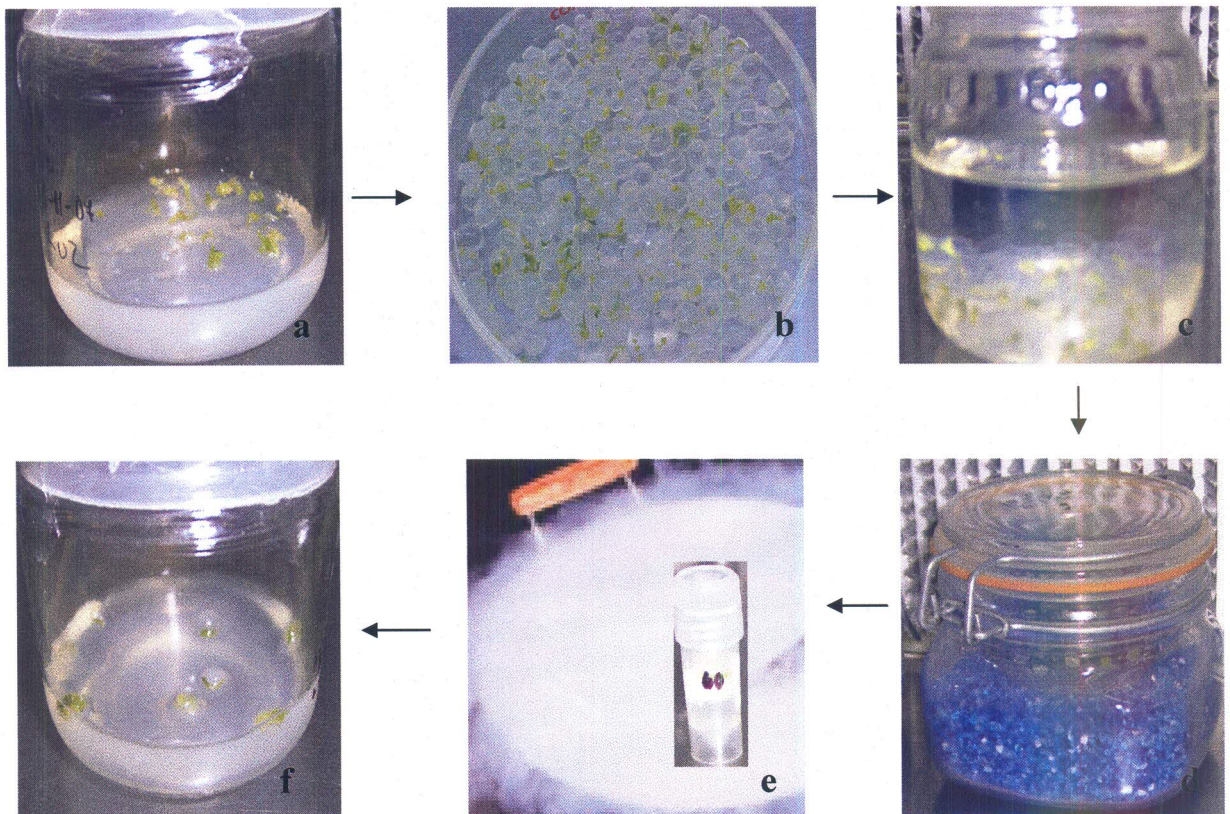


Figura 5. Protocolo de Encapsulación-deshidratación. a) Pre-cultivo. b) Encapsulación. c) Pre-tratamiento. d) Recuperación. e) Congelamiento. f) Deshidratación.

4.3.2 Vitricación

Al igual que el método de encapsulación, protocormos de 50 días después de la siembra se precultivaron en un medio solidó con altas concentraciones de sacarosa (0.3-0.6 M) durante 24 y 48 h. El tratamiento de carga consistió en poner los protocormos en una solución de 2 M de glicerol y 0.4 sacarosa durante 20 min. La deshidratación se realizó mediante una exposición a una solución de vitricación para plantas de 5 min hasta 1 h. La solución vitrificadora empleada fue PVS2 (30 % de glicerol, 15 % de DMSO, 15 % etilen glicol y 0.4 M sacarosa). Los protocormos fueron depositados en crioviales conteniendo 600 µL la solución PVS2, donde estuvieron expuestos durante 30 y 60 min., transcurrido ese tiempo se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido durante 30 y 60 min. Posteriormente las muestras se sumergieron en un baño de agua a 40 °C, durante 5 min. La remoción de la solución vitrificadora se hizo utilizando un medio líquido suplementado con 1.2 M de sacarosa, que se agregó progresivamente para diluir la solución vitrificadora. Por último, se recuperaron los explantes en medio de cultivo de regeneración y se mantuvieron la primera semana en oscuridad, después se pasaron a condiciones de incubación, el protocolo lo podemos observar en la Figura 6.

Las variables evaluadas en las pruebas de crioconservación se registraron dos semanas después de la siembra en medios de regeneración, esto es, una semana después de estar en condiciones de oscuridad y una semana después de estar en la sala de incubación, evaluándose las siguientes variables de sobrevivencia (S) y Regeneración (R).

El análisis estadístico de las variables evaluadas en crioconservación se realizó mediante un modelo probabilístico binomial, en donde se compararon nueve tratamientos en tres

etapas de desarrollo, para el caso de encapsulación-deshidratación y tres tratamientos y cinco etapas de desarrollo para el caso de vitrificación; se analizaron las proporciones y se compararon utilizando el estadístico con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

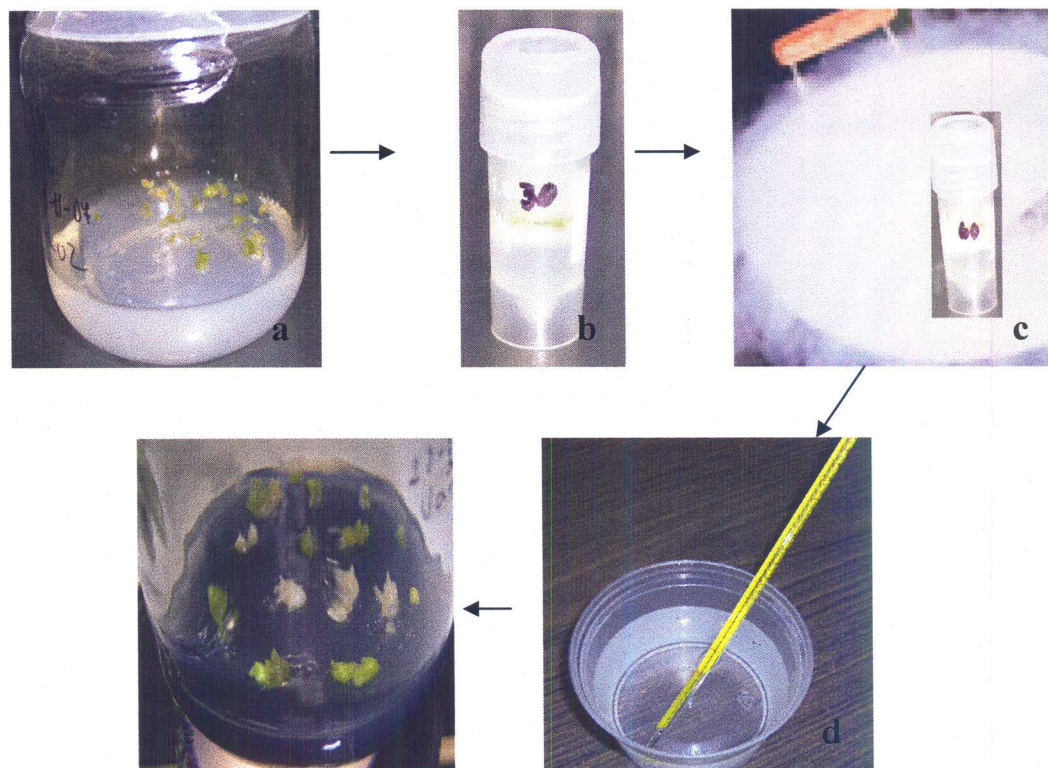


Figura 6. Protocolo de Vitrificación. a) Pre-cultivo. b) Deshidratación con PVS2. c) Congelamiento d) Recuperación. e) Descongelamiento

4.4 Caracterización molecular

4.4.1 Purificación de ADN

La extracción de ADN de plántulas de orquídeas se hizo con *Catleya aurantiaca* y *Laelia speciosa*, siete meses después de la siembra, cuando las plántulas alcanzaron un peso aproximado de 300 mg. A partir de la plántula completa, se tomaron 0.3 mg de tejido fresco para macerarlo en nitrógeno líquido; el tejido pulverizado se pasó a tubos de 1.5 ml, conteniendo 600 μ l de amortiguador de extracción con el que se mezcló,

agitando por unos segundos; se incubó a 60 °C por 10 min, con inversión ocasional de los tubos; se adiciono 200 µl de acetato de potasio 5 M, manteniéndolo en agitación por inversión y se dejó 30 min., después se centrifugo a 15,000xg durante 10 min. a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante a un tubo con 700 µl de isopropanol frío. Se mezcló por inversión y se dejó a -20 °C durante 30 min; en seguida se centrifugó por 5 min a 10,000xg a temperatura ambiente. Después de lo cual se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue disuelto en 200 µl de solución para diluir. Posteriormente se añadió 2 µl de ARNasa y se incubo a 37 °C por una h, se agregó 20 µl de acetato de sodio 3 M y 200 µl de isopropanol; se mezcló por inversión y se dejó a -20 °C por 2 h. Después se centrifugó por 5 min a 10,000xg a temperatura ambiente y el sobrenadante se elimino. El precipitado se lavo con 300 µl de etanol al 70 % y se dejó separar la pastilla, la cual se disolvió después en 100 µl de TE y se almacenó a 4 °C. En el cuadro 2, hace referencia a los reactivos empleados en la extracción de ADN y concentraciones a los cuales deben estar para llevar a cabo la de extracción de ADN.

Cuadro 2. Reactivos empleados en la preparación de amortiguadores.

REACTIVOS	AMORTIGUADORES
Amortiguador de extracción	Tris-HCl 100 mM, EDTA-Na ₂ 50 m, NaCl 500 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM, SDS 1.3 %, pH 8.0.
Solución para diluir	Tris-HCl 50 mM EDTA-Na ₂ 10 mM, pH 8.0.
ARNasa	10 mg/ml EN Tris-HCl 10 mM, CaCl ₂ mM, glicerol 50 % Ph 7.0. Antes de usar, hervir en baño de agua por 30 min.
Acetato de potasio	5 M
Acetato de sodio	3 M
Isopropanol frío	-20 ° C
Etanol	70 % (v/v)

4.4.2 Evaluación de la cantidad y calidad del ADN

Cuantificación de ADN

Utilizando ADN purificado de plantas, se hizo una dilución de 1:200. Una mezcla de 5 μl de ADN original con en 995 μl de agua bidestilada esteril dispuesto en un tubo eppendorf, se colocó en un espectrofotómetro Jenway 6305 UV/vis, previamente calibrado a 260 nm, posteriormente se limpió la celda con agua estéril y se procedió a colocar las muestras correspondientes y a medir la absorbancia de cada una de ellas. Con base en la concentración determinada del ADN se determinó la concentración en $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}$.

