



Instituto Tecnológico de Costa Rica
Vicerrectoría de Investigación y Extensión
Dirección de Proyectos

**INFORME FINAL
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

***Crioconservación de semillas y
protocormos de especies de la familia
Orchidaceae en peligro de extinción***

Marzo 2013

Tabla de Contenidos

	Contenido	Página
	Resumen.....	2
1.	Introducción.....	3
2.	Metodología.....	6
2.1	Crioconservación de <i>Warszewiczella discolor</i>	6
2.1.1	Obtención de semilla.....	6
2.1.2	Viabilidad de semilla.....	6
2.1.3	Deshidratación con aire estéril y crioconservación.....	7
2.1.4	Crioconservación con PVS2 y crioconservación.....	8
2.1.5	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	9
2.2	Crioconservación de <i>Guarianthe skinneri</i> (Código 01-13).....	11
2.2.1	Obtención de semilla.....	11
2.2.2	Viabilidad de semilla.....	11
2.2.3	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	11
2.2.4	Germinación.....	12
2.3	Crioconservación de <i>Epidendrum</i> sp.....	13
2.3.1	Obtención de semilla.....	13
2.3.2	Viabilidad de semilla.....	13
2.3.3	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	13
2.3.4	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	14
2.4	Crioconservación de <i>Guarianthe skinneri</i> (Código 02-13).....	15
2.4.1	Obtención de semilla.....	15
2.4.2	Viabilidad de semilla.....	16
2.4.3	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	16
2.4.4	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	17
2.4.5	Germinación.....	18
2.5	Crioconservación de <i>Sobralia</i> sp. (Código 03-13).....	18
2.5.1	Obtención y desinfección de semilla.....	18
2.5.2	Viabilidad de semilla.....	18
2.5.3	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	19
2.5.4	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	20
2.5.5	Germinación.....	21
2.6	Crioconservación de <i>Sobralia</i> sp. (Código 04-13).....	21
2.6.1	Obtención y desinfección de semilla.....	21
2.6.2	Viabilidad de semilla.....	21
2.6.3	Determinación del porcentaje de humedad.....	22
2.6.4	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	22
2.6.5	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	24
2.6.6	Germinación.....	25
2.7	Crioconservación de <i>Lycaste tricolor</i>	25
2.7.1	Obtención y desinfección de semilla.....	25
2.7.2	Viabilidad de semilla.....	25

2.7.3	Determinación del porcentaje de humedad.....	25
2.7.4	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	26
2.7.5	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	26
2.7.6	Germinación.....	27
2.8	Crioconservación de <i>Sobralia</i> sp. (Código 04-13).....	27
2.8.1	Obtención y desinfección de semilla.....	27
2.8.2	Viabilidad de semilla.....	27
2.8.3	Determinación del porcentaje de humedad.....	27
2.8.4	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	28
2.8.5	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	28
2.8.6	Germinación.....	29
2.9	Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de <i>Maxillaria</i> sp.....	29
2.9.1	Obtención y desinfección de semilla.....	29
2.9.2	Germinación.....	29
2.9.3	Crioconservación de protocormos con precultivo en altas concentraciones de sacarosa y aplicación de PVS2.....	29
2.9.4	Crioconservación de protocormos con pretratamiento en solución de precultivo y aplicación de PVS2.....	30
2.10	Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de <i>Prostecchia ochracea</i>	31
2.10.1	Obtención y desinfección de semilla.....	31
2.10.2	Germinación.....	31
2.10.3	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	31
2.11	Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de <i>Oncidium</i> sp.....	32
2.11.1	Obtención y desinfección de semilla.....	32
2.11.2	Germinación.....	32
2.11.3	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	32
2.11.4	Deshidratación de protocormos por medio de soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl.....	33
2.12	Cultivo de protocormos de <i>Brassia verrucosa</i>	34
2.12.1	Capacidad de eliminación de humedad de soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl.....	34
2.13	Crioconservación de ápices de <i>Trichocentrum cebolleta</i>	34
2.13.1	Cultivo de ápices.....	34
2.13.2	Crioconservación de ápices.....	34
3.	Resultados.....	36
3.1	Crioconservación de <i>Warszewiczella discolor</i>	36
3.1.1	Viabilidad de semilla.....	36
3.1.2	Crioconservación de semillas utilizando la técnica de vitrificación con PVS2, la técnica de deshidratación con aire estéril y la técnica de deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl	37
3.2	Crioconservación de <i>Guarianthe skinneri</i> (Código 01-13).....	37
3.2.1	Viabilidad de semilla.....	37
3.2.2	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	38
3.2.3	Formación de protocormos.....	42
3.3	Crioconservación de <i>Epidendrum</i> sp.....	42
3.3.1	Viabilidad de semilla.....	42

3.3.2	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	43
3.3.3	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	47
3.4	Crioconservación de <i>Guarianthe skinneri</i> (Código 02-13).....	47
3.4.1	Viabilidad de semilla.....	47
3.4.2	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	48
3.4.3	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	52
3.5	Crioconservación de <i>Sobralia</i> sp. (Código 03-13).....	53
3.5.1	Viabilidad de semilla.....	53
3.5.2	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	54
3.5.3	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	57
3.6	Crioconservación de <i>Sobralia</i> sp. (Código 04-13).....	58
3.6.1	Viabilidad de semilla.....	58
3.6.2	Determinación del porcentaje de humedad.....	58
3.6.3	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	59
3.6.4	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	61
3.7	Crioconservación de <i>Lycaste tricolor</i>	63
3.7.1	Viabilidad de semilla.....	63
3.7.2	Determinación del porcentaje de humedad.....	64
3.7.3	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	64
3.7.4	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	66
3.8	Crioconservación de <i>Sobralia</i> sp. (Código 05-13).....	68
3.8.1	Viabilidad de semilla.....	68
3.8.2	Determinación del porcentaje de humedad.....	68
3.8.3	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	69
3.8.4	Deshidratación con soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl y crioconservación.....	72
3.9	Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de <i>Maxillaria</i> sp.....	74
3.9.1	Germinación.....	74
3.9.2	Crioconservación de protocormos con precultivo en altas concentraciones de sacarosa y aplicación de PVS2.....	75
3.9.3	Crioconservación de protocormos con pretratamiento en solución de precultivo y aplicación de PVS2.....	75
3.10	Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de <i>Prostechea ochracea</i>	75
3.10.1	Germinación.....	75
3.10.2	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	76
3.11	Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de <i>Oncidium</i> sp.....	77
3.11.1	Germinación.....	77
3.11.2	Crioprotección con PVS2 y crioconservación.....	77
3.11.3	Deshidratación de protocormos por medio de soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl.....	77
3.12	Cultivo de protocormos de <i>Brassia verrucosa</i>	78
3.12.1	Capacidad de eliminación de humedad de soluciones saturadas de CaCl ₂ *2H ₂ O y LiCl.....	78

3.13	Crioconservación de ápices de <i>Trichocentrum cebolleta</i>	80
3.13.1	Crioconservación de ápices.....	80
4.	Análisis de Resultados.....	81
4.1	Crioconservación de <i>Warszewiczella discolor</i>	81
4.2	Crioconservación de <i>Guarianthe skinneri</i> (Código 01-13).....	82
4.3	Crioconservación de <i>Epidendrum</i> sp.....	84
4.4	Crioconservación de <i>Guarianthe skinneri</i> (Código 02-13).....	85
4.5	Crioconservación de <i>Sobralia</i> sp. (Código 03-13).....	86
4.6	Crioconservación de <i>Sobralia</i> sp. (Código 04-13).....	87
4.7	Crioconservación de <i>Lycaste tricolor</i>	88
4.8	Crioconservación de <i>Sobralia</i> sp. (Código 05-13).....	89
4.9	Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de <i>Maxillaria</i> sp.....	90
4.10	Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de <i>Prostachea</i> <i>ochracea</i>	91
4.11	Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de <i>Oncidium</i> sp.....	91
4.12	Cultivo de protocormos de <i>Brassia verrucosa</i>	92
4.13	Crioconservación de ápices de <i>Trichocentrum cebolleta</i>	92
5.	Conclusiones.....	94
6.	Recomendaciones.....	96
7.	Agradecimientos.....	97
8.	Referencias.....	98

