

EL CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS EN LA CONSERVACIÓN DE RECURSOS FITOGENÉTICOS: ORQUÍDEA *LAELIA SPECIOSA* (H. B. K.) SCHLTR)

Rodríguez de la O J. L.; Medina Mendoza C. Departamento de Fitotecnia / Universidad Autónoma Chapingo • jlro8@msn.com

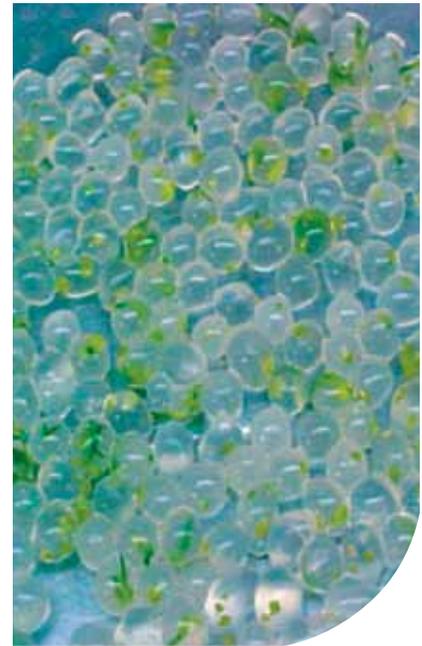


RESUMEN

Keywords: Semilla sintética, protocormo, nitrógeno líquido.

México es un país que posee una gran diversidad de climas, y esto ha propiciado el desarrollo de una flora muy diversa. En el mundo, ocupa el cuarto lugar por su biodiversidad y ha sido reconocido como centro de origen de innumerables recursos fitogenéticos. La familia *Orquidaceae*, debido a su naturaleza exótica, se ha convertido en un grupo de plantas de interés económico, y es considerada entre las especies ornamentales más codiciadas tanto en México como en muchos países. De las 35,000 especies de la familia *Orquidaceae*, aproximadamente 40% son endémicas de nuestro país (Téllez, 2005). Actualmente existe una gran preocupación debido a la problemática propiciada por la enorme pérdida de recursos fitogenéticos, debido principalmente al cambio de uso de suelo, tala inmoderada, incendios, sobreexplotación y crecimiento urbano (Hagsater, 1990).

El cultivo de tejidos vegetales se ha reconocido como una de las mejores herramientas de tipo biotecnológico, empleadas tanto para el rescate, la multiplicación y la conservación *in vitro* de recursos fitogenéticos, amenazados o en vías de extinción. La conservación *in vitro* a largo plazo con la utilización del nitrógeno líquido, asegura temperaturas de entre $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ es un método que permite detener el metabolismo, y la división celular de los tejidos evitando los daños y sin modificaciones o alteraciones por tiempo indefinido ya sea en la fase líquida o gaseosa del nitrógeno líquido (Abdelnour, 1999). Los métodos, requieren de pretratamientos con sustancias crioprotectoras, como el dimetil sulfoxido (DMSO), el glicerol, la sacarosa y el polietilenglicol (PEG) solas o en mezclas ya sea por minutos, horas o días esto para lograr la deshidratación lenta de las células y tejidos. Los pretratamientos, son seguidos por un congelamiento controlado que se lleva a cabo lentamente ($0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hasta $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego se almacenan las muestras en nitrógeno líquido (Abdelnour, 1999).



La tecnología sobre el encapsulamiento/deshidratación de muestras vegetales se basa en la producción de semillas sintéticas, y consiste en encapsular meristemos, ápices y embriones somáticos en alginato de sodio y cloruro cálcico, y cultivarlos en medio líquido con sacarosa. Antes, las cápsulas son parcialmente deshidratadas. Para la recuperación, las muestras se colocan en el medio de cultivo estándar (Flachsland E., *et.al.*,) Otro procedimiento es la vitrificación, que consiste, por en un pretratamiento de las muestras con soluciones concentradas de crioprotectores ejemplo: sacarosa, glicerol y DMSO, PEG, por unos minutos, y posteriormente el congelamiento con nitrógeno líquido para alcanzar un estado de vitrificación de los solutos internos. Como estas soluciones son tóxicas para las células, es importante controlar cuidadosamente el tiempo de incubación y removerlas gradualmente después de descongelar las muestras (Thammasiri, K., 2000).

La crioconservación es una alternativa para conservar especies y variedades vegetales silvestres o cultivadas, y es una alternativa a las colecciones y accesiones ubicadas en los bancos de germoplasma clásicos. Por ello se plantea como objetivo establecer las condiciones *in vitro* que permitan rescatar, multiplicar y preservar a la *orquídea Laelia speciosa* (HKB).

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. El material vegetal empleado fueron semillas de la *orquídea Laelia speciosa* proporcionada por el Orquideario, Dr. y Gral. Alberto Oviedo Mota, de la ciudad de Morelia Michoacán.