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}) = \frac{(Abs_{260})(200)(50\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1})}{1000}$$

Donde:

Abs_{260} = Absorbancia en nanómetros

200= Factor de dilución

$50\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ = 1 D. O. l

D.O= Densidad óptica

Una vez cuantificado el ADN, se verificó su integridad y calidad en un gel de agarosa al 0.8 % (p/v), para lo que se siguió el procedimiento siguiente:

Para saber cuantos μl de ADN original se necesita para cargar 1 μg en el gel se realizó el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{l de ADN original para cargar 1 } \mu\text{g; } = \frac{(1\mu\text{g} \cdot 1\mu\text{l de ADN})(1\mu\text{l})}{([\text{ADN}] \text{ en } \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1})}$$

Realizados todos los cálculos, se procedió a preparar el gel de calidad bajo la siguiente metodología:

Para la preparación de un gel de agarosa al 0.8 %, se colocó en un matraz con amortiguador de corrida TAE 1X (cuadro 3), que calentó en un horno de microondas para fundir la agarosa; se dejó enfriar hasta unos 50 °C y se vació en el portagel. Posteriormente se colocó el peine y se dejó enfriar hasta que solidificase. Se quitó el peine y se mezcló el ADN con el colorante de carga, se colocó cada muestra en los pozos del gel y se corrió la electroforesis a 100 V durante 10 min, permitiendo la entrada de las muestras al gel. Luego se ajustó el voltaje a 60 V, hasta finalizar la electroforesis. Finalmente el gel se extrajo de la cámara de electroforesis y se tiñó con una solución de bromuro de etidio y se documentarlo.

Cuadro 3. Soluciones utilizadas para teñir geles de agarosa

SOLUCIONES	REACTIVOS
Amortiguador	Tris-base 40 mM (pH 7.8), acetato de sodio 20 mM, EDTA 2 Mm (pH 8.0)
Amortiguador de carga	0.2 % azul de bromofenol (p/v) 0.2 % xileno cianol (p/v) 25 % glicerol (v/v) 5 Mm EDTA 50 Mm Tris-HCl (pH 8.0)
Bromuro de etidio	0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ en TAE 1X

4.4.3 Obtención de los patrones RAPD

Para la obtención de los patrones RAPD se probaron 20 iniciadores de la serie A (Operon Technologies inc. Alameda, California, USA), de los cuales se seleccionaron los 16 que mejor patrón de bandeo mostraron. Posteriormente se realizaron reacciones de PCR, donde la dilución correspondiente fue de 1:9 (iniciador:agua) de la que se preparó la cantidad requerida para cada reacción y llevándose a cabo las reacciones. Se realizó un gel de prueba con una cantidad de 30 ml de TE al 0.5 % al 0.8 % de agarosa, y se sometió a 77 V y 30 miliamp para la separación de las muestras.

4.4.3.1 Mezcla de reacción de la PCR para la obtención de los patrones RAPDs

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se agregaron 2 μL de ADN concentrado, al cual se le adicionó la cantidad de agua bidestilada estéril calculada con la fórmula. Volumen de agua para obtener una dilución de ADN a $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1} = (\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1} \text{ de ADN de la muestra original} * 2 \mu\text{l de ADN de la muestra original} / 10 \text{ ng})$, para obtener una dilución a 10 ng de ADN por 1 μl). La dilución preparada se utilizó para hacer las reacciones de PCR con los iniciadores seleccionados, se colocaron en un tubo eppendorf de 0.2 ml, adicionando 5 μl del ADN diluido a 10 ng y en un tubo de 1.5 ml se preparó la mezcla de reacción para un volumen total de 25 μl .

Con los reactivos referidos en el Cuadro 4, se realizó una mezcla para 15 reacciones en el cual se agregó la cantidad en μl indicada en cada caso, adicionando al final la enzima, se le da un vortex (mezcla en forma de remolino) y se agrega en cada tubo de reacción la cantidad de 21 μl , conteniendo 4 μl del ADN correspondiente. Se incubaron los tubos

eppendorf en el termociclador y se llevó a cabo la reacción de polimerización bajo las condiciones que se indican en el Cuadro 5.

Cuadro 4. Mezcla de reacción PCR para obtención de los patrones RAPDs.

REACTIVOS	1 X (μL)
Agua bidestilada estéril	4
dNTPs (500 μM)	10
Amortiguador 10 x	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1
Iniciador (10 pmol/μl)	3
ADN (10 ng/μl)	4
Enzima (Taq ADNpol, 5 u/μl)	0.5

Se observaron los patrones RAPDs luego de realizar electroforesis en un gel de agarosa a 1.2 % y teñido con bromuro de etidio. Los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y se documentaron. La comparación entre los genotipos se hizo evaluando las similitudes y las diferencias en los patrones de bandeo, asignando el valor de 0 a la ausencia y 1 a la presencia de una banda. Se cuantificó el número de bandas producto de la amplificación para cada iniciador, asignándose un número de acuerdo con la distancia de migración en el gel. Se realizó un registro de los patrones RAPD obtenidos con los 17 iniciadores para las dos especies y con esa información se construyó la matriz básica de datos (MBD).

Cuadro 5. Programa térmico de PCR

FASE	TEMPERATURA (°C)
Pre-desnaturalización	94
Desnaturalización	94
Alineamiento	37
Extensión	72
Extensión final	72

4.4.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los patrones de RAPD, se utilizaron los patrones de bandeo generados por los productos de los iniciadores, se construyó la matriz básica de datos (MBD), donde, en las columnas se colocaron las 195 bandas producto de los 17 iniciadores y en las filas a los dos genotipos con 15 muestras de cada uno de ellos. A partir de la MBD se calculó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard (1908), la cual se utilizó para la construcción de un dendrograma y la elaboración de 1000 remuestreos (bootstrapping) para finalmente llegar a obtener un dendrograma de mayor robustez, con el uso del programa de NTSYS-Pc versión 2.2.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Micropropagación *in vitro* de la orquídea *Laelia speciosa*

5.1.1 Germinación *in vitro*

El proceso de germinación comprende diversas etapas, lo cual esta en función de la especie (Arditti J. 1977). Para el caso de *L. speciosa*, se tomaron en cuenta cuatro etapas, las cuales corresponden a las cuatro primeras variables estudiadas (hinchamiento del embrión, apertura de la testa, protocormo con una hoja, protocormo con dos hojas, germinación total y semillas sin germinar). Miyoshi y Mii (1995) evaluaron el proceso de germinación en *Calanthe discolor*, dividiéndolo en cuatro categorías:

1. Estado no germinado, en esta etapa no ocurre crecimiento del embrión.
2. Estado de pregerminación, los embriones se hinchan y se amplía la cubierta.
3. Estado de germinación, en esta etapa el embrión emerge de la cubierta.
4. Estado de protocormo, el embrión es completamente liberado de la cubierta.

Con base en la información anteriormente presentada se tomaron en cuenta cuatro etapas durante el proceso de germinación de semillas, las cuales son las que se consideraron para el estudio de *L. speciosa*, concluyendo con la formación de protocormos y el desarrollo de primeros primordios foliares.

5.1.1.1 Hinchamiento del embrión

La primera etapa considerada durante el proceso de germinación fue el momento en el cual el embrión absorbe agua a través de la testa aumentando en volumen, esto es, cuando los embriones comienzan a hincharse (Pierik, 1990). Durante las evaluaciones

correspondientes, los siete medios de cultivo *in vitro* influyeron diferencialmente en el hinchamiento de embrión, en las cinco fechas de evaluación (Cuadro 6). Las condiciones: BA + Vitaminas, AIA + Vitaminas y Extracto de malta indujeron favorablemente el mayor hinchamiento de embriones, en la quinta fecha de evaluación; en otros tratamientos la proporción de hinchamiento del embrión fue de 0.52 a 0.62. Al parecer, la adición de complementos (vitaminas, reguladores de crecimiento y aditivos) a los medios de cultivo influye favorablemente para inducir la absorción de agua.

Cuadro 6. Comparación de las proporciones en la etapa de hinchamiento (HE) del embrión de siete tratamientos y cinco fechas de evaluación durante el proceso de germinación de semillas de *L. speciosa*.

Tratamientos	HE-1	HE-2	HE-3	HE-4	HE-5
1. BA + Kinetina	0.06 c	0.10 c	0.18 c	0.34 c	0.52 d
2. BA + AIA	0.06 c	0.18 c	0.30 c	0.36 c	0.50 d
3. BA + Vitaminas	0.44 a	0.60 a	0.70 a	0.92 a	1.00 a
4. Kinetina + AIA	0.02 c	0.14 c	0.28 c	0.46 c	0.62 d
5. AIA + Vitaminas	0.34 a	0.52 a	0.64 a	0.84 a	0.96 b
6. Extracto de malta	0.46 a	0.64 a	0.78 a	0.88 a	1.00 a
7. Sulfato de adenina	0.16 b	0.32 b	0.46 b	0.60 b	0.76 c

* Los promedios de cuatro repeticiones corresponden al porcentaje de ocurrencia del evento. HE1 hasta HE5 corresponde a las cinco fechas de toma de datos. Valores con la misma letra son iguales estadísticamente con un α de 0.05.

5.1.1.2 Apertura de la testa

Las condiciones: BA + Vitaminas, AIA + Vitaminas y Extracto de malta, favorecieron en la ultima toma de datos la mayor apertura de testa (0.94-0.96) respecto de otras condiciones ensayadas (0.36-0.42) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de proporciones en la etapa de apertura de la testa (AT) de siete tratamientos y cinco fechas de evaluación durante el proceso de germinación de semillas de *L. speciosa*.

Tratamientos	AT-1	AT-2	AT-3	AT-4	AT-5
1. BA + Kinetina	0.00 [*] c	0.02 c	0.08 c	0.24 c	0.42 c
2. BA + AIA	0.00 c	0.08 d	0.18 b	0.24 c	0.36 c
3. BA + Vitaminas	0.28 a	0.42 a	0.56 a	0.80 a	0.94 a
4. Kinetina + AIA	0.00 c	0.02 d	0.18 b	0.32 c	0.50 c
5. AIA + Vitaminas	0.22 a	0.28 b	0.50 a	0.68 a	0.94 a
6. Extracto de malta	0.32 a	0.48 a	0.64 a	0.78 a	0.96 a
7. Sulfato de adenina	0.08 b	0.20 c	0.28 b	0.48 b	0.64 b

* Los promedios de cuatro repeticiones corresponden al porcentaje de ocurrencia del evento. AT1 hasta AT5 corresponde a las cinco fechas de toma de datos. Valores con la misma letra son iguales estadísticamente con un α de 0.05.

Considerando que el hinchamiento del embrión y la apertura de la testa de semillas de *L. speciosa* se estimulan mejor con la presencia de reguladores de crecimiento, vitaminas y extracto de malta en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), resulta claro que ambas condiciones químicas: medio de cultivo y aditivos tienen un papel decisivo en las primeras fases de la germinación. Al respecto en otros trabajos se ha mostrado que el

medio MS es el mejor para la germinación de semillas de orquídeas (Zeigler, 1967). Para el caso de *L. speciosa* se reporta que el medio basal MS es mejor que cuando se adicionan reguladores de crecimiento (Ávila y Salgado-Garciglia, 2000) Con estos antecedentes y los encontrados de esta etapa del trabajo hay duda de que la adición de vitaminas y extracto de malta son estimuladores de la germinación de *L. speciosa*.