Crioconservación de semillas y protocormos de especies de la familia Orchidaceae en peligro de extinción

NOMBRE DE PROYECTO: Crioconservación de semillas y protocormos de especies de la familia Orchidaceae en peligro de extinción

PERÍODO QUE CUBRE EL PRESENTE INFORME: Del 1 de enero de 2011 al 31 de diciembre de 2012

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Ana Abdelnour Esquivel (aabdelnour@itcr.ac.cr)

INVESTIGADORES ASOCIADOS: Ing. Carlos Alvarado Ulloa (calvarado@itcr.ac.cr)

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN: Centro de Investigación en Biotecnología (CIB)

RESUMEN: Con el objetivo de establecer un protocolo de crioconservación de semillas y estructuras vegetativas de orquídeas, se seleccionaron varias especies mesoamericanas de las cuales se tomaron, como explantes iniciales, semillas de cápsulas cerradas y abiertas, así como protocormos y ápices meristemáticos obtenidos de vitroplantas. Para determinar la viabilidad de las semillas se utilizó el método con TTC al 0,6% publicado por Stempenkus y Lampheor (1967) y se aplicaron metodologías de desinfección superficiales, tanto de las cápsulas cerradas, por medio de etanol de 95% y flameo, como de las semillas obtenidas de frutos abiertos, haciendo uso de NaOCl al 0,5% i.a. por 8-10 minutos.

Semillas de las especies de *Guarianthe skinneri*, *Sobralia* sp., *Warscewiczella discolor*, *Lycaste tricolor* y *Epidendrum* sp. fueron utilizadas para establecer la metodologías de crioconservación por medio de la técnica de vitrificación, en la cual los explantes se colocaron en una solución de carga por 20 minutos, seguido de la inmersión en PVS2 (por 40 o 60 minutos, dependiendo de la especie) para luego introducir en nitrógeno líquido. El descongelamiento se realizó por medio de Baño María a 40°C por 60-90 segundos, seguido de al menos tres lavados con solución de lavado, cada uno con una duración de 3-5 minutos. De acuerdo con el análisis estadístico, la solución de carga puede omitirse en algunas especies y en otras puede favorecer la sobrevivencia.

Utilizando las mismas especies, el protocolo de crioconservación de semillas utilizando soluciones saturadas de CaCl₂ *2H₂O y LiCl, consistió en exponer estas estructuras en un sistema cerrado con una atmósfera controlada de baja humedad provocado por dichas soluciones, por un periodo cercano a las 24 horas, luego de los cual fueron congeladas en nitrógeno líquido. El descongelamiento rápido se logró por medio de Baño María a 40°C por 60 segundos y posteriormente se inocularon en medio de germinación. Este sistema representa una excelente y novedosa alternativa de crioconservación, ya que produjo mayores porcentajes de germinación que los obtenidos por la técnica de vitrificación, además de ser una metodología fácil de seguir, accesible, rápida de ejecutar y de bajo costo.

La técnica de vitrificación en protocormos de 1-2 mm de diámetro, no resultó efectiva para las especies evaluadas (*Maxillaria* sp. y *Prostechea ochracea*). Los pretratamientos con medios y soluciones de precultivo con altas concentraciones de sacarosa, el uso de solución de carga y PVS2 no fueron suficientes para proteger a estos explantes de las condiciones del nitrógeno líquido. El tamaño y la estructura esférica de los protocormos probablemente limitaron el efecto de los agentes crioprotectores, evitando su sobrevivencia luego del congelamiento.

Se utilizó la técnica de vitrificación en ápices meristemáticos de *Trichocentrum cebolleta*. A pesar de que los resultados no fueron estadísticamente significativos, sí se dio sobrevivencia en algunos de los casos en los que se utilizó PVS2 solo o combinado con la aplicación de

previa de una solución de carga, representando esto una posibilidad de establecer una metodología efectiva de crioconservación para explantes vegetativos de orquídeas.

PALABRAS CLAVE: Crioconservación, semillas, orquídeas, protocormos, nitrógeno líquido, vitrificación, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, LiCl .

1. Introducción

La familia Orchidaceae, a pesar de ser la familia más grande de plantas con flor, también es una de las familias más amenazadas a nivel mundial, debido a la deforestación, alteración de su hábitat y extracción descontrolada para su comercio ilegal, especialmente como plantas ornamentales (Kuan y González, 1993; Alvarado, 2000).

La reproducción comercial mediante técnicas de cultivo *in vitro* es ampliamente utilizada, sin embargo, los casos de extinción y poblaciones amenazadas persisten. Los esfuerzos de conservación *ex situ* en esta familia han estado dirigidos particularmente al establecimiento de bancos de semillas, los cuales no aseguran la estabilidad y viabilidad de estas estructuras a largo plazo. Se ha reportado el uso de técnicas de conservación a largo plazo, mediante crioconservación con nitrógeno líquido, en semillas, protocormos, cuerpos protocórmicos y brotes de orquídeas, pero enfocados especialmente en especies, variedades e híbridos de origen asiático (Thammasiri y Soamkul, 2007; Kiu Hwa *et al.*, 2009; Safrinah *et al.*, 2009; Yin y Hong, 2009). Los estudios en crioconservación de especies mesoamericanas han sido pocos; existe el reporte de crioconservación de brotes en *Brassia rex*, realizado en Malasia por Johari *et al.*, 2009. En Costa Rica se reporta un estudio del Instituto Tecnológico de Costa Rica en crioconservación de ápices meristemáticos de *Lycaste bradeorum* y *Trichocentrum sp.* donde se utilizó la técnica de vitrificación (Abdelnour y Muñoz, 1997). No se reporta en el país la aplicación de técnicas de crioconservación de semillas ni protocormos de especies de la familia Orchidaceae, y aunque el mercado y la diversidad de estas plantas son relevantes en Costa Rica, los esfuerzos de conservación se dan en colecciones vivas *in situ* y *ex situ*.

La familia Orchidaceae es la más extensa dentro de las Angiospermas y también la más diversa. El número de especies fluctúa entre 17000 y 35000 especies conocidas, las cuales se agrupan en 650 a 900 géneros (Kuan y González, 1993). Esta familia está excelentemente representada en Costa Rica, con más de 1400 especies distribuidas en 179 géneros (Mora-Retana y García, 1992). Aunque Costa Rica es reconocida por poseer una gran diversidad de orquídeas, muchas de las especies que existen en su territorio (al igual que sucede en otras partes del mundo) están en peligro de extinción. La deforestación y la extracción indiscriminada ha provocado serios daños especialmente en las poblaciones de orquídeas epífitas, las cuales, al ser tan especializadas en su ecología, se ven seriamente afectadas por los cambios ambientales. Además de lo anterior, las orquídeas, aunque pueden producir millones de semillas, presentan bajos porcentajes de germinación en condiciones naturales, ya que el endospermo que rodea el embrión es muy poco o no existe. Para obtener los nutrientes necesarios para germinar, las orquídeas han desarrollado relaciones simbióticas con hongos (micorrizas) específicos. Por lo tanto, se podría decir que las orquídeas son muy eficientes en la producción de semillas, pero no así en el proceso de germinación (Alvarado, 2000).

En los últimos años, el valioso germoplasma de orquídeas tropicales, virtualmente en extinción, debido a la extensiva alteración de su hábitat natural y al saqueo continuo de las plantas en estado silvestre, necesita ser conservado (Thammasiri, 2005). Existen dos

métodos principales de conservación de plantas en peligro de extinción: conservación *in situ*, en la cual se mantienen las plantas en su hábitat natural y conservación *ex situ*, en la cual las plantas se mantienen bajo condiciones artificiales (Hirano *et al.*, 2005). La crioconservación en plantas es una alternativa de conservación *ex situ* y se ha demostrado su éxito en almacenamiento de ápices, meristemos, semillas, embriones cigóticos y somáticos, polen y células. (Engelmann, 2000; Abdelnour, 1999).