Como estrategia experimental se establecieron las condiciones necesarias para la germinación *in vitro* de semillas, hasta la obtención de plantas y evaluar su posterior aclimatación durante la transferencia a suelo.

Para la elaboración de semilla sintética se emplearon protocormos, los que se obtuvieron después de 50 días de la siembra *in vitro*, estableciendo las características ideales para su encapsulamiento y posterior desarrollo como semillas sintética, ésto se logró utilizando 3% de alginato de sodio y 0.1M de cloruro de calcio para la elaboración de capsulas.

El método de encapsulación-deshidratación desarrollado por Fabre y Dereuddre (1990), se empleó en los protocormos, tratados en un medio sólido Murashige y Skoog, MS (1962) al 100 % con 0.3 M de sacarosa durante 24 h, posteriormente se encapsularon con alginato de sodio al 3% y cloruro de calcio 0.1M conte-

niendo sales minerales y orgánicas constituyéndose como la semilla sintética. Estas posteriormente son tratadas con diferentes concentraciones de sacarosa (0.5, 0.75, 1.0 y 1.2M), durante 24 horas y desecados en silica gel hasta alcanzar un contenido de humedad de 20-30%, posteriormente se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido durante una hora, su descongelamiento fue en el aire de flujo laminar de la campana y sembrados en medio de cultivo de recuperación.

La vitrificación consistió en tratamientos a los protocormos en un medio sólido MS (1962), con 0.3M de sacarosa durante 24h; posteriormente los tejidos se sumergieron en una solución de carga: 1.2M de glicerol más 0.4M de sacarosa durante 20 min, exponiéndose a una solución de vitrificación concentrada durante diferentes períodos de tiempo (de 10 hasta 60 min.). La solución, es una mezcla concentrada llamada "PVS2" (Solución de Vitrificación de Planta 2), que consiste en 30 % glicerol, 15 % de etileno glicol y 15 % DMSO (v/v) y 0.4 sacarosa de M (Sakai *et al.*, 1993), seguido de una inmersión en nitrógeno líquido durante una hora y de descongeló el agua a 40 °C durante 3 minutos, dando dos enjuagues con la solución 1.2M durante 15 y 5 minutos y posteriormente sembrados en un medio de recuperación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación

Los porcentajes de germinación de las semillas fueron de 39 y 51 % respectivamente, utilizando el medio de cultivo con las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962).

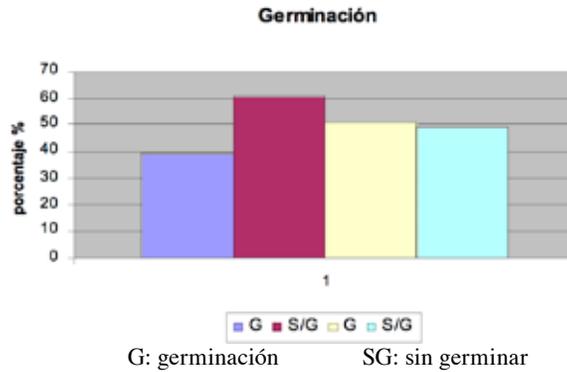


Figura 1. Porcentajes de germinación *in vitro* de semillas de *Laelia speciosa* empleando las sales inorgánicas MS (1962), después de 50 días

Aunque los porcentajes de germinación no son muy aceptables, ya que tenemos datos por debajo de 50 %, se explica debido a la acción del medio de cultivo empleado, sin reguladores, que permiten no tanto promover la germinación, sino el desarrollo y crecimiento *in vitro* de planta posteriormente, sin embargo sabemos que este tipo de especies nos proporcionan una gran cantidad de semillas, lo cual compensa con una buena cantidad de plántulas que pueden desarrollarse adecuadamente.

Curva de desecación

Para la deshidratación de las capsulas se usó silica gel, para lo cual fue necesario establecer un parámetro que diera un margen de tiempo en el cual se pudiera deshidratar las cápsulas, y obtener el porcentaje de humedad relativa requerido para posteriormente congelar. Para ello se realizaron pruebas en donde a las cápsulas se les dio un tratamiento con altas concentraciones de sacarosa (0.75 y 1.0M) durante 24 horas. Posteriormente se tomó el peso inicial, el peso a la hora, y hasta las 10 horas en silica gel y secándolas en la estufa a 100 °C durante 48 horas, obteniéndose el porcentaje de humedad relativa en cada tiempo.