Respecto a rompimiento de testa a los 60 días después de la siembra, en 4 etapas de evaluación, se produjo el rompimiento de la testa con un resultado total de 38 semillas que rompieron la testa de un total de 40, la razón fue que la testa al ser una estructura reticulada que cubre al embrión y esta compuesta por células indiferenciadas con cuerpos lipídicos y proteínas y al entrar en contacto con el medio de cultivo comienza a desarrollarse y activarse, lo que ocasiona el rompimiento de testa, para posterior formar protocormos y después plántulas. Este resultado tiene relación con lo afirmado por Pierik 1989, cuando menciona que el proceso de rompimiento de testa es rápido y se da por las condiciones ambientales controladas.

5.1.1.3 Protocormo con una hoja

Las condiciones: BA + Vitaminas y Extracto de malta se presentan como las mejores condiciones para inducir la formación de hojas en la quinta toma de datos (0.92-0.96), con respecto a las otras condiciones ensayadas (0.24-0.26) (Cuadro 8).

La adición de vitaminas, reguladores de crecimiento como BA y extracto de malta adicionadas al medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), presentan condiciones ideales para la formación de brotes (desarrollo de hojas), incluyendo el desarrollo de

raicillas. Comparado con otros trabajos realizados en donde mencionan que las auxinas (ANA) y citoquininas (BAP) actúan directamente en el desarrollo de las plántulas, hojas e induce la salida de raíces, gracias a que las hormonas actúan en los procesos fisiológicos y metabólicos específicos dentro de un órgano (Arditti, 1990).

Cuadro 8. Comparación de las proporciones en la etapa de protocormo con una hoja (P1H) de siete tratamientos y cinco fechas de evaluación durante el proceso de germinación de semillas de *L. speciosa*.

Tratamientos	P1H-1	P1H-2	P1H-3	P1H-4	P1H-5
1. BA + Kinetina	0.00 a	0.00 c	0.04 b	0.14 c	0.26 c
2. BA + AIA	0.00 a	0.02 c	0.08 b	0.14 c	0.24 c
3. BA + Vitaminas	0.12 a	0.28 a	0.42 a	0.68 a	0.92 a
4. Kinetina + AIA	0.00 a	0.00 c	0.10 b	0.20 c	0.30 c
5. AIA + Vitaminas	0.08 a	0.10 b	0.26 b	0.58 a	0.84 a
6. Extracto de malta	0.20 a	0.36 a	0.50 a	0.68 a	0.96 a
7. Sulfato de adenina	0.02 a	0.10 b	0.18 b	0.38 b	0.58 b

* Los promedios corresponden al porcentaje de ocurrencia del evento en cada tratamiento, con cuatro repeticiones. P1H1 hasta P1H5 corresponde a las cinco fechas de toma de datos. Valores con la misma letra son iguales estadísticamente con un α de 0.05.

5.1.1.4 Protocormo con dos hojas

La adición de extracto de malta adicionado al medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), favorece en la formación y desarrollo de hojas, siendo este, el que presenta el valor mas alto (0.96), con respecto a los demás ensayos que presentan los valores mas bajos obtenidos (0.14) (Cuadro 9). El extracto de malta presenta buenas características

para el desarrollo de protocormos, debido a que el medio de cultivo MS suplementado con dicho aditivo se reporta como el mejor en el desarrollo de protocormos para otras especies de orquídeas (Aguilar, 2006).

Cuadro 9. Comparación de las proporciones en la etapa de protocormo con dos hojas (P2H) de siete tratamientos y cinco fechas de evaluación durante el proceso de germinación de semillas de *L. speciosa*.

Tratamientos	P2H-1	P2H-2	P2H-3	P2H-4	P2H-5
1. BA + Kinetina	0.00 a	0.00 c	0.00 d	0.04 c	0.14 d
2. BA + AIA	0.00 a	0.00 c	0.00 d	0.06 c	0.14 d
3. BA + Vitaminas	0.02 a	0.18 a	0.32 a	0.58 a	0.84 b
4. Kinetina + AIA	0.00 a	0.00 c	0.04 c	0.10 c	0.14 d
5. AIA + Vitaminas	0.00 a	0.00 c	0.14 b	0.46 a	0.74 b
6. Extracto de malta	0.06 a	0.24 a	0.40 a	0.58 a	0.96 a
7. Sulfato de adenina	0.00 a	0.04 b	0.08 c	0.28 b	0.50 c

* Los promedios corresponden al porcentaje de ocurrencia del evento en cada tratamiento, con cuatro repeticiones. P2H1 hasta P2H5 corresponde a las cinco fechas de toma de datos. Valores con la misma letra son iguales estadísticamente con un α de 0.05.

Es bien conocido que la adición de auxinas:citocinas a las plantas, influye en el desarrollo de las mismas, es por ello que actualmente se utilizan algunos reguladores de crecimiento o aditivos para estimular el desarrollo de PLBs como son los siguientes; ANA 0.1 mg·l + BA 1 mg·l (Serrano, 2004), extracto de malta (500 mg·l⁻¹) + kinetina (0.3 mg·l⁻¹), caseína hidrolizada (500 mg·l⁻¹) + kinetina (0.3 mg·l⁻¹), sulfato de adenina

(160 mg·l⁻¹) + BA (0.3 mg·l⁻¹), 2,4-D (0.3 mg·l⁻¹), 2,4-D (0.1 mg·l⁻¹), BA (0.3 mg·l⁻¹), sulfato de adenina (80 mg·l⁻¹) y BA (0.3 mg·l⁻¹) (Aguilar, 2006).

5.1.1.5 Semillas germinadas y sin germinar

El sulfato de adenina influyo mas en la germinación (6.32) (Cuadro 10) con respecto a las demás condiciones químicas, por lo tanto, se presenta como el mejor medio en cuanto a germinación de semillas. En algunos casos la combinación regulador de crecimiento + regulador de crecimiento, favorece el proceso de PLBs pero en otros es la combinación regulador de crecimiento + extracto de malta, regulador de crecimiento + caseína hidrolizada. En *L. speciosa*, solo el medio basal MS con reguladores de crecimiento se estimula los PLBs.

Cuadro 10. Comparación de proporciones del total de la semilla germinada (G) y sin germinar (SG) de siete tratamientos en *L. speciosa*.

Tratamientos	G	SG
1. BA + Kinetina	4.78 d	5.22 a
2. BA + AIA	4.20 d	5.80 a
3. BA + Vitaminas	5.64 b	4.36 c
4. Kinetina + AIA	5.28 c	4.72 b
5. AIA + Vitaminas	5.20 c	4.80 b
6. Extracto de malta	5.30 c	4.70 b
7. Sulfato de adenina	6.32 a	3.68 d

* Los promedios de cuatro repeticiones corresponden al porcentaje de ocurrencia del evento. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con un α de 0.05.

Las proporciones altas de semillas sin germinar correspondieron a las combinaciones BA + kinetina y BA + AIA, seguidas de kinetina + AIA, esto refleja que los reguladores de crecimiento no juegan un papel decisivo en inducir la germinación, pero si en el desarrollo de las plántulas.

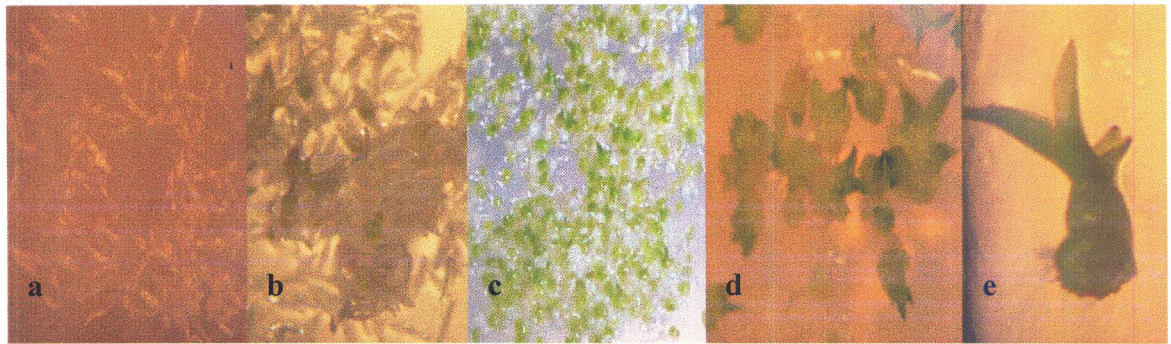


Figura 7. Proceso de germinación de semillas de *L. speciosa*. a) Semillas sin germinar. b) Semillas en etapa de hinchamiento del embrión. c) Semillas en etapa de germinación. d) Semillas en desarrollo de protocormos. e) Protocormos con dos hojas e inicio de formación de la raíz.

El porcentaje de germinación está en función de diversos factores, la viabilidad de la semilla, lo que a su vez, está influenciado por la madurez de las cápsulas al momento de colectarlas. Lee y Lee (1991) reportan que la germinación en semillas de orquídeas cultivadas *in vitro* a partir de cápsula varía dependiendo de la madurez de ésta y del tipo de orquídea; sin embargo, se indica que germinan entre 30 y 60 días de cultivo. La etapa de germinación de semillas de *L. speciosa* concluyó a los 50 días con un promedio de 55 % de semillas germinadas en general, debido a que se emplearon cápsulas verdes y éstas presentan un porcentaje mejor de semillas viables.

5.1.2 Multiplicación *in vitro*

La fase de multiplicación consistió en establecer el mejor medio de cultivo que proporcionara las condiciones ideales para la inducción de nuevos brotes, a partir de la

siembra de un solo explante. El efecto de los tratamientos en las variables evaluadas muestra, de manera general, que no existen diferencias significativas en lo que respecta a longitud de brotes, longitud de raíz, número de hojas y vigor de la plántula; pero el número de brotes y de raíces si fueron influidos por las condiciones químicas ensayadas.

Para la variable número de brotes: la adición de 2,4-D + kinetina agregado al medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), presento el mayor numero de brotes (39 brotes), mientras que con caseina + kinetina se registro la respuesta mas pobre (10 brotes). Contrario a esta tendencia, el mayor numero de raíces se logro con la adición de caseina + kinetina y el número de ellas disminuyo en la condición en la que hubo mas brotes (Cuadro 11). Estos resultados nos reflejan el efecto favorable para una variable pero desfavorable para otra por lo que es de suma importancia evaluar las concentraciones a las cuales se adicionen al medio de cultivo y evaluar el efecto de las mismas, asta encontrar aquellas en donde se presenten favorables para la multiplicación.

Cuadro 11. Estadístico T de Kruskal-Wallis para efecto de tres tratamientos de multiplicación de *L. speciosa* para seis variables.

Tratamientos	NB	LB (cm)	NR	LR (cm)	NH
1. 2,4-D + kinetina	38.5 a	19.0 a	2.1 a	16.0 a	2.1 a
2. Extracto de malta + kinetina	29.5 a	32.0 a	1.9 a	29.0 a	3.6 a
3. Caseina hidrolizada + kinetina	10.0 b	27.0 a	3.8 b	33.0 a	2.1 a

Variables: numero de brotes (NB), longitud de brotes (LB), numero de raíz (NR), longitud de raíz (LR) y numero de hojas (NH). Valores con la misma letra son estadísticamente con un α de 0.05.