El método de crioconservación consiste en llevar material biológico desde su temperatura fisiológicamente normal, hasta ultra bajas temperaturas (generalmente en nitrógeno líquido, -196°C). A esta temperatura la división celular y los procesos metabólicos cesan, por lo que el material puede permanecer almacenado por tiempo indefinido sin que sufra modificaciones o alteraciones. Sin embargo, el éxito del proceso dependerá del acondicionamiento que se 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 provocan grandes daños en las membranas de la mayoría de células (Abdelnour, 1999; Villalobos y Engelmann, 1995).

La crioconservación se reconoce como la única opción disponible para el almacenamiento, a largo plazo, en condiciones de alta estabilidad genética, del germoplasma de especies propagadas vegetativamente y especies con semillas clasificadas como recalcitrantes e intermedias en cuanto al almacenamiento (Abdelnour, 1999; Villalobos y Engelmann, 1995). También esta forma de conservación se utiliza como duplicado o respaldo de colecciones conservadas mediante otras técnicas (Engelmann, 2000).

Al ser comparado con el método de conservación *in vitro* a mediano plazo o con bancos de semillas convencionales, el método de crioconservación presenta ventajas considerables. Como el material se almacena en tanques, el espacio para mantener la colección es considerablemente menor ($0,5\text{ m}^2$ para un tanque de almacenamiento con capacidad de 100 litros de nitrógeno líquido y miles de muestras), el costo por labor de mantenimiento es mínimo, donde la labor rutinaria es el llenado del tanque cada semana o semana de por medio, para que el nitrógeno líquido permanezca a un nivel mínimo de seguridad, lo que no toma más de 15 minutos. Además, una vez almacenado los materiales, no se manipulan, se encuentran protegidos de agentes contaminantes y en caso de requerirse una muestra, ésta puede ser descongelada y las plantas recuperadas y multiplicadas en corto tiempo. El factor decisivo en la selección del material a conservar es la disponibilidad de la técnica de cultivo *in vitro* para la especie de interés, con el fin de regenerar fácilmente el explante conservado (Abdelnour, 1999; Villalobos y Engelmann, 1995).

Existen diferentes procedimientos de crioconservación. Los métodos clásicos consisten en el pretratamiento del material con sustancias crioprotectoras como el sulfóxido de dimetilo (DMSO), el glicerol, la sacarosa y el polietilenglicol y 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 ($0,3^{\circ}\text{C}$ a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hasta -40°C , luego se almacena en nitrógeno líquido. Este procedimiento ha resultado más eficiente con unidades pequeñas de morfología uniforme como protoplastos, células en suspensión y callos, y menos eficiente con unidades mayores como embriones cigóticos, embriones somáticos maduros y brotes (Abdelnour, 1999).

La técnica de *encapsulamiento/deshidratación* se basa en la tecnología de semilla sintética, que consiste en encapsular meristemos, ápices y embriones somáticos en alginato y cultivarlos en medio líquido con concentraciones altas de sacarosa durante diferentes períodos. Antes de congelarse rápidamente en nitrógeno líquido, las cápsulas son parcialmente deshidratadas bajo un flujo de aire estéril o utilizando sílica gel. Para la recuperación, las muestras se colocan en el medio de cultivo estándar (Abdelnour, 1999).

La técnica de *vitrificación* consiste en el pretratamiento de las muestras con soluciones concentradas de crioprotectores (sacarosa, glicerol y DMSO) por unos minutos, seguido por el congelamiento en nitrógeno líquido para alcanzar un estado de vitrificación de los solutos internos (Abdelnour, 1999). Kiu Hwa *et al* (2009) crioconservaron cuerpos protocórmicos (obtenidos por cultivo de meristemos) de *Dendrobium* Sonia 28, precultivando estas estructuras en concentraciones crecientes de sacarosa y utilizando la solución vitrificadora PVS2 (30% de glicerol, 15% de etilenglicol y 15% de DMSO). También se ha utilizado esta técnica en brotes de *Mokara* Golden Nugget (Safrinah *et al.*, 2009). Asimismo se ha utilizado en semillas de *Vanda coerulea* Griff., sumergiéndolas en solución PVS2 para su congelamiento en nitrógeno líquido; posterior al período de congelamiento, la solución PVS2 fue eliminada con una solución de sacarosa 1,2 M y las semillas se inocularon en medio de germinación obteniéndose un 67% de respuesta contra ninguna sobrevivencia en el tratamiento testigo (Thammasiri y Soamkul, 2007). En especies mesoamericanas, la técnica de vitrificación se ha utilizado con brotes de *Brassia rex* (Johari *et al.*, 2009) y con ápices meristemáticos obtenidos de vitroplantas de *Lycaste bredeorum* y *Trichocentrum sp.* (Abdelnour y Muñoz, 1997), ambos casos utilizaron como solución vitrificadora PVS2.

El método de *encapsulamiento/vitrificación* es una combinación de las técnicas anteriores. Las muestras encapsuladas se congelan en presencia de soluciones vitrificadoras. El encapsulamiento en alginato reduce la toxicidad de las soluciones vitrificadoras y la manipulación es menor, lo que reduce la duración del proceso (Abdelnour, 1999). Yin y Hong (2009) utilizaron esta técnica con cuerpos protocórmicos de *Dendrobium candidum* con una sobrevivencia del 85%; como solución vitrificadora hicieron uso de PVS2.

El procedimiento de *deseccación* requiere de una deshidratación de las muestras utilizando aire estéril o sílica gel, y el congelamiento es rápido, directamente en nitrógeno líquido (Abdelnour, 1999).

La técnica de *congelamiento por microgotas* radica en pretratar explantes pequeños (meristemos) con DMSO en medio líquido, para luego colocarlo en gotas (2,5 µl) del mismo medio, colocarlo en segmentos de papel aluminio y colocarlo directamente en nitrógeno líquido (Abdelnour, 1999; Schafer- Menuhr, 1995).

Esta investigación tuvo como objetivo trabajar en el desarrollo de conocimiento científico de las diferentes plagas y enfermedades que afectan al cultivo del higo, como parte de las estrategias de la diversificación del agro nacional, ya que actualmente no es prudente continuar con la aplicación de agroquímicos en forma discriminada que aparte de las contaminaciones ambientales que provocan, limitan el mercado del producto.

Esta investigación tuvo como objetivo el desarrollo de una metodología de crioconservación para semillas y protocormos/ápices obtenidos por germinación asimbiótica, de cinco especies de orquídeas mesoamericanas, utilizando técnicas de

inmersión en nitrógeno líquido, con diferentes tratamientos de deshidratación y/o vitrificación, así como la recuperación del material postcongelamiento; estandarizando además las técnicas de viabilidad y germinación asimbiótica. Asimismo, la investigación permitió comparar la factibilidad de desarrollar metodologías de crioconservación para semillas y para protocormos/ápices, desde el punto de vista técnico y práctico.

El establecimiento de una metodología de crioconservación de material con potencial de reproducción, abre la posibilidad de establecer bancos de germoplasma de este tipo como alternativas de programas de conservación *ex situ*. El Tecnológico de Costa Rica se convierte en una institución pionera en este tipo de estrategias de conservación a largo plazo de la biodiversidad vegetal. También permite el intercambio de germoplasma entre empresas e instituciones dedicadas a la investigación, conservación y reproducción con fines comerciales.

2. Metodología

2.1 Crioconservación de *Warscewiczella discolor*

2.1.1 Obtención de semilla

Se tomó una cápsula cerrada de *W. discolor* cosechada y almacenada por 20 días en refrigeración. Se lavó con agua y jabón líquido antibacterial con ayuda de un cepillo de dientes, eliminando los remanentes de pétalos florales y el extremo del pedicelo. Posteriormente, en cámara de flujo laminar, la cápsula fue sumergida en etanol 95% por cinco minutos. Luego fue flameada dos veces haciendo uso de un mechero de alcohol.