En la figura 2 se observa que, a mayor concentración de sacarosa, el peso es menor, esto se debe a que el efecto del azúcar se ve reflejado en eliminar mayor cantidad de agua de las capsulas, lo cual es favorable para el congelamiento de las mismas y por lo tanto, evitó mayor riesgo de daño a los tejidos. De acuerdo a la grafica el porcentaje de humedad requerida es entre 20 y 30% y fue alcanzada a las 4 y 7 horas de desecación dentro de silica gel, con 0.75M a las 5 horas obteniéndose 25% de humedad, lo cual es ideal para congelar, para el caso de 1M al igual entre las 5 y 6 horas se obtuvo entre 25 y 21% de humedad. Estos datos dan un margen de tiempo en el que se pueden poner las cápsulas en la silica gel y obtener la humedad necesaria.

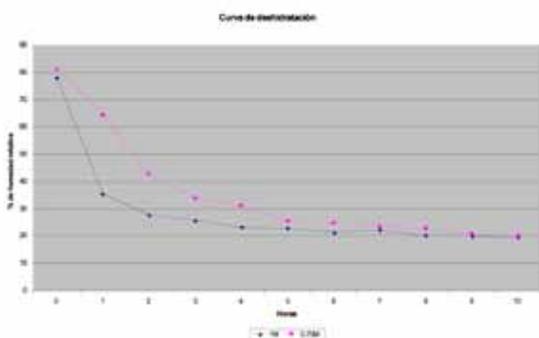


Figura 2. Curva de desecación estándar de cápsulas tratadas con dos concentraciones de sacarosa (0.75 y 1.0M.)

Encapsulación-deshidratación

Después de congeladas las capsulas se procedió a sembrarlas en un medio seolido de regeneración de orquídeas, y se pusieron en completa obscuridad durante una semana. Después se procedió a tomar los datos de supervivencia de cada uno de los tratamiento.

Cuadro 1. Porcentaje de supervivencia en encapsulación-deshidratación

Porcentaje de sobrevivencia				
	0.5 M	0.75 M	1 M	1.2 M
- NL	50	30	50	50
+ NL	80	100	90	90

Los resultados se muestran en el cuadro 1, donde NL son los controles, es decir sin congelar. Obtuvimos porcentajes bajos de sobrevivencia y al congelar (+ NL) los porcentajes son mejores, ya que van de 80 al 100%.

Vitrificación

La técnica de vitrificación nos permite eliminar la humedad de los tejidos para que al congelar no se formen cristales de hielo en las células y se dañe el tejido.

Cuadro 2. Porcentaje de supervivencia en vitrificación

Porcentaje de sobrevivencia		
	30 min PVS2	60 min PVS2
- NL	80	80
+ NL	100	100

Al igual que en la técnica anterior los porcentajes de supervivencia son de 100% para los tejidos tratados con nitrógeno líquido. Estos resultados nos llevan a comprobar la eficiencia de estos métodos para la conservación de especies.

CONCLUSIONES

Las orquídeas son especies de fácil manejo bajo condiciones *in vitro*, es por ello que establecimos como protocolo, todas la etapas desde la germinación hasta la aclimatación de plántulas, además de evaluar los procedimientos y técnicas de crioconservación.

Los bancos de germoplasma *in vitro* y las estrategias de la crioconservación se presentan como una de las mejores opciones biotecnológicas para la conservación en forma clonal de recursos fitogenéticos valiosos de nuestro país, y es una alternativa viable, junto con la caracterización molecular para la conservación y protección de recursos endémicos de nuestro país.

LITERATURA CONSULTADA

- Abdelnour, A. 1999. Crioconservación de plantas, estado actual de la investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 23(2): 205-214.
- Fabre, J.; Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservations of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters* 11:413-426.
- Flachsland E, Terada G, Scocchi A, Rey H, Mroginski L, Engemann F. Cryopreservation of seeds and *in vitro*-cultured protocorms of *Oncidium bifolium* sims. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration.
- Hagsater, E. 1990. Orquídeas de México Parte I. Asociación Mexicana de Orquídeología, A. C. D. F. México. 80 p.
- Sakai et al., 1993. Cryopreservation of Plant Genetic Resources 6: 5-26
- Téllez, V. M. A. 2005. La orquídea, flor cumbre de la evolución. *Revista del Instituto Politécnico Nacional*. 38: 11-21.
- Thammasiri K. *Cryo Letters*. 2000 Jul;21(4):237-244. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid *Doritis pulcherrima* lindl. by vitrification.

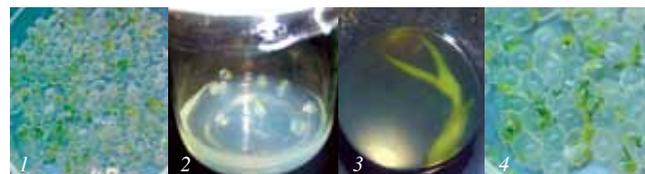


Figura 1. Proceso de encapsulamiento de cormos de *Laelia speciosa*. Mantenimiento y conservación *in vitro* de capsulas y proceso de recuperación de plántulas. ■