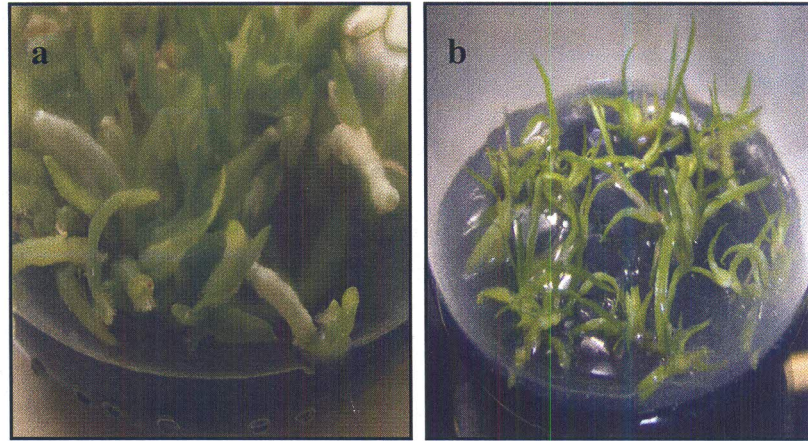


Figura 8. Multiplicación *in vitro* de la orquídea *L. speciosa*. a) Después de los seis meses de siembra. b) Desarrollo de plántulas *in vitro* después de los 8 meses de siembra.

La adición de auxina:citocinina (en una relación 1:2) se utiliza para promover la división celular, para inducir y acelerar el proceso de formación de cuerpos protocórmicos. Las auxinas tienen la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos (Krikorian, 1991a). Las citocininas son generalmente utilizadas para estimular el crecimiento y el desarrollo; promueven división celular, especialmente si son adicionadas junto con una auxina (Pierik, 1987). Lo anterior nos permite comprender el efecto que se obtuvo en la combinación de 2,4-D + kinetina lo que indujo alto número de brotes, pero también se encontró un efecto favorable en la combinación de extracto de malta y kinetina para la inducción de protocormos, especialmente el empleo de extracto de malta no se tiene reportes de su efecto en la expresión de los explantes a la formación de nuevos protocormos, por su parte la kinetina es una sustancia estimuladora de la división celular (Krikorian, 1991a), por lo que se emplea en las tres condiciones químicas de cultivo.

5.1.3 Aclimatación

En las variables vigor y color de plántula, no se detectaron diferencias significativas, pero se registraron efectos significativos en las variables: AP, NR y LR.

De los sustratos empleados en aclimatación tezontle + peat most, tezontle rojo, corteza de pino + peat most, favorece que las plantas sean altas, aunque en tezontle rojo el numero de hojas es mayor; mientras que tezontle + peat most el desarrollo radicular (numero y longitud de raíz) es mucho mejor, esto se debe principalmente a la porosidad del sustrato, lo cual proporciona una mejor disponibilidad de humedad al momento en el cual las plántulas lo requieren y sin ocasionar exceso que pueden afectar considerablemente, ya que las orquídeas son en particular muy sensibles a excesos de humedad, es por ello que los sustratos que nos proporcionen una adecuada retención de humedad son los adecuados para la fase de aclimatación de plántulas.

Cuadro 12. Estadístico T de Kruskal-Wallis para efecto de cuatro tratamientos en la etapa de aclimatación de *L. speciosa* y seis variables.

Tratamientos	AP (cm)	NH	NR	LR (cm)	VP
1. Tezontle rojo	5.4 b	7.0 b	5.5 b	4.0 a	2.9 a
2. Tezontle rojo + peat most	6.4 b	4.9 a	8.0 c	8.2 c	2.9 a
3. Corteza de pino + peat most	5.4 b	3.3 a	2.8 a	5.3 b	2.1 a
4. Peat most + vermiculita	3.7 a	5.8 ab	4.5 b	3.4 a	2.9 a

Variables: AP: altura de la planta, NH: numero de hojas, NR: numero de raíz NR, LR: longitud de raíz, VP: y vigor de la plántula VP. Valores con la misma letra son estadísticamente con un α de 0.05.

Existe efecto en el tipo de sustrato empleado para el transplante de plántulas de *L. speciosa* debido a que algunos de éstos presentan características de mayor retención de humedad, lo cual es muy importante en los primeros días del transplante ya que es una etapa crítica en la cual las condiciones deben ser muy controladas principalmente la humedad y la disponibilidad de agua en las raíces. Se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia del 80 %, para el caso en el que se empleó como sustrato tezontle rojo y en la combinación de peat most y vermiculita debido a la buena retención de agua que éstos presentan. En el caso de *L. speciosa*, la sobrevivencia es hasta de un 98%, debido a que las plántulas *in vitro* se mantienen por 20 días en condiciones de invernadero previo a su transplante (Ávila, 2006).

5.2 Pruebas de Crioconservación de la Orquídea *Laelia speciosa*

5.2.1 Encapsulación-Deshidratación

Curva de deshidratación estándar para dos concentraciones de sacarosa

En la Figura 9 se observa la curva de deshidratación de cápsulas sometidas a pre-tratamiento de 0.75 M y 1 M de sacarosa, las cuales presentaron mejores resultados durante el proceso de deshidratación.

De la curva de deshidratación se observa que a mayor concentración de sacarosa el peso es menor, esto se debe a que el efecto del azúcar se ve reflejado como la eliminación de mayor contenido de agua de las cápsulas, aspecto favorable para el congelamiento de las mismas y disminuye el riesgo de daño en los tejidos.

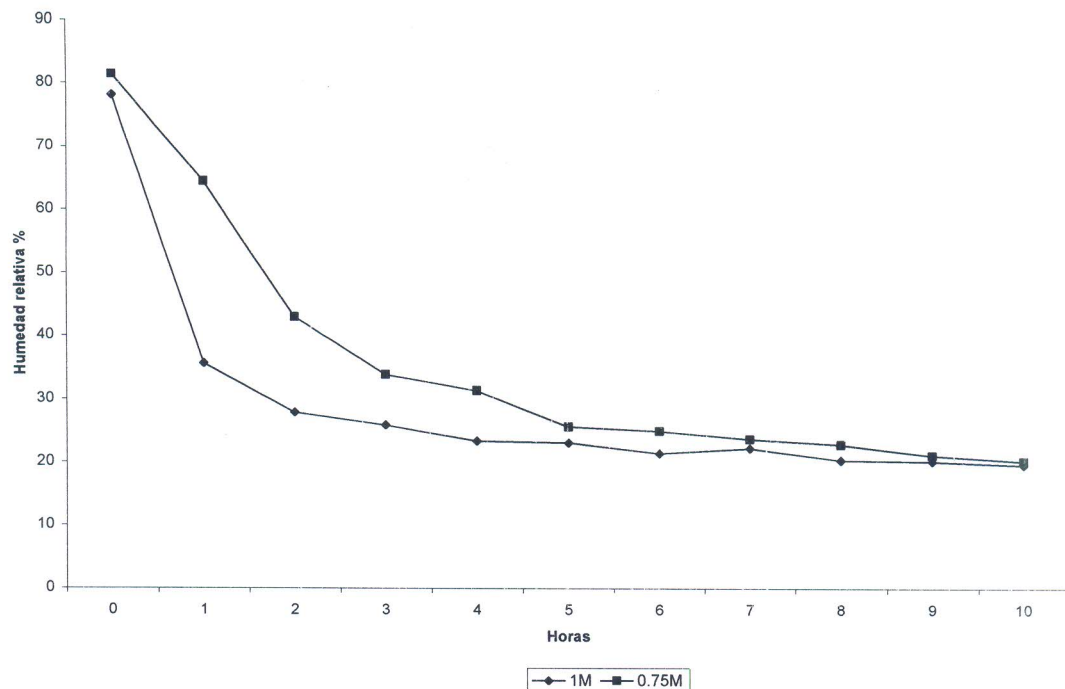


Figura 9. Curva de deshidratación estándar de capsulas

La deshidratación de la semilla tiene como finalidad reducir el contenido de humedad de la misma para que a su vez reduzca, por un lado, la posibilidad de contaminación de la semilla (por hongos), y por otro lado, la de evitar daños (por ruptura celular) por la entrada y salida de agua en el embrión durante el período de almacenamiento (Ossenbach *et al.*, 2006). De acuerdo con la gráfica, el porcentaje de humedad que se requiere se encuentra entre 20 y 30 %, lo cual se alcanza a las 4 y 7 h de desecación en botes sellados con silica gel para 0.75 M de sacarosa, más concretamente a las 5 h obteniéndose un 25 % de humedad, ideal para congelar; para el caso de 1 M de sacarosa, entre las 5 y 6 h se obtuvo el 21 y 25 % de humedad. Estos datos, dan un margen de tiempo en el cual se ponen las cápsulas en sílica gel y alcanzan la humedad requerida.

Sobrevivencia en la técnica de encapsulación-deshidratación

Después de congeladas las cápsulas se procedieron a sembrarlas en un medio sólido de regeneración de orquídeas, y se pusieron en completa oscuridad durante una semana, transcurrido el tiempo se procedió a tomar los datos de sobrevivencia de cada uno de los tratamientos. Mediante el estadístico Z de una binomial, se compararon los porcentajes de sobrevivencia de los nueve tratamientos (Cuadro 13). En la fase de pre-tratamiento con 0.75 M de sacarosa dió el más alto valor de sobrevivencia (100 %) y el tratamiento que utiliza 1 M de sacarosa presentó un 30 % de sobrevivencia siendo éste el valor más bajo obtenido.

Cuadro 13. Comparación de proporciones de sobrevivencia en nueve tratamientos y tres etapas de la técnica de encapsulamiento-deshidratación de protocormos de *L. speciosa*.

Tratamientos	Pre-cultivo	Deshidratación	+NL(Nitrógeno liquido)
1. 0.5 M sacarosa.	0.50* b	1.0 b	0.80 a
2. 0.75 M sacarosa.	1.00 e	1.0 b	1.00 c
3. 0.75 M sacarosa.	0.80 d	1.0 b	0.80 a
4. 1.0 M sacarosa.	0.30 a	0.2 a	0.90 b
5. 1.2 M sacarosa.	0.50 b	1.0 b	0.90 b
6. Oscuridad	0.40 a	1.0 b	0.80 a
7. Luz	0.40 a	1.0 b	0.70 a
8. ANA	0.60 c	1.0 b	0.85 a
9. BA	0.33 a	1.0 b	0.90 b

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Kruskal y Wallis con α de 0.05.

En la fase de deshidratación de cápsulas con 1 M de sacarosa da un porcentaje de sobrevivencia de 20 % siendo el valor mas bajo obtenido, y muestra que los demás tratamientos se obtuvieron un porcentaje de 100 % de sobrevivencia, lo que indica que 3 y 5 h de deshidratación en sílica gel es favorable para la sobrevivencia de cápsulas. Al realizar el tratamiento con nitrógeno líquido, se presenta una sobrevivencia de 100 % en el tratamiento 0.75 M de sacarosa, aunque de manera general todos los tratamientos muestran un porcentaje de sobrevivencia aceptable entre 80 y 100 %.

El tratamiento con 0.75 M de sacarosa presentó el mejor porcentaje de sobrevivencia en las tres etapas de la técnica de encapsulación-deshidratación, debido a que al someter las cápsulas a esta concentración proporciono buena protección de protocormos, evitando daños al tejido. El pretratamiento de las cápsulas fue durante 24 h con sacarosa a 0.75M, lo cual disminuyó la deshidratación (20 °C, al 30 % RH) y aumentó la supervivencia de semillas. Posteriormente fueron transferidas a crioviales y almacenadas a -196 °C, con un 20 % de humedad, las cápsulas mostraron 5 % y 45 % de regeneración, respectivamente; posteriormente fueron almacenadas a -20 °C, -70 °C durante 30 días obteniendo los mismos valores de sobrevivencia (Wood *et al.*, 2000). Los resultados indican oportunidades para el empleo de la crioconservación para diversos taxa.