La cápsula fue abierta estérilmente con ayuda de bisturí y pinzas, hasta extraer las semillas, que fueron depositadas en un plato petri, sobre papel filtro.

Adicionalmente se obtuvo una cápsula abierta de *W. discolor* de la misma planta madre, de la cual se cosechó la semilla contenida en su interior, la cual fue utilizada solamente para realizar pruebas de viabilidad.

2.1.2 Viabilidad de semilla

Para determinar el porcentaje de viabilidad de las semillas de *Warscewiczella discolor* obtenidas de cápsula abierta, se utilizó una solución de Cloruro de Trifenil Tetrazolio (TTC) al 1% de acuerdo con Lauzer *et al.*(1994). Se tomaron tres muestras de semilla (50-100 mg) y se colocaron en platos petri de 100 mm de diámetro con la solución de TTC. Se establecieron los siguientes tratamientos:

- A) 15 ml de solución TTC al 1%, a (20 ± 2) °C
- B) 15 ml de solución TTC al 1% + 2 gotas de Tween 20 a (20 ± 2) °C
- C) 15 ml de solución TTC al 1% a (25 ± 2) °C

Los tres tratamientos se colocaron en oscuridad por 96 horas. Posteriormente se evaluó viabilidad al microscopio, tomando como viables aquellas semillas teñidas de rojo-naranja y no viables aquellas no teñidas o desprovistas de embrión. El conteo al microscopio se hizo en un aumento de 10X. Se realizaron tres réplicas, cada una compuesta por muestras de 61 semillas. Se analizaron diferencias entre ellos por medio de la prueba ANOVA de una vía, con un 95% de confianza.

Para la determinación de la viabilidad de semillas obtenidas de cápsula cerrada, se tomó una muestra (>1000 semillas) que fue colocada en 15 ml de TTC al 1% + 2 gotas de Tween 20, en un plato petri. La prueba se colocó por 96 horas en oscuridad, a 25±2 °C. Posterior al periodo de incubación, se tomaron dos muestras de 300 semillas y se evaluó el porcentaje de viabilidad.

2.1.3 Deshidratación con aire estéril y crioconservación

A partir de semillas de cápsula cerrada, se establecieron los siguientes tratamientos de crioconservación utilizando deshidratación por medio de aire estéril proveniente de una cámara de flujo laminar horizontal

Cuadro 1. Tratamientos de crioconservación de semillas de *W. discolor* aplicando deshidratación con aire estéril

Tratamiento	Tiempo de deshidratación (minutos)	Nitrógeno Líquido
1	0	Sí
2	0	No
3	5	Sí
4	5	No
5	10	Sí
6	10	No
7	15	Sí
8	15	No

Los tratamientos que incluyeron crioconservación, tuvieron una duración de inmersión en nitrógeno líquido de tres horas, haciendo uso de criotubos de 1,5 ml de capacidad. El descongelamiento de los tratamientos que incluyeron nitrógeno líquido se realizó por medio de Baño María a 40°C, por 60 segundos. Las semillas fueron inoculadas en los medios de cultivo con 1 ml de agua destilada estéril.

Para cada uno de los tratamientos, las semillas se cultivaron en uno de los siguientes medios de cultivo base:

- a. Knudson C (1946) al 100% de sales minerales
- b. Knudson C (1946) al 50% de sales minerales
- c. Murashige & Skoog (1962) 100% de sales minerales

d. Murashige & Skoog (1962) 50% de sales minerales
 Todos los anteriores medios fueron suplementados con Vitaminas M&S (1962) + 2% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

2.1.4 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

Semilla obtenida de cápsula cerrada de *W. discolor* fue sometida a diferentes tratamientos de vitrificación con solución PVS2 (30% glicerol, 15% de etilenglicol y 15% de DMSO en base complementario de un medio M&S -1962- con 0,4 M sacarosa), previo a la crioconservación en nitrógeno líquido. Se establecieron los siguientes tratamientos

Cuadro 2. Tratamientos de crioconservación de semillas de *W. discolor* aplicando solución vitrificadora PVS2

Tratamiento	Tiempo de inmersión en PVS2 (minutos)	Nitrógeno Líquido
1	0	Sí
2	0	No
3	20	Sí
4	20	No
5	40	Sí
6	40	No

La solución vitrificadora PVS2, en los casos en que se aplicó (tratamientos del 3 al 6), se utilizó en volúmenes de 1 ml. Los tratamientos que incluyeron crioconservación, tuvieron una duración de inmersión en nitrógeno líquido de tres horas, haciendo uso de criotubos de 1,5 ml de capacidad.

El descongelamiento de los tratamientos que incluyeron nitrógeno líquido, se realizó por medio de Baño María a 40°C, por 60 segundos. La solución PVS2 fue removida por medio de tres lavados con solución de lavado (medio de cultivo líquido M&S -1962- con vitaminas M&S y 1,2M de sacarosa, con un pH ajustado a 5,7), de dos minutos de duración cada lavado.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en un frasco con los siguientes medios de cultivo base:

- a. Knudson C (1946) al 100% de sales minerales
 - b. Knudson C (1946) al 50% de sales minerales
 - c. Murashige & Skoog (1962) 100% de sales minerales
 - d. Murashige & Skoog (1962) 50% de sales minerales
- Todos los anteriores medios fueron suplementados con Vitaminas M&S (1962) + 2% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

Los medios de cultivo con las semillas inoculadas, se colocaron en el cuarto de crecimiento a 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y una intensidad lumínica cercana a los 2000 lux.

2.1.5 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Para la deshidratación de semillas de cápsula cerrada de *W. discolor*, utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se diseñó un sistema cerrado que permitiera crear una atmósfera con humedad relativa controlada producida por dichas soluciones, de forma tal que las semillas fueran expuestas a esta atmósfera, sin sumergirse en la solución (Ver figura 1).

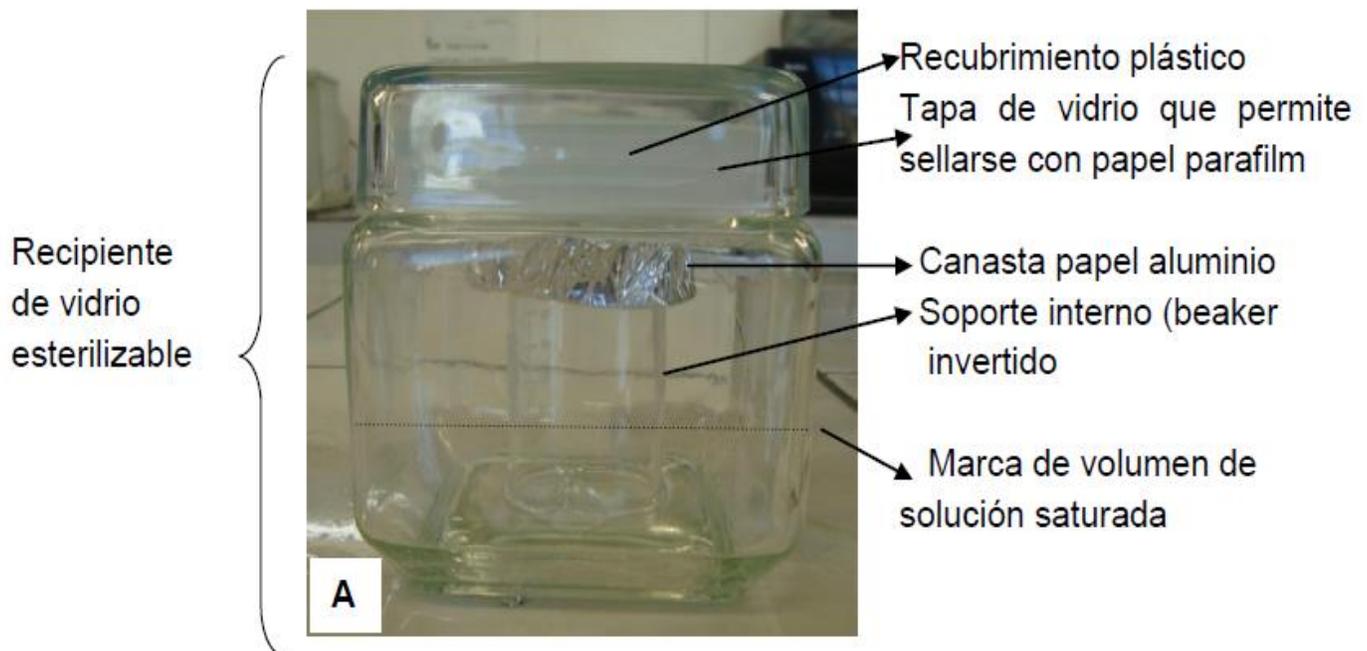




Figura 1. Sistema de deshidratación con tapa separada. A) Vista frontal con sus respectivas partes. B). Vista superior mostrando canasta para colocación de semillas.

Las semillas fueron colocadas en los sistemas de deshidratación por cinco días, luego de lo cual se realizaron los tratamientos de crioconservación, tal y como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 3. Tratamientos de crioconservación de semillas de *Warszewiczella discolor* aplicando deshidratación por medio de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl

Tratamiento	Solución saturada	Nitrógeno Líquido
1	CaCl ₂ * 2H ₂ O	Sí
2	CaCl ₂ * 2H ₂ O	No
3	LiCl	Sí
4	LiC	No
5	Ninguna	Sí
6	Ninguna	No

La inmersión en nitrógeno líquido, en los casos que aplicaba, se realizó por espacio de tres horas, para luego realizar el descongelamiento por medio de Baño María a 40°C, por 60 segundos.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en un frasco con los siguientes medios de cultivo base:

- a. Knudson C (1946) al 100% de sales minerales
- b. Knudson C (1946) al 50% de sales minerales
- c. Murashige & Skoog (1962) 100% de sales minerales
- d. Murashige & Skoog (1962) 50% de sales minerales

Todos los anteriores medios fueron suplementados con Vitaminas M&S (1962) + 2% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

Los medios de cultivo con las semillas inoculadas, se colocaron en el cuarto de crecimiento a 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y una intensidad lumínica cercana a los 2000 lux.

2.2 Crioconservación de *Guarianthe skinneri* (Código 01-13)

2.2.1 Obtención de semilla

Se tomó una cápsula cerrada de *G. skinneri* (código 01-13) cosechada y almacenada por 7 días en refrigeración. Se lavó con agua y jabón líquido antibacterial con ayuda de un cepillo de dientes, eliminando los remanentes de pétalos florales y el extremo del pedicelo. Posteriormente, en cámara de flujo laminar, la cápsula fue sumergida en etanol 95% por cinco minutos. Luego fue flameada dos veces haciendo uso de un mechero de alcohol.

La cápsula fue abierta estérilmente con ayuda de bisturí y pinzas, hasta extraer las semillas, que fueron depositadas en un plato petri, sobre papel filtro.

2.2.2 Viabilidad de semilla

Para la determinación de la viabilidad de las semillas de *G. skinneri*, se utilizó una solución de Cloruro de Trifenil Tetrazolio (TTC) de acuerdo con el protocolo de Stempenkus y Lampheor (1967). Esta solución está compuesta de TTC al 0,6% y Na_2HPO_4 (0,89%) y Na_2HPO_4 (0,68%) como amortiguadores.

Una muestra de semilla de aproximadamente 100 mg fue colocada en un plato petri junto con 15 ml de solución TTC al 0,6%, por espacio de 96 horas, en condiciones de oscuridad, a 25 ± 2 °C .

Luego del período de incubación, se procedió a realizar el conteo al microscopio, en un aumento de 10X. Se tomaron dos muestras para el conteo, cada una compuesta de 370 semillas.

2.2.3 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

La semilla *G. skinneri* (código 01-13) fue sometida a diferentes tratamientos de vitrificación con solución PVS2 y aplicación de solución de carga o *loading solution* (compuesta por 2 M de glicerol y 0,4 M de sacarosa, en base de medio líquido M&S - 1962- completo, ajustado a un pH de 5,7) (Cuadro 4)

Cuadro 4. Tratamientos de crioconservación de semillas de *Guarianthe skinneri* (código 01-13) aplicando la técnica de vitrificación

Tratamiento	Solución de carga (20 minutos)	Tiempo de inmersión en PVS2 (minutos)	Nitrógeno Líquido
1	No	0	No
2	No	0	Sí
3	Sí	0	Sí
4	Sí	20	Sí
5	Sí	40	Sí
6	No	20	Sí
7	No	40	Sí

La solución de carga, cuando se aplicó, se hizo por espacio de 20 minutos en todos los casos. Cuando esta se aplicó antes del PVS2, se retiró del criotubo y se reemplazó por PVS2 (tratamientos 4 y 6). En los casos en que se aplicó solución de carga, seguido de inmersión de nitrógeno líquido (tratamiento 3), esta fue retirada luego de la crioconservación y las semillas se lavaron tres veces con medio de lavado, cada uno de dos minutos de duración.

Los tratamientos que incluyeron crioconservación, tuvieron una duración de inmersión en nitrógeno líquido de tres horas, haciendo uso de criotubos de 1,5 ml de capacidad.

El descongelamiento de los tratamientos que incluyeron nitrógeno líquido, se realizó por medio de Baño María a 40°C, por 60 segundos. La solución PVS2 fue removida por medio de tres lavados con solución de lavado, de dos minutos de duración cada lavado.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S + 2% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

2.2.4 Germinación

Los medios de cultivo con las semillas inoculadas, se colocaron en el cuarto de crecimiento a 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y una intensidad lumínica cercana a los 2000 lux.

Después de 14 días de inoculación en medio de cultivo, se evaluó el porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos aplicados, según el cuadro 4. Para ello, se tomó una muestra de semillas de cada tratamiento y se preparó una lámina de microscopio (cubreobjetos + portaobjetos), utilizando agua como medio de suspensión. Se realizaron dos repeticiones de la lectura, en cada tratamiento, en un aumento 10X.

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de un diseño factorial 3x2, excluyendo el control testigo sin nitrógeno líquido.

2.3 Crioconservación de *Epidendrum* sp.

2.3.1 Obtención de semilla

Se tomó una cápsula cerrada de *Epidendrum* sp. colectada en el Jardín Botánico Lankester y almacenada por 7 días en refrigeración. Se lavó con agua y jabón líquido antibacterial con ayuda de un cepillo de dientes. Posteriormente, en cámara de flujo laminar, la cápsula fue sumergida en etanol 95% por 5 minutos. Luego fue flameada haciendo uso de un mechero de alcohol.

La cápsula fue abierta estérilmente con ayuda de bisturí y pinzas, hasta extraer las semillas, que fueron depositadas en un plato petri, sobre papel filtro.

2.3.2 Viabilidad de semilla

Para la determinación de la viabilidad de las semillas de *Epidendrum* sp., se utilizó una muestra de semilla de aproximadamente 100 mg, que fue colocada en un plato petri junto con 15 ml de solución TTC al 0,6%, por espacio de 96 horas, en condiciones de oscuridad, a 25 ± 2 °C .

Luego del período de incubación, se procedió a realizar el conteo al microscopio, en un aumento de 10X. Se tomaron dos muestras para el conteo, cada una compuesta de 370 semillas.

2.3.3 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

La semilla *Epidendrum* sp. fue sometida a diferentes tratamientos de vitrificación con solución PVS2 y aplicación de solución de carga (Cuadro 5)

Cuadro 5. Tratamientos de crioconservación de semillas de *Epidendrum* sp. aplicando la técnica de vitrificación

Tratamiento	Solución de carga (20 minutos)	Tiempo de inmersión en PVS2 (minutos)	Nitrógeno Líquido
1	No	0	No
2	No	0	Sí
3	Sí	0	Sí
4	Sí	20	Sí
5	Sí	40	Sí
6	No	20	Sí
7	No	40	Sí

La solución de carga, cuando se aplicó, se hizo por espacio de 20 minutos en todos los casos. Cuando esta se aplicó antes del PVS2, se retiró del criotubo y se reemplazó por PVS2 (tratamientos 4 y 6). En los casos en que se aplicó solución de carga, seguido de inmersión de nitrógeno líquido (tratamiento 3), esta fue retirada luego de la crioconservación y las semillas se lavaron tres veces con medio de lavado, cada uno de dos minutos de duración.