Regeneración en la técnica de encapsulación-deshidratación

Utilizando el mismo análisis estadístico, se compararon las proporciones de regeneración de los tratamientos en las dos etapas de encapsulación-deshidratación que son precultivo y deshidratación (Cuadro 14).

La regeneración de las cápsulas fue una fase más complicada en ambas técnicas de crioconservación, por lo que sólo se contempla pre-cultivo y deshidratación ya que en nitrógeno líquido la regeneración fue nula. En la fase de deshidratación, se observó que el utilizar 0.5 M, 1 M y 1.2 M de sacarosa se obtuvo el 100 % de regeneración, mientras que para otros tratamientos la regeneración de las cápsulas fue disminuyendo. Para la deshidratación utilizar 0.75 M de sacarosa fue la condición que presentó un mejor porcentaje de regeneración, Flachslund (2006) emplea protocormos cultivados *in vitro* de *Oncidium bifolium* para crioconservar, obteniendo el 11.3 % para la producción de plantas y Praweena *et al.* (2007) utilizando protocormos de orquídea tailandesa, *Cleisostoma arietinum* (Rchb.f), obtienen un 49 % de regeneración.

Cuadro 14. Comparación de proporciones de regeneración en nueve tratamientos y dos etapas de encapsulación-deshidratación de protocormos de *L. speciosa*.

Tratamientos	Pre-cultivo	Deshidratación
1. 0.5 M sacarosa.	1.0* d	0.33 a
2. 0.75 M sacarosa.	0.75 c	0.80 c
3. 0.75 M sacarosa.	1.0 d	0.80 c
4. 1.0 M sacarosa.	0.1 a	0.33 a
5. 1.2 M sacarosa.	1.0 d	0.50 b
6. Oscuridad	0.72 c	0.40 a
7. Luz	0.72 c	0.40 a
8. ANA	0.72 c	0.60 b
9. BA	0.5 b	0.33 a

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Kruskal y Wallis con un α de 0.05.

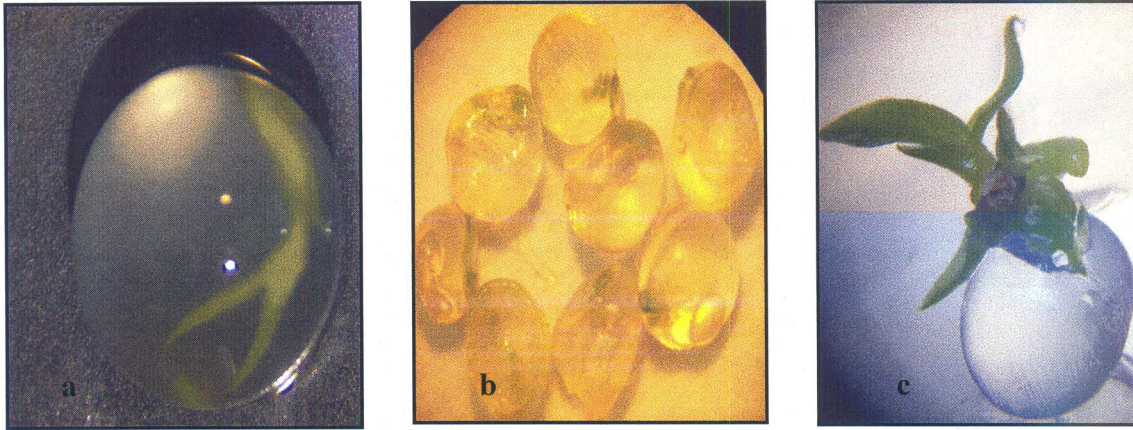


Figura 10. Técnica de encapsulamiento-deshidratación. a: Encapsulamiento de protocormos, b: Deshidratación de capsulas, c: Regeneración de protocormos encapsulados

5.3.1 Vitricación

La técnica de vitricación permite eliminar la humedad de los tejidos para que al someterlos a congelación no se formen cristales de hielo en las células y dañe el tejido.

Sobrevivencia en la técnica de vitricación

De acuerdo con los resultados presentados al Cuadro 15, el tratamiento de carga al cual se somete los tejidos antes de ponerlo en la solución vitrificadora, no tiene efectos negativos en la sobrevivencia de los tejidos, ya que presentan una sobrevivencia de 95 y 100 %.

Cuadro 15. Comparación de proporciones de sobrevivencia en tres tratamientos y tres etapas de la técnica de vitrificación en protocormos de *L. speciosa*.

Tratamientos	TC	PVS2 (30 min)	PVS2 (60 min)	+ NL(30 min)	+ NL(60 min)
1. 0.3 M sacarosa- Obscuridad	10.0* a	8.0 b	10.0 c	6.5 b	8.0 b
2. BA + ANA	10.0 a	7.5 a	8.0 b	5.0 a	7.0 a
3. 0.3 M sac-luz	9.5 b	8.0 b	2.0 a	10.0 c	10.0 c

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Kruskal y Wallis con un α de 0.05. TC: Tratamiento de carga, PVS2: Solución vitrificadora de plantas 2, +NL: Sumersión en Nitrógeno Líquido.

Se encontraron diferencias en cuanto al tiempo al cual se exponen los tejidos a la solución vitrificadora ya que, para el caso de ésta especie de orquídea, al someterlos más tiempo (60 min) a la solución, presentan mayor porcentaje de sobrevivencia hasta un 100 % con respecto a 30 min, que en dos, de los tres tratamientos fue de 80 %. Esto también se ve reflejado al momento de poner los tejidos a NL, ya que los mejores porcentajes de sobrevivencia se obtuvieron con 60 min de exposición a PVS2, con valores superiores al 70 %. Protocormos de *Doritis pulcherrima* Lindl, criopreservados utilizando PVS2, presentan viabilidad del 86 % después de la preservación (Hirano *et al.*, 2005). El efecto de la sacarosa se muestra como el mejor para inducir los tejidos al progresivo estrés al cual se someten para la criopreservación.

Regeneración en la técnica de vitrificación

Los porcentajes de regeneración fueron menores con respecto a la técnica anterior, el efecto del tratamiento de carga no fue muy significativo, ya que se muestra similares en

ambos casos, entre el 85 y 90 %; los porcentajes de sobrevivencia fueron muy bajos (20 y 30 %) al someterlos a la solución vitrificadora durante 30 min (Cuadro 16).

Pero al someter los tejidos por un mayor tiempo a la solución vitrificadora (60 min), se obtienen mejores porcentajes de regeneración 60 y 100 %. Protocormos de *D. pulcherrima*, se crioconservaron utilizando PVS2 mostraron viabilidad de 62% después de la preservación (Hirano *et al.*, 2005).

Cuadro 16. Comparación de proporciones de regeneración en vitrificación de protocormos de *L. speciosa*.

Tratamientos	TC	PVS2 (30min)	PVS2 (60min)
1. 0.3 M sac.-Obscuridad	8.5* a	3.0 b	10.0 c
2. BA + ANA	9.0 b	2.0 a	6.0 b
3. 0.3 M sac-luz	8.0 a	3.0 b	1.5 a

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con un α de 0.05. TC (Tratamiento de carga), PVS2 (Solución vitrificadora de plantas 2).

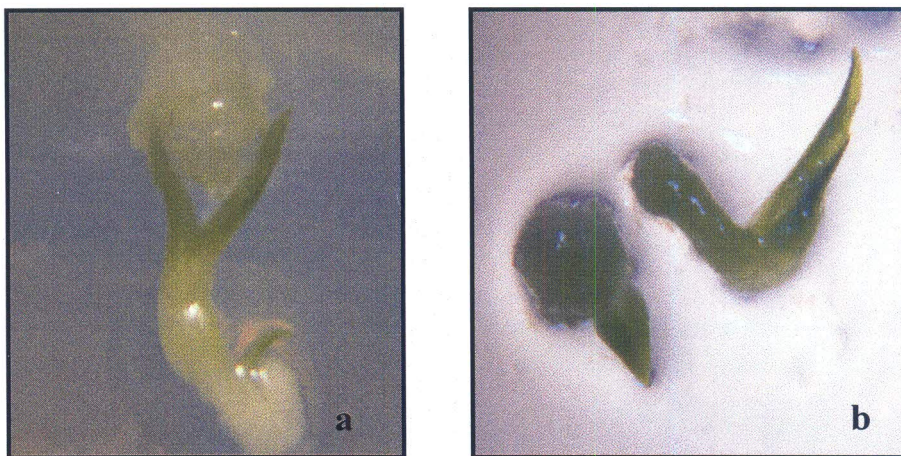


Figura 12. Vitrificación de protocormos de la orquídea *L. speciosa*. a y b: Protocormos después de someterlos a crioconservación.

5.3 Caracterización Molecular de *C. aurantiaca* y *L. speciosa*

5.3.1 Cuantificación de ADN

Después de realizar la extracción de ADN se procedió a la cuantificación de las 30 accesiones para verificar la cantidad de ADN en $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}$ y su calidad, mediante un espectrofotómetro.

En el Cuadro 17 y 18, se encuentran los valores de absorbancia, los cuales presentan una buena cantidad de ADN (0.20-0.89 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}$) y de calidad aceptable solo en un caso tenemos un valor de 0.200 y los demás resultados van 0.026-0.089 en absorbancia a 260 nm., lo cual se presentan como aceptables para llevar a cabo las reacciones de PCR necesarias.

Cuadro 17. Valores obtenidos de absorbancia de cada muestra de ADN para *C. aurantiaca*.

<i>Catleya aurantiaca</i>	Abs. 260nm	$\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^*$	2 μg^{**}	10 ng·2 μl ***
1	0.075	0.75	2.66	150
2	0.086	0.86	2.33	172
3	0.089	0.89	2.25	178
4	0.200	0.20	10	40
5	0.026	0.26	7.69	52
6	0.033	0.33	6.06	66
7	0.028	0.28	7.14	56
8	0.032	0.32	6.25	64
9	0.028	0.28	7.14	56
10	0.029	0.29	6.89	58
11	0.033	0.33	6.06	66
12	0.039	0.39	5.13	78
13	0.033	0.33	6.06	66
14	0.037	0.37	5.41	74
15	0.031	0.31	6.45	62

* Concentración (DNA) $\mu\text{g}/\text{ml} = \frac{\text{DO260} \times \text{F dilución} \times 50}{1000}$

** Cantidad en μL de cada muestra para cargar en el gel 2 μg de ADN.

*** Diluciones: cantidad de agua para tener una concentración final de 10 ng en 2 μL .

Cuadro 18. Valores obtenidos de absorbancia de cada muestra de ADN para *L. speciosa*.

<i>Laelia speciosa</i>	Abs. 260nm	µg·µl*	2 µg**	10 ng·2µl ***
1	0.063	0.63	3.17	126
2	0.057	0.57	3.51	114
3	0.094	0.94	2.13	188
4	0.056	0.56	3.57	112
5	0.066	0.66	3.03	132
6	0.072	0.72	2.77	144
7	0.073	0.73	2.74	146
8	0.082	0.82	2.44	164
9	0.046	0.46	4.34	92
10	0.055	0.55	3.64	110
11	0.053	0.53	3.77	106
12	0.062	0.62	3.22	124
13	0.045	0.45	4.44	90
14	0.060	0.60	3.33	120
15	0.052	0.52	3.85	104

* Concentración (DNA) µg/ ml = $\frac{DO_{260} \times F \text{ dilución} \times 50}{1000}$

** Cantidad en µL de cada muestra para cargar en el gel 2 µg de ADN.

*** Diluciones: cantidad de agua para tener una concentración final de 10 ng en 2 µL.

5.3.2 Verificación del gel de calidad

Después de realizar la cuantificación de ADN, se preparo el gel de calidad con la finalidad de observar la presencia de ADN en las extracciones de *C. aurantiaca* y *L. speciosa*.

En la Figura 13 se observa el gel de agarosa de las 30 muestras, las primeras 15 corresponden a *C. aurantiaca* y las 15 posteriores a *L. speciosa*, al inicio y al final se colocó un marcador de peso molecular de 1kb (3µL). Las muestras de ADN son de alto peso molecular y no están degradadas.

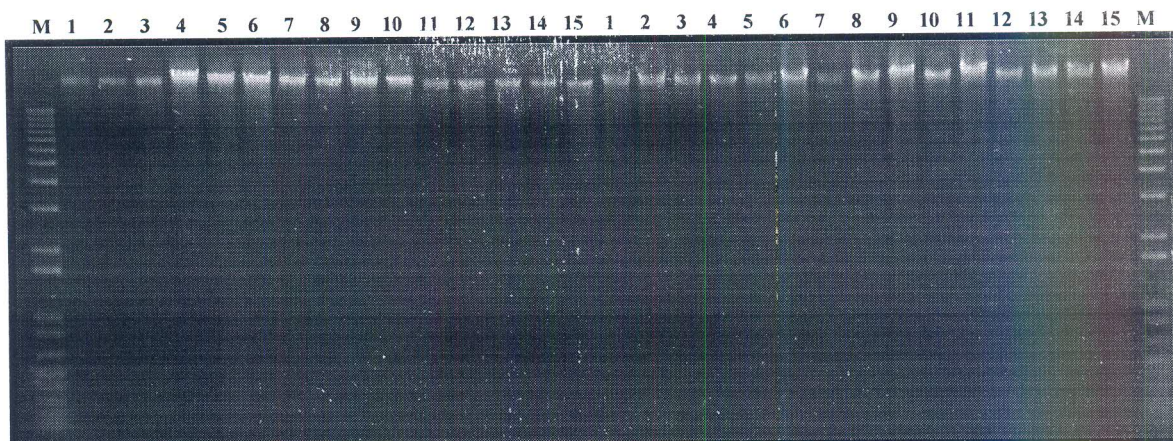


Figura 13. Gel de calidad de las 15 acepciones de *C. aurantiaca* y 15 acepciones de *L. speciosa*. M: marcador de peso molecular (1 kb).

5.3.3 Análisis RAPD

La diversidad genética se representa como las diferencias en la constitución génica de los individuos de poblaciones naturales lo cual nos permite entender cómo es que las especies se adaptan y evolucionan. Por lo que, la pérdida de esta variación puede reducir la capacidad de una población a adaptarse a cambios de su ambiente e influyen fuertemente en la estructura genética de las poblaciones naturales (Santos *et al.*, 2006), para el caso de *C. aurantiaca* y *L. speciosa*, de acuerdo a los análisis realizados estos muestran poca variabilidad genética.

El análisis de los patrones RAPDs, nos permite determinar la similitud y disimilitud existente entre especies y dentro de una misma especie, obteniendo de ello un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, y cuando presenta diferencias en el peso molecular es polimórfico (Nonnatus, 2001).

En la Figura 14 se observan cuatro patrones RAPDs, donde se muestra tanto la variabilidad, y en la mayoría de los casos la similitud, en cuanto al patrón de bandeo.

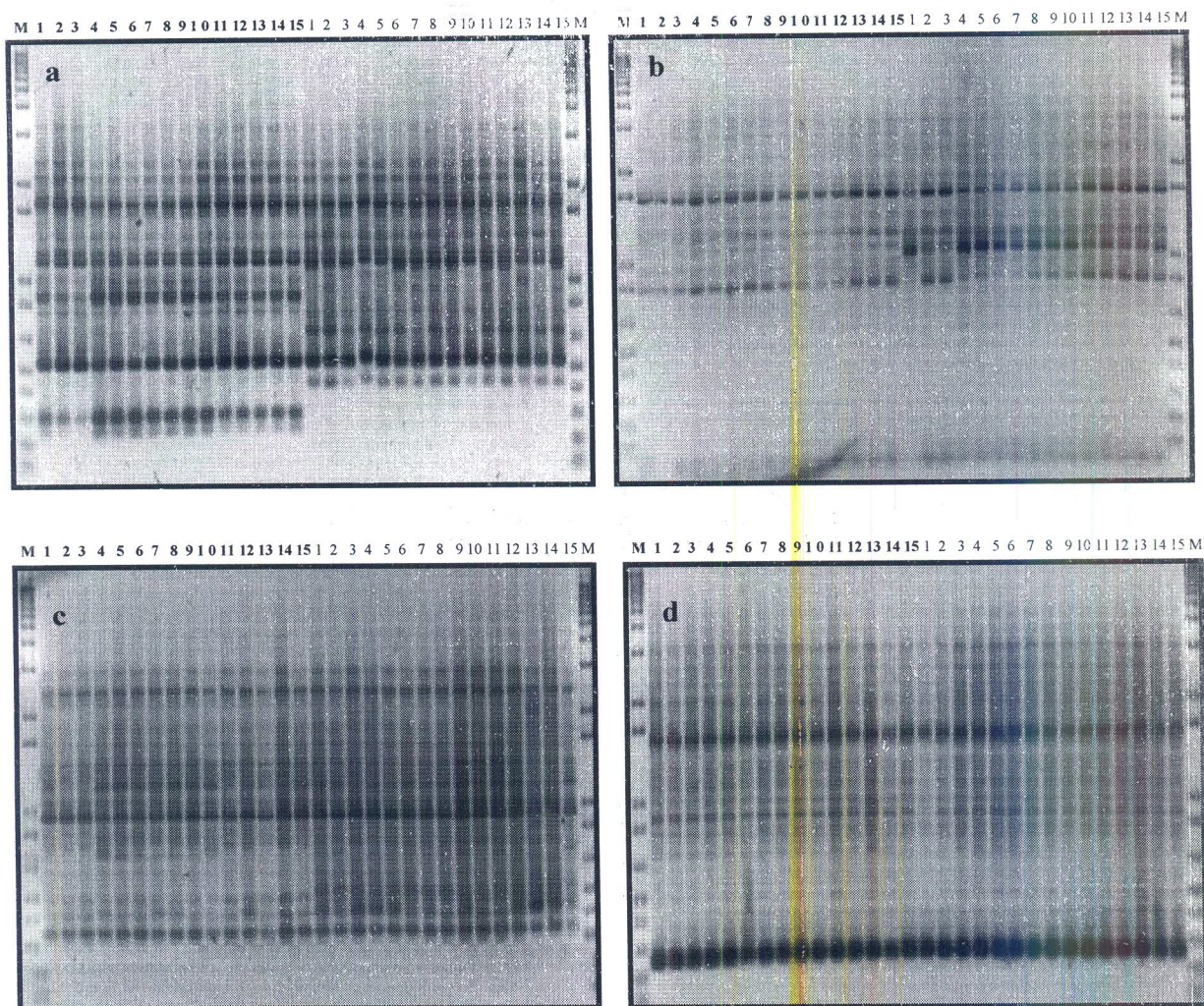


Figura 14. Patrones RAPD obtenidos con los iniciadores OPA 10 (a), OPA 3 (b), OPA 2 (c) y OPA 4 (d).

De los 20 iniciadores probados de la serie A (Operon Technologies inc. Alameda, California, USA), 16 (Cuadro 18) mostraron amplificación de por lo menos 5 bandas para las dos especies de orquídeas, es por ello que fueron las que se seleccionaron para realizar las reacciones de PCR y se compararon los patrones de bandeo para cada caso.

Cuadro 19. Iniciadores empleados de la serie A (Operon Technologies inc. Alameda, California, USA), y sus secuencias

INICIADOR	SECUENCIA (5'-3')
OPA-01	CAG GCC CTT C
OPA-02	TGC CGA GCT G
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-05	AGG GGT CTT G
OPA-07	GAA ACG GGT G
OPA-08	GTG ACG TAG G
OPA-09	GGG TAA CGC C
OPA-10	GTG ATC GCA G
OPA-11	CAA TCG CCG T
OPA-13	CAG CAC CCA C
OPA-14	TCT GTG CTG G
OPA-17	GAC CGC TTG T
OPA-18	AGG TGA CCG T
OPA-19	CAA ACG TCG G
OPA-20	GTT GCG ATC C

De los 20 iniciadores probados de la serie A, 16 mostraron un polimorfismo menor de 70 % para *C. aurantiaca* y menor del 50 % para *L. speciosa* de acuerdo con los datos que se muestran en el Cuadro 19. Li *et al.*, 2002, compara 16 genotipos los cuales mostraron 73.3% de polimorfismo por lo que se encontró una gran diversidad genética entre poblaciones. El uso de RAPDs ha permitido la detección de polimorfismo de ADN entre las especies de orquídeas (Asawatreratanakul and Asawatreratanakul, 2005).

De un total de 188 bandas amplificadas, el 44.16 % mostraron polimorfismo. De los 16 iniciadores empleados, 45 corresponden a *C. aurantiaca*. y 39 corresponden a *L. speciosa*, con un polimorfismo de 24.92 % y 19.23 % para *C. aurantiaca* y *L. speciosa*,

el polimorfismo dentro de la especie es menor, lo que nos muestra que *L. speciosa* es mas estable en comparación con *C. aurantiaca* (Cuadro 19).

El porcentaje de bandas monomórficas fue de 75.07% para *C. aurantiaca* mostrando una mayor variabilidad genética, por lo que se muestra que es una especie menos estable, y 80.76% para *L. speciosa* (Cuadro 20), mostrando mayor estabilidad genética. Li *et al.*, 2002 encontró una gran proporción de la variación genética (79.69%) que residía entre las poblaciones, mientras que sólo el 20.31% residían dentro de la población.

Cuadro 20. Número de bandas amplificadas con los iniciadores de las series A en *C. aurantiaca* y *L. speciosa*.

Iniciador	Productos amplificados			% de polimorfismo		% de bandas monopolimórficas	
	Totales	Polimórficos		<i>C. aurantiaca</i>	<i>L. speciosa</i>	<i>C. aurantiaca</i>	<i>L. speciosa</i>
		<i>C. aurantiaca</i>	<i>L. speciosa</i>				
OPA-01	6	4	0	66.67	0.0	33.33	100.0
OPA-02	15	5	7	33.33	46.67	66.67	53.33
OPA-03	9	0	4	0.0	44.44	100.0	55.56
OPA-04	10	5	2	50.0	20.0	50.0	80.0
OPA-05	13	4	1	30.77	7.69	69.23	92.31
OPA-07	13	2	3	15.38	23.08	84.62	76.92
OPA-08	14	3	1	21.43	7.14	78.57	92.86
OPA-09	10	0	0	0.0	0.0	100.0	100.0
OPA-10	15	0	3	0.0	20.0	100.0	80.0
OPA-11	16	9	7	56.25	43.75	43.75	56.25
OPA-13	12	0	0	0.0	0.0	100.0	100.0
OPA-14	9	0	1	0.0	11.11	100.0	88.89
OPA-17	8	4	1	50.0	12.5	50.0	87.5
OPA-18	12	5	2	41.67	16.67	58.33	83.33
OPA-19	12	4	4	33.33	33.33	66.67	66.67
OPA-20	14	0	3	0.0	21.43	100.0	78.57
Totales	188	45	39	24.92	19.23	75.07	80.76

El uso de técnicas de ADN de huellas genéticas ha demostrado ser un instrumento útil, rápido y de enfoque preciso para el estudio de las variaciones inter e intra-específicas de orquídeas (Shan *et al.*, 2002). RAPDs es el análisis de encuestas de loci múltiples de la totalidad de su genoma simultáneamente con cada primer y detecta diferencias de nucleótidos entre los aislamientos.