Los tratamientos que incluyeron crioconservación, tuvieron una duración de inmersión en nitrógeno líquido de 24 horas, haciendo uso de criotubos de 1,5 ml de capacidad.

El descongelamiento de los tratamientos que incluyeron nitrógeno líquido, se realizó por medio de Baño María a 40°C, por 60 segundos. La solución PVS2 fue removida por medio de tres lavados con solución de lavado, de dos minutos de duración cada lavado.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S (1962) + 2% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de un diseño factorial 3x2, excluyendo el control testigo sin nitrógeno líquido.

2.3.4 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Para la deshidratación de semillas de *Epidendrum* sp., utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se diseñó otro sistema distinto al expuesto en la figura 1, que tuvo el mismo objetivo de crear una atmósfera con humedad relativa controlada producida por las soluciones saturadas (Figura 2).



Figura 2. Sistema de deshidratación con sujeción de tapa y cierre, utilizado para deshidratar semillas de *Epidendrum* sp.

Las semillas fueron colocadas en los sistemas de deshidratación por cinco días, luego de lo cual se realizaron los tratamientos de crioconservación, tal y como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Tratamientos de crioconservación de semillas de *Epidendrum* sp. aplicando deshidratación por medio de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl

Tratamiento	Solución saturada	Nitrógeno Líquido
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sí
2	LiCl	Sí
3	Ninguna	Sí

La inmersión en nitrógeno líquido se realizó por espacio de 24 horas, para luego realizar el descongelamiento por medio de Baño María a 40°C , por 60 segundos.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S + 2% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA unidireccional, con un 95% de confianza.

2.3.5 Germinación

Después de 28 días de inoculación en medio de cultivo, se evaluó el porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos aplicados. Para ello, se tomó una muestra de semillas de cada tratamiento y se prepararon láminas de microscopio, utilizando agua como medio de suspensión. Se realizaron dos repeticiones de la lectura, en cada tratamiento, en un aumento 10X.

2.4 Crioconservación de *Guarianthe skinneri* (código 02-13)

2.4.1 Obtención de semilla

Se tomaron dos cápsulas cerradas de *Guarianthe skinneri* obtenidas de una colección privada y almacenadas por siete días en refrigeración. Se lavaron con agua y jabón líquido antibacterial, con ayuda de un cepillo de dientes. Posteriormente, en cámara de flujo laminar, ambas cápsulas fueron sumergidas en etanol 95% por cinco minutos. Luego fueron flameadas en dos ocasiones, haciendo uso de un mechero de alcohol.

Los frutos fueron abiertos estérilmente con ayuda de bisturí y pinzas, hasta extraer las semillas, que fueron mezcladas y depositadas en un plato petri, sobre papel filtro.

2.4.2 Viabilidad de semilla

Para la determinación de la viabilidad de las semillas de *Guarianthe skinneri* (código 02-13), se utilizó una muestra de semilla de aproximadamente 100 mg, que fue colocada en un plato petri junto con 15 ml de solución TTC al 0,6%, por espacio de 96 horas, en condiciones de oscuridad, a 25 ± 2 °C .

Luego del período de incubación, se procedió a realizar el conteo al microscopio, en un aumento de 10X. Se tomaron dos muestras para el conteo, cada una compuesta de 370 semillas.

2.4.3 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

La semilla *Guarianthe skinneri* (código 02-13) fue sometida a diferentes tratamientos de vitrificación con solución PVS2 y aplicación de solución de carga (Cuadro 7)

Cuadro 7. Tratamientos de crioconservación de semillas de *Guarjanthe skinneri* (código 02-13) aplicando la técnica de vitrificación

Tratamiento	Solución de carga (20 minutos)	Tiempo de inmersión en PVS2 (minutos)	Nitrógeno Líquido
1	No	0	No
2	No	0	Sí
3	Sí	0	Sí
4	Sí	20	Sí
5	Sí	40	Sí
6	Sí	60	Sí
7	No	20	Sí
8	No	40	Sí
9	No	60	Sí

La solución de carga, cuando se aplicó, se hizo por espacio de 20 minutos en todos los casos. Cuando esta se aplicó antes del PVS2, se retiró del criotubo y se reemplazó por PVS2 (tratamientos 4, 5 y 6). En los casos en que se aplicó solución de carga, seguido de inmersión de nitrógeno líquido (tratamiento 3), esta fue retirada luego de la crioconservación y las semillas se lavaron tres veces con medio de lavado, cada uno de dos minutos de duración.

Los tratamientos que incluyeron crioconservación, tuvieron una duración de inmersión en nitrógeno líquido de 24 horas, haciendo uso de criotubos de 1,5 ml de capacidad.

El descongelamiento de los tratamientos que incluyeron nitrógeno líquido, se realizó por medio de Baño María a 40°C, por 60 segundos. La solución PVS2 fue removida por medio de tres lavados con solución de lavado, de dos minutos de duración cada lavado. De igual forma, en el tratamiento 3, la solución de carga también fue retirada mediante tres lavados con solución de lavado, luego de la inmersión en nitrógeno líquido y su posterior descongelamiento.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S (1962) + 2% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de un diseño factorial 4x2, excluyendo el control testigo sin nitrógeno líquido.

2.4.4 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Para la deshidratación de semillas de *Guarjanthe skinneri* (código 02-13), por medio de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se utilizó el diseño expuesto en la figura 2.

Las semillas fueron colocadas en los sistemas de deshidratación por seis días, luego de lo cual se realizaron los tratamientos de crioconservación, tal y como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 8. Tratamientos de crioconservación de semillas de *Guarjanthe skinneri* (código 02-13) aplicando deshidratación por medio de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl

Tratamiento	Solución saturada	Nitrógeno Líquido
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sí
2	LiCl	Sí
3	Ninguna	Sí

La inmersión en nitrógeno líquido se realizó por espacio de 24 horas, para luego realizar el descongelamiento por medio de Baño María a 40°C , por 60 segundos.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S + 2% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA unidireccional, con un 95% de confianza.

2.4.5 Germinación

Después de 14 días de cultivo en medio de germinación, se evaluó el porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos aplicados. Para ello, se tomó una muestra de semillas de cada tratamiento y se prepararon láminas de microscopio, utilizando agua como medio de suspensión. Se realizaron dos repeticiones de la lectura, en cada tratamiento, en un aumento 10X.

2.5 Crioconservación de *Sobralia* sp. (código 03-13)

2.5.1 Obtención y desinfección de semilla

Se tomó una cápsula abierta de *Sobralia* sp, perteneciente a un “enjambre híbrido” ubicado en el Jardín Botánico Lankester. La semilla fue recuperada y antes de desinfectarla, se tomó una muestra para fijarla en una lámina de microscopio y otra muestra para realizar la prueba de viabilidad. El resto de la semilla fue almacenada en refrigeración por cinco días.

Luego del periodo de refrigeración, se tomó una muestra adicional de semilla sin desinfectar para evaluar nuevamente viabilidad. El resto de la semilla fue desinfectada con una solución de NaOCl al 0,5% por 10 minutos. Para ello la semilla fue colocada en un vial estéril donde se aplicó la solución de NaOCl (30 ml aproximadamente) más una gota de Tween 20 como surfactante. Después de la inmersión en NaOCl la semilla fue recuperada mediante filtración por gravedad, para posteriormente realizar el lavado con agua destilada estéril (30 ml aproximadamente) sobre el papel filtro.

Luego de la desinfección se tomó una muestra para evaluar viabilidad y el resto para las pruebas de criopreservación.

2.5.2 Viabilidad de semilla

A partir de las semillas obtenidas, antes y después de refrigerar y desinfectar, se tomaron muestras que fueron colocadas en 15 ml de TTC al 0,6%, en un frasco gerber pequeño. Las prueba se colocó por 120 horas, en oscuridad, a 25±2 °C.