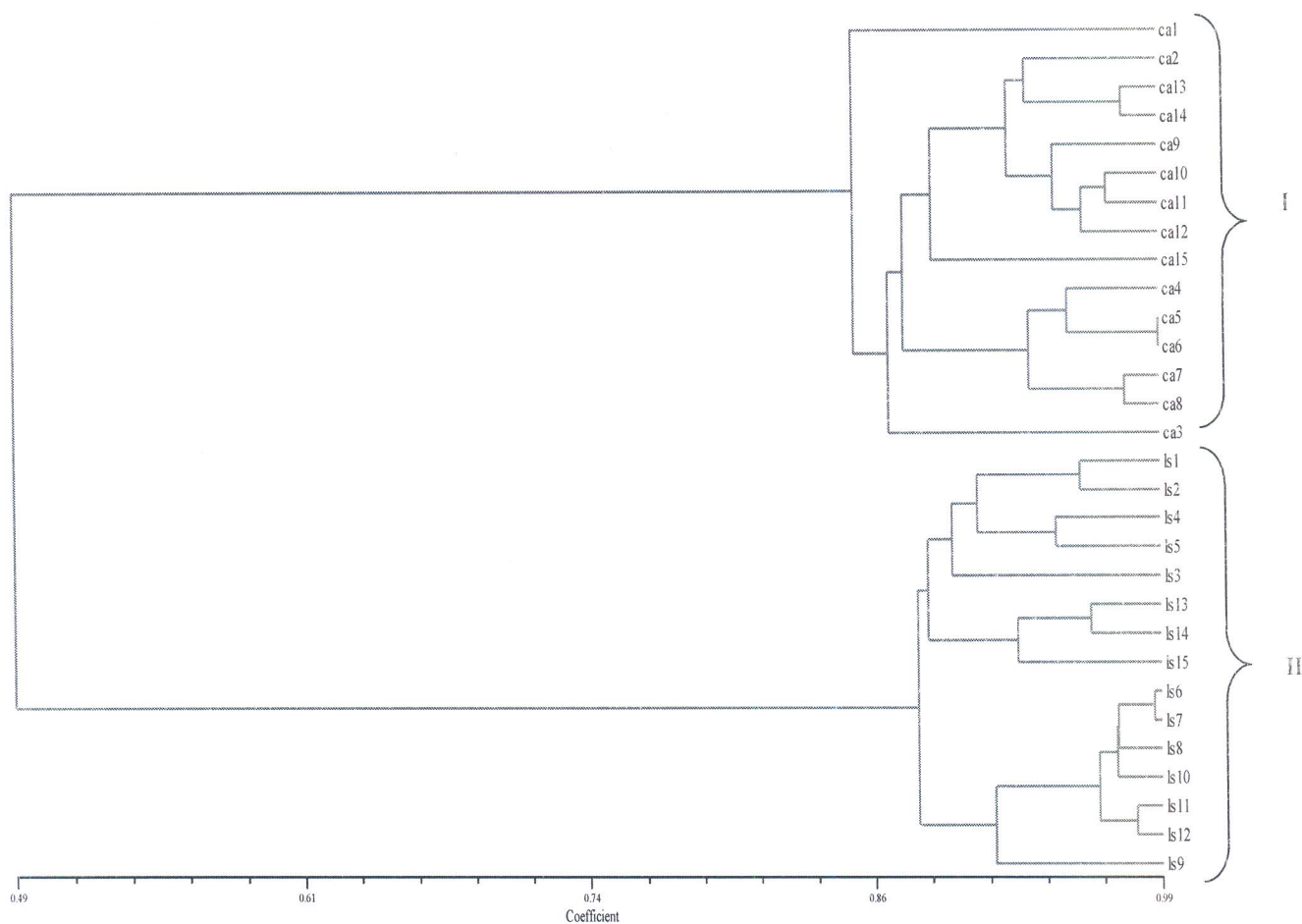


Figura 15. Dendrograma construido usando el coeficiente de similitud de Jaccard con los patrones de bandas RAPD de *C. aurantiaca* y *L. speciosa*

El análisis de clusters de la distancia genética llevó a cabo el dendrograma en el que se indica claramente que las tres especies de orquídeas se agrupan en tres diferentes categorías (Asawatreratanakul and Asawatraratanakul, 2005). En el dendrograma (Figura 15) existe una buena separación de las dos especies de acuerdo con el género al cual pertenecen, esto es, todos aquellos individuos que pertenecen a *C. aurantiaca* se encuentran dentro del primer grupo con valores de similitud entre 0.89 y 0.99, y el segundo se encuentra formado por aquellos que pertenecen a *L. speciosa* agrupado entre 0.86 y 0.99 el coeficiente de Jaccard agrupa a las dos especies en 0.49 de similitud. La técnica de RAPD es de utilidad para indicar la proximidad genética de especies de orquídeas e híbridos de manera rápida y eficiente y, por lo tanto, ayuda a predecir el resultado de una cruce sobre la base de información genotípica. Demeke, Chibbar y Adams (1992), citados por Saw *et al.* (1999), encontraron que los RAPDs son útiles en la clasificación de especies.

VI. CONCLUSIONES

Micropropagación

Las mejores condiciones de micropropagación de *Laelia speciosa* incluye el medio basal Murashige y Skoog (1962) adicionado con extracto de malta ($500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) durante todo el proceso de germinación e inducción de brotes y el Tezontle rojo + peat most (1:1) se presento como el mejor sustrato para la aclimatación.

Crioconservación

La encapsulación de protocormos de orquídeas con 3 % de alginato de sodio y 0.75 M de cloruro de calcio es útil para la crioconservación, en un pre-tratamiento de 0.75 M durante 24 h y expuestas a silica gel durante 25 h con un contenido de humedad de 25 %, presentando una tasa de 100 % de sobrevivencia y 80 % de regeneración (hasta la fase de deshidratación). La tasa de sobrevivencia (100 %) y regeneración (100 %) (hasta la fase de deshidratación) se logro con un precultivo de los protocormos en 0.3 M de sacarosa durante 3 días, un tratamiento de carga por 20 min. Y una deshidratación con PVS2 a temperatura ambiente durante 60 min.

Caracterización molecular de *Catleya aurantiaca* y *Laelia speciosa*

El protocolo utilizado para la extracción de ADN permitió obtener ADN con buena calidad, el cual fue utilizado para realizar reacciones de PCR con 16 iniciadores de la serie A. De un total de 188 bandas amplificadas, 44.16 % mostraron polimorfismo, 24.92 % y 19.23 % y bandas monomórficas de 75.07 % para *C. aurantiaca* y 80.76% para *L. speciosa* respectivamente, esta ultima presenta mayor variabilidad genética. El dendograma muestra una clara separación de las especies de acuerdo al género.

VII. LITERATURA CITADA

- ABDELNOUR E., A. 1996. La Biotecnología y su contribución al desarrollo de una agricultura sostenible. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Informa TEC. 0 (124): 3.
- ABDELNOUR A. 1999. Situación actual y perspectivas de las aplicaciones biotecnológicas en la conservación y uso de los recursos fitogenéticos. XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. Memoria: Manejo de Cultivos. UNED, Colegio de Ingenieros Agrónomos. San José, Costa Rica. pp. 299-306.
- AGUILAR J., D. 2006. Obtención y multiplicación *in vitro* de la orquídea *Laelia anceps* Lindl. Tesis Izucar de Matamoros Puebla. 230 p.
- ALDERETE C., A. 1988. Orquídeas de Tabasco. Gobierno del Estado de Tabasco. Instituto Nacional de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos. 150 p.
- AMERICAN ORCHID SOCIETY. 1995. El cultivo de las *cattleyas* y sus híbridos. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. 1: 48-49.
- ARDITTI J. 1972. Professor Lewis Knudson and the asymbiotic germination of seeds: The Fiftieth Anniversary. American Orchid Society Bulletin 41: 899-904.
- ARDITTI J. 1982. Orchid seed germination and seedling culture - A Manual. En J. Arditti (Ed.) Orchid biology: reviews and perspectives II. Cornell University pp. 243-370.
- ARDITTI J. 1992. Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley & Sons, Inc. USA. 691 p.

- ARDITTI J.; GHANI, A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145 (3): 367-421.
- ASAWATRERATANAKUL P.; ASAWATRARATANAKUL, K. 2005. Genetic studies of Slipper Orchid from Southern Thailand using RAPD. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology. pp. 18 – 20.
- ASHMORE S., E. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia. 67 p.
- ASHMORE S., E.; DREW, R.A. 2006. The application of biotechnology in an integral project of conservation and utilization of papaya and its wild relatives. *Acta Horticulturae* 725: 89-93.
- ÁVILA D. I. 1996. Orquídeas Michoacanas. pp 19-29.
- ÁVILA D. I. y OYAMA k. 2002. Manejo sustentable de *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Biodiversitas. Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. 7(43): 38.
- BECHTEL H. 1981. The manual of cultivated orchid species. The Mid Press. Cambridge. Massachusetts, USA. 550 p.
- BENSON E., E. 1999. Cryopreservation. In: *Plant Conservation Biotechnology*. E. E. Benson (Ed). University of Abertay, Dundee UK. pp. 83-95.
- CANEVA S. 1991. Orquídeas, principales géneros, especies y su cultivo. Albatros. Buenos Aires, Argentina. pp. 1-16.
- CRUZ S., P. E. V.; GIL, V.I.; NAVARRO, L.E. R. 2003. Exportaciones de orquídeas Mexicanas. Programas y memorias de resúmenes. X Congreso Nacional de la

- Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas, IX Congreso Nacional y II Internacional de Horticultura Ornamental. Universidad Autónoma Chapingo., Texcoco, México. 161 p.
- DATA K., B.; KANJILAL, B.; SARKER, D. 1999. Artificial seed technology: development of a protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr. An endangered orchid. Current Science 8(76).
- DAY, J. G.; MCLELLAN, M. R. 1995. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Humana Press. Tolowa, NJ, USA. 254 pp.
- ENGELMANN F. 1991. In vitro conservation of tropical plant germplasm-a review. Euphytica. 57: 227-243.
- ENGELMANN F. 1992. Cryopreservation of embryos, pp 284-290. In: Reproducible Biology and Plant Breeding. Ed. Springer-Verlag. Berlin.
- ENGELMANN F.; DAMBIER, D.; OLLITRAUT. 1994. Cryopreservation of embryonic cell soybean (*Glycine max* L. var. acme) callus strain used as a bioassay for cytokinin activity. Cryoletters 13: 331-336.
- ENGELMANN F. 1997. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources. Acta horticultura (447): 471-475.
- ENGELMANN F. 1997. *In vitro* conservation methods. pp. 119-161. In: Biotechnology and Plant Genetic Resours. CAB International.
- ENGELMANN F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. Pp. 8-20. In: Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Science, Tsukuba, Japan/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

- ENGELMAN F. 2004. Plant cryopreservation: Progress and Prospects. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 40 (5): 427-433.
- FABRE J., DEREUDDRE J. 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters* 11: 413-126.
- FAN T., K.W.; LOON, S.; KHOR, E.; LOH, C.S. 1997. Infection of *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) seeds by mycorrhizal fungus. *Plant Cell, Tissue and Culture* 18 (1-2): 14-19.
- FINKLE, B.J.; Zavala, M.E.; Ulrico, J.M. 1985. Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. pp. 75-113. *In: Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. K. K. Kartha. Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- FLACHSLAND E.; TERADA, G.; SCOCCHI, A.; REY, H.; MROGINSKI, L.; ENGELMANN, F. 2006. Cryopreservation of seeds and in vitro-cultured protocorms of *Oncidium bifolium* Sims. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. *Cryo Letters* 27(4): 235-42.
- GARCÍA J. 1995. La Subtribu Laeliinae: las cattleyas y sus parientes. En: *Orquídeas de Costa Rica y su Cultivo Cattleya y Géneros Relacionados*. Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica. 1:6-7.
- GARCÍA C., B.J. 2000. *Orquídeas de Costa Rica y su cultivo*. Asociación Costarricense de Orquideología (A. C. O.).
- 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 with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Tree Physiology* 20: 901-907.