Luego del periodo de incubación, se determinó el porcentaje de viabilidad utilizando el microscopio en un aumento de 4X. Se realizaron tres conteos de 100 semillas, para cada una de las muestras de semillas: semilla recién extraída de cápsula, después de almacenar en refrigeración por cinco días y después de aplicar protocolo de desinfección.

2.5.3 Crioprotección con PVS2 y criopreservación

La semilla *Sobralia* sp. fue sometida a diferentes tratamientos de vitrificación con solución PVS2 y aplicación de solución de carga (Cuadro 9)

Cuadro 9. Tratamientos de criopreservación de semillas de *Sobralia* sp., aplicando la técnica de vitrificación

Tratamiento	Solución de carga (20 minutos)	Tiempo de inmersión en PVS2 (minutos)	Nitrógeno Líquido
1	No	0	No
2	No	0	Sí
3	Sí	0	Sí
4	Sí	20	Sí
5	Sí	40	Sí
6	Sí	60	Sí
7	No	20	Sí

8	No	40	Sí
9	No	60	Sí

La solución de carga, cuando se aplicó, se hizo por espacio de 20 minutos en todos los casos. Cuando esta se aplicó antes del PVS2, se retiró del criotubo y se reemplazó por PVS2 (tratamientos 4, 5 y 6). En los casos en que se aplicó solución de carga, seguido de inmersión de nitrógeno líquido (tratamiento 3), esta fue retirada luego de la crioconservación y las semillas se lavaron tres veces con medio de lavado, cada uno de dos minutos de duración.

Los tratamientos que incluyeron crioconservación, tuvieron una duración de inmersión en nitrógeno líquido de 17 horas, haciendo uso de criotubos de 1,5 ml de capacidad.

El descongelamiento de los tratamientos que incluyeron nitrógeno líquido, se realizó por medio de Baño María a 40°C, por 90 segundos. La solución PVS2 fue removida por medio de tres lavados con solución de lavado, de cinco minutos de duración cada lavado. De igual forma, en el tratamiento 3, la solución de carga también fue retirada mediante tres lavados con solución de lavado, luego de la inmersión en nitrógeno líquido y su posterior descongelamiento.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S (1962) + 3% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de un diseño factorial 4x2, excluyendo el control testigo sin nitrógeno líquido.

2.5.4 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Para la deshidratación de semillas de *Sobralia* sp., por medio de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se utilizó un nuevo sistema de deshidratación, correspondiente un recipiente de vidrio de 15 cm de altura y 4 cm de diámetro, con tapa rosca (Figura 3)



Figura 3. Sistema de deshidratación con tapa rosca, utilizado para deshidratación por medio de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

Las semillas fueron colocadas en los sistemas de deshidratación por cinco días, luego de lo cual se realizaron los tratamientos de crioconservación, tal y como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 10. Tratamientos de crioconservación de semillas de *Sobralia* sp. aplicando deshidratación por medio de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl

Tratamiento	Solución saturada	Nitrógeno Líquido
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sí
2	LiCl	Sí

La inmersión en nitrógeno líquido se realizó por espacio de 17 horas, para luego realizar el descongelamiento por medio de Baño María a 40°C , por 60 segundos.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S + 3% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA unidireccional, con un 95% de confianza.

2.5.5 Germinación

Después de cinco días de cultivo en medio de germinación, se evaluó el porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos aplicados. Para ello, se tomó una muestra de semillas de cada tratamiento y se prepararon láminas de microscopio, utilizando glicerol como medio de suspensión. Se realizaron tres repeticiones de la lectura en cada tratamiento, cada una compuesta de 100 semillas, en un aumento 4X.

2.6 Crioconservación de *Sobralia* sp. (código 04-13)

2.6.1 Obtención y desinfección de semilla

Se tomó una cápsula abierta de *Sobralia* sp, perteneciente al mismo “enjambre híbrido” de *Sobralia* sp. (código 03-13), ubicado en el Jardín Botánico Lankester. La semilla fue recuperada y antes de desinfectarla, se tomó una muestra para realizar la prueba de viabilidad y otra para determinar porcentaje de humedad.

Muestras de la semilla recuperada fueron desinfectadas con una solución de NaOCl al 0,5% por 8 minutos. Para ello la semilla fue colocada en viales estériles donde se aplicó la solución de NaOCl (30 ml aproximadamente) más una gota de Tween 20 como surfactante. Después de la inmersión en NaOCl la semilla fue recuperada

mediante filtración por gravedad, para posteriormente realizar el lavado con agua destilada estéril (30 ml aproximadamente) sobre el papel filtro. Este procedimiento se repitió dos veces para lograr la cantidad necesaria para todos los tratamientos.

Luego de la desinfección se tomó una muestra para evaluar viabilidad y el resto para las pruebas de crioconservación.

2.6.2 Viabilidad de semilla

A partir de las semillas de *Sobralia* sp. obtenidas de cápsula abierta, se tomó una muestra sin desinfectar, que fue colocada en 1 ml de TTC al 0,6%, en un criotubo de 1,5 ml de capacidad. La semillas en TTC se colocaron por 24 horas en oscuridad, a 25 ± 2 °C.

Siguiendo el mismo protocolo, se determinó el porcentaje de viabilidad de la semilla, luego de aplicar la desinfección superficial con NaOCl. En total se obtuvieron dos porcentajes producto de las dos desinfecciones realizadas por separado.

Luego del periodo de incubación en cada caso, se determinó el porcentaje de viabilidad utilizando el microscopio en un aumento de 4X. Se realizaron tres réplicas, cada una con una muestra de 100 semillas.

2.6.3 Determinación del porcentaje de humedad

Se tomaron dos muestras de semilla recién extraída de las cápsulas abiertas y se determinó su peso fresco, utilizando canastas de aluminio desecadas y de peso conocido. Posteriormente, las semillas fueron colocadas en la estufa a 80°C por 24 horas. Luego de transcurrir este periodo, se determinó su peso seco. El porcentaje de humedad de las semillas se calculó mediante la fórmula $[(\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / \text{Peso fresco}] \times 100$.

De igual manera, utilizando el procedimiento descrito anteriormente, se tomaron muestras de semilla recién desinfectada con NaOCl y se colocaron en los sistemas de deshidratación (figura 3) con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl, y sus tratamientos testigos (absoluto y H_2O) para determinar el porcentaje de humedad que adquieren estas estructuras, luego de permanecer 24 horas en estos sistemas.

2.6.4 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

Se estableció un diseño experimental factorial completo de tres factores, uno de ellos con cuatro niveles y los restantes dos factores con dos niveles cada uno (diseño factorial $4 \times 2 \times 2$), según se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 11. Diseño factorial completo aplicado a semillas de *Sobralia* sp. (código 04-13) para su crioconservación, aplicando la técnica de vitrificación.

Factor	Niveles
--------	---------

Solución de Carga	Sí No
Solución PVS2	0 minutos 20 minutos 40 minutos 60 minutos
Nitrógeno Líquido	Sí No

De esta forma, se establecieron los siguientes tratamientos:

Cuadro 12. Tratamientos de crioconservación de semillas de *Sobralia* sp. (código 04-13) aplicando la técnica de vitrificación

Tratamiento	Solución de carga (20 minutos)	Tiempo de inmersión en PVS2 (minutos)	Nitrógeno Líquido
1	Sí	0	Sí
2	Sí	20	Sí
3	Sí	40	Sí
4	Sí	60	Sí
5	Sí	0	No
6	Sí	20	No
7	Sí	40	No
8	Sí	60	No
9	No	0	Sí
10	No	20	Sí
11	No	40	Sí
12	No	60	Sí
13	No	0	No
14	No	20	No
15	No	40	No
16	No	60	No

La solución de carga, cuando se aplicó, se hizo por espacio de 20 minutos en todos los casos. Cuando esta se aplicó antes del PVS2, se retiró del criotubo y se reemplazó por PVS2. En los casos en que se aplicó solución de carga, seguido de inmersión de nitrógeno líquido, esta fue retirada luego de la crioconservación y las semillas se lavaron tres veces con medio de lavado, cada uno de cinco minutos de duración.