- GONZÁLEZ A., M.T.; ENGELMANN F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study of sugarcane. *Cryoletters* 27 (3): 155-168.
- GROSSMANN y SANTALÓ. 2001. Principios básicos de Criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 1º Congreso ASEBIR. 18(4).
- HALBINGER F.; SOTO, M. 1997. *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. En: *Laelias of México*. Orquídea (Méx.) 15: 135-139.
- HARDING K. 1991. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow grow and cryopreservation. *Euphytica* 55: 141-146.
- HARTMAN H. T.; KESTER, D. E. 1990. Propagación de Plantas: Principios y Practicas. Editorial CECSA. México, D. F. 760 p.
- HERNÁNDEZ A. M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (HBK) Schrtr (Orchidaceae). Tesis Profesional. UNAM, México. 86 p.
- HIRAI D.; SAKAI A. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grow meristemos of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. pp. 205-211. In: Cryopreservation of Tropical Plant Germoplasma. Ed. IPGR. Rome, Italy.
- HIRANO T.; ISHIKAWA K.; MII M. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis graminifolia* var. *suzukiana* by vitrification. *Cryo Letters* 26(3): 139-46
- HIRANO T. ; GODO T. ; MII M. ; ISHIKAWA K. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports*. 23 (8): 534-9.
- HORICH C. 1980. Las *Cattleyas* en Costa Rica. pp 9-11. En: Orquídeas: su cultivo. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. 1997. Ciencia, arte: cultura.
www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES/ipn/arte_ciencia_cultura/mayo-junio97/semi/sec_1.html.

ISHIKAWA K.; HARATA K.; MII M.; SAKAI A.; YOSHIMATSU K.; SHIMOMURA K. 2004. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification Journal. Plant Cell Reports: 754-757.

JARAMILLO S.; Baena M. 2000. Material de Apoyo a la Capacitación en Conservación Ex Situ de los Recursos Fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali Colombia. 209 pp.

KUAN C.; GONZÁLEZ L. 1993. Introducción al Cultivo y Manejo de las Orquídeas. San José, Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje. pp 1-76.

LARSON R, A. 1982. Introducción a la Floricultura. AGT, México. 551 p.

LECOUFLE M. 1999. Orchids, Care and Cultivation. Editorial CASSELL. New York.

LEÓN J. 1987. Botánica de los cultivos Tropicales. IICA. Costa Rica. 320 p.

LI A.; LUO, Y.; GE, S. 2002. A Preliminary study on conservation genetics of an endangered orchid (*Paphiopedilum micranthum*) from southwestern China. biochemical genetics. 40 (5-6): 195-201.

LIM S., H.; CHYE, P., T.P.; LEE, Y. H.; GOH, C. J. 1999. RAPD analysis of some species in the genus *Vanda* (Orchidaceae). Annals of Botany 83: 193-196.

MAMIYA K.; SAKAMOTO, Y. 2001. A method to produce encapsulatable units for synthetic seed in *Asparagus officinalis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 64:27-32.

MARTINEZ R. R.; AZPIROZ, H., S.R.; RODRÍGUEZ, O., J.L.; CETINA, A., V.M.; GUTIERREZ, M., A.E. 2003. Aplicación de la biotecnología a los recursos

- genéticos forestales. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 9 (1): 17-34.
- MAZUR P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol Cell Physiol 247: 125-142.
- MERYMAN H., T.; WILLIAMS R. J. 1985. Basic Principles of *in vitro*-cultured axillary shoot tips of *Vitis* by vitrification. Acta Horticulturae 538: 173-175.
- MORENO M. E. 1996. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. Tercera Edición UNAM. México, D: F.
- NONNATUS S. BAUTISTA, RENANDO S., OSAMU K., and TAKASHIGE I. 2001. RAPD, RFLP and SSLP analyses of phylogenetic relationships between cultivated and wild species of rice. Genes Genet. Syst.: 76: 71–79.
- NUEZ, F; CARRILLO, J. M; DE RON, A. M. 2000. Introducción, pp. 3-22. In: Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. Eds F. Nuez, J. M. Carrillo. Universidad Politécnica de Valencia, España
- OSSENBACH C; ARCE J.; WARNER J. 2007. Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma. Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas. Tierra Tropical 3 (1): 47-59
- PANIS B.; SWENNEN R.; ENGELMANN F. 2001. Cryopreservation of plant germplasm. Acta Horticulturae 560: 79-85.
- PANIS B y M. LAMBARDI. 2005. The role of biotechnology: status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). Villa Gualino, Turin, Italy.

- PICCA, A.; HELGUERA, M.; SALOMÓN, N.; CARRERA A. 2002. Marcadores moleculares, pp: 61-68. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Eds. Echenique V.; Rubinstein C.; Mroginski L.; INTA, Rivadavia. Buenos Aires, Argentina.
- PICCIONI E.; STANDARDI. A. 1995. Encapsulation of micropropagation buds of six woody species. *Plant cell Tissue and Organ Culture* 42: 221-226.
- PIERIK, R. L. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- RAO N. K. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3 (2): 136-145.
- RODRÍGUEZ R. 1995. Orquídeas de Costa Rica y su Cultivo. *Cattleya* y Géneros relacionados. Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. (1):31-35.
- RÖLLKE F. 2002. Las Orquídeas. Ed. Zendera Zariquiey. España. 61 p.
- SAIPRASAD G., V.S. 2001. Artificial seed and their applications. *Resonance* 39-47.
- SAIPRASAD G., V. S.; POLISETTY R. 2003. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocormo-like bodies. *Plant In Vitro Cellular and Developmental Biology* 39 (1): 42-87.
- SAKAI A.; COLS. 1990. Encuentros en la Biología. *Cryobiology* 98(27): 657
- SAKAMOTO Y.; ONISHI, N.; HIROSAWA, T. 1994. Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39:137-145.
- SAKAI A.; COLS. 1993. Encuentros en la Biología, ISSN 1134-8496. *Cryopreservation of Plant Genetic Resources* 98:5-26

- SAKAI A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA I. 1991. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs.) by a simple freezing method. *Plant Science* 74: 243-248.
- SANGWAN N. B.; DUBOIS, F.; FLANDRE, F.; LAVIEVILLE, L.; PAUL H.; SANGRAN, R. 1991. *In vitro* culture and plant improvement. *Acta Horticulturae* 289: 1-32.
- SANTOS H. L.; AGUIRRE, L.E.; CAMPOS, C.J.E.; MARTINEZ, G.M. 2006. Conservación *in situ* de la flora mexicana: la orquídea *Laelia albina*, una reserva de la biosfera. *Ciencia y desarrollo en Internet*.
- SAW H.L.; CHIE, P.P.; YEW, H.L.; CHONG, J.G. 1999. RAPD Analysis of Some Species in the Genus *Vanda* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 83: 193-196.
- SCHAFER M. A.; SHUMACHER, H.M. 1997. Cryopreservation of potato cultivars design of a method for routine application in genebanks. *Acta Horticulturae*. 447: 477-481.
- SEGUEL, B. I. 2001. Conservación de recursos fitogenéticos ex situ. "Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur". PROCISUR, 2001.
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. 2002. Protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestre-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*.
- SHAN X. C.; LIEW, E. C.Y.; WEATHERHEAD, M.A.; HODGKISS, I.J. 2002. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*. 94 (2): 230-239.

- SHEENA M. 2000. Manual para la germinación in vitro de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation
- SITAKANTA P.; PRADEEP K.C. 2000. Morphologenic response of alginate-encapsulated axillary buds from in vitro shoot cultures of six mulberries. India. Plant Cell Tissue and Organ Cultures. 60: 177-185.
- SUN M. M.; WONG, K.C. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using rapd and allozyme markers. American Journal of Botany 88 (12): 2180-2188.
- TAPIA R. 1985. Estudio Morfológico y taxonómico de la familia Orchidaceae en el municipio de Temazcaltepec. Tesis de licenciatura. UAEM. México. Pp.3-20.
- TAKAGI, H. 2000. Recent development in cryopreservation of shoot apices of tropical species. pp.178-193. In Cryopreservatin of tropical plant germplasm. Eds. H. Takagi and F. Engelmann. IPGR. Rome, Italy.
- THAMMASIRI K. 2000. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* lindl.) by vitrification. Cryo Letters; 21(4): 237-244.
- TÉLLEZ V. 2005. La orquídea, flor cumbre de la evolución. Revista de Instituto del Politécnico Nacional. No. 38
- TORIBIO, M.; CELESTINO, C.; GALLEGOS, J.; MARTINEZ, I. 2000. Induction of somatic embriogénesis in tisúes from mature oak trees. In: Development of integrated Systems for Largescale Propagation of Elite Plants using in vitro Techniques. Ed. Riordain, F., Cost Action 822: Report of activities, 1998. European Communities, EUR 19237. pp 236-237.
- VILLALOBOS V. M.; ENGELMAN, F. 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. Biotechnol 11 (4): 375-382.

- WANNA L.; KANCHIT T. 2004. Cryopreservation of Shoot Tips of *Dendrobium* Walter Oumae by Encapsulation/Dehydration. *Science Asia* 30: 293-299
- WESTENDORP N.; ENCINA C. L. 2004. Crioconservación de plantas. *Encuentros en la Biología* 98: 1134-8496.
- WILLIAMS G. K.J.; KUBELIK, R.A.; LIVAK, J.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, V.S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6531-6535.
- WITHERS L. A. 1985. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In: *Cryopreservation of plant cells and organs*. Ed. K. K. Kartha CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 243-267.
- WITHERS L. A.; ENGELMANN F. 1997. *In vitro* conservation of plant genetic resources. pp 57-88. In: Altman A. (Ed) *Biotechnology in Agriculture*. Marcel Dekker Inc. New York.
- WRITHNER, N., P. 1998. *Orquídeas de México*. Ed. Fournier. México D. F.
- WOOD C.B; PRITCHARD, H.W; MILLER, A.P. 2000. Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content. *Cryo Letters* 21 (2): 125-136.
- WONG K. C.; SUN, M. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera*(orchidaceae). *American Journal of Botany* 86(10):1406–1413.
- ZEIGLER A. 1967. Influence of various media and photoperiod on the growth and aminoacid content of orchid seedling. *American Journal of Botany* 36: 390-395.