Los tratamientos que incluyeron crioconservación, tuvieron una duración de inmersión en nitrógeno líquido de 3 horas, haciendo uso de criotubos de 2 ml de capacidad.

El descongelamiento de los tratamientos que incluyeron nitrógeno líquido, se realizó por medio de Baño María a 40°C, por 90 segundos. La solución PVS2 fue removida por medio de tres lavados con solución de lavado, de tres minutos de duración cada lavado. De igual forma, en los tratamientos 1 y 5, la solución de carga también fue

retirada mediante tres lavados con solución de lavado, luego de la inmersión en nitrógeno líquido y su posterior descongelamiento.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S (1962) + 3% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

2.6.5 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Después de mantener por 24 horas en las cámaras o sistemas de deshidratación (figura 3), las semillas de *Sobralia* sp. (código 04-13) fueron sometidas a un diseño factorial completo 4x2, de acuerdo con el siguiente cuadro:

Cuadro 13. Diseño factorial completo aplicado a semillas de *Sobralia* sp. (código 04-13) para su crioconservación, aplicando la técnica de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

Factor	Niveles
Solución saturada	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ LiCl Testigo absoluto Testigo H_2O
Nitrógeno Líquido	Sí No

Se establecieron entonces los siguientes tratamientos

Cuadro 14. Tratamientos de crioconservación de semillas de *Sobralia* sp. (código 04-13) aplicando la técnica de deshidratación por medio de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

Tratamiento	Solución saturada	Nitrógeno Líquido
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sí
2	LiCl	Sí
3	Testigo Absoluto	Sí
4	Testigo H_2O	Sí
5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	No
6	LiCl	No

7	Testigo Absoluto	No
8	Testigo H ₂ O	No

La inmersión en nitrógeno líquido se realizó por espacio de 3 horas, para luego realizar el descongelamiento por medio de Baño María a 40°C, por 60 segundos.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S + 3% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

2.6.6 Germinación

Después de 14 días de cultivo en medio de germinación, se evaluó el porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos aplicados. Para ello, se tomó una muestra de semillas de cada tratamiento y se prepararon láminas de microscopio, utilizando glicerol como medio de suspensión. Se realizaron tres repeticiones de la lectura en cada tratamiento, cada una compuesta de 100 semillas, en un aumento 4X.

2.7 Crioconservación de *Lycaste tricolor*

2.7.1 Obtención y desinfección de semilla

Se tomaron cuatro cápsulas abiertas de *Lycaste tricolor*, obtenidas en el Jardín Botánico Lankester. Luego de un periodo de almacenamiento en refrigeración por cinco días, la semilla fue desinfectada con una solución de NaOCl al 0,5% por 10 minutos. Para ello la semilla fue colocada en un vial estéril donde se aplicó la solución de NaOCl (30 ml aproximadamente) más una gota de Tween 20 como surfactante. Después de la inmersión en NaOCl la semilla fue recuperada por filtración por gravedad, para posteriormente realizar el lavado con agua destilada estéril (30 ml aproximadamente) sobre el papel filtro.

2.7.2 Viabilidad de semilla

A partir de las semillas de *Lycaste tricolor* obtenidas de cápsula abierta, se tomó una muestra que fue colocada en 1 ml de TTC al 0,6%, en un criotubo de 1,5 ml de capacidad, para así determinar la viabilidad en ese punto. La prueba se colocó por 24 horas, en oscuridad, a 25±2 °C.

Siguiendo el mismo procedimiento, se determinó el porcentaje de viabilidad de la semilla, luego de aplicar la desinfección superficial con NaOCl al 0,5%.

Luego del periodo de incubación en cada caso, se determinó el porcentaje de viabilidad utilizando el microscopio en un aumento de 4X. Se realizaron tres réplicas, cada una con una muestra de 100 semillas.

2.7.3 Determinación del porcentaje de humedad

Se tomó una muestra de semilla recién desinfectada y se distribuyó en los sistemas de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, LiCl y los tratamientos testigos. Después de 24 horas de permanecer en estos sistemas, se determinó su peso fresco, utilizando canastas de aluminio desecadas y de peso conocido. Posteriormente, las semillas fueron colocadas en la estufa a 80°C por 24 horas. Luego de transcurrir este periodo, se determinó su peso seco

El porcentaje de humedad de las semillas se calculó mediante la fórmula
[(Peso fresco- Peso seco)/Peso fresco] x 100

2.7.4 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

Se estableció un diseño experimental factorial completo de tres factores, uno de ellos con cuatro niveles y los restantes dos factores con dos niveles cada uno, tal y como se estableció en el cuadro 11. La combinación de factores y sus respectivos niveles dieron origen a 16 tratamientos distintos, según se expuso en el cuadro 12.

La solución de carga, cuando se aplicó, se hizo por espacio de 20 minutos en todos los casos. Cuando esta se aplicó antes del PVS2, se retiró del criotubo y se reemplazó por PVS2. En los casos en que se aplicó solución de carga, seguido de inmersión de nitrógeno líquido, esta fue retirada luego de la crioconservación y las semillas se lavaron tres veces con medio de lavado, cada uno de tres minutos de duración.

Los tratamientos que incluyeron crioconservación, tuvieron una duración de inmersión en nitrógeno líquido de cinco horas, haciendo uso de criotubos de 2 ml de capacidad.

El descongelamiento de los tratamientos que incluyeron nitrógeno líquido, se realizó por medio de Baño María a 40°C , por 60 segundos. La solución PVS2 fue removida por medio de tres lavados con solución de lavado, de cinco minutos de duración cada lavado. De igual forma, en los tratamientos 1 y 5 (cuadro 12), la solución de carga también fue retirada mediante tres lavados con solución de lavado, luego de la inmersión en nitrógeno líquido y su posterior descongelamiento.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S (1962) + 3% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

2.7.5 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Después de mantener por 24 horas en las cámaras o sistemas de deshidratación con tapa rosca, descritos en la figura 3, las semillas de *Lycaste tricolor* fueron sometidas a un diseño factorial completo 4x2, de acuerdo con el cuadro 13. Se establecieron entonces los tratamientos descritos en el cuadro 14.

La inmersión en nitrógeno líquido se realizó por espacio de cinco horas, para luego realizar el descongelamiento por medio de Baño María a 40°C, por 60 segundos.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S + 3% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

2.7.6 Germinación

Después de 30 días en medio de germinación, se evaluó el porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos aplicados. Para ello, se tomó una muestra de semillas de cada tratamiento y se prepararon láminas de microscopio, utilizando glicerol como medio de suspensión. Se realizaron tres repeticiones de la lectura en cada tratamiento, cada una compuesta de 100 semillas, en un aumento 4X.

2.8 Crioconservación de *Sobralia* sp. (Código 05-13)

2.8.1 Obtención y desinfección de semilla

Se tomaron tres cápsulas abiertas de *Sobralia* sp., pertenecientes al mismo “enjambre híbrido” de *Sobralia* sp. (códigos 03-13 y 04-13), ubicado en el Jardín Botánico Lankester. La semilla de las tres cápsulas fue recuperada y mezclada entre sí.

Para realizar la desinfección superficial, la semilla fue colocada en una solución de NaOCl al 0,5% por 8 minutos. Se utilizó un vial estéril donde se aplicó la solución de NaOCl (30 ml aproximadamente) más una gota de Tween 20 como surfactante. Después de la inmersión en NaOCl, la semilla fue recuperada por filtración por gravedad, para posteriormente realizar el lavado con agua destilada estéril (30 ml aproximadamente) sobre el papel filtro.

2.8.2 Viabilidad de semilla

A partir de las semillas de *Sobralia* sp., obtenidas de cápsula abierta y desinfectadas con NaOCl, se tomaron dos muestras separadas que fueron colocadas en una solución de TTC al 0,6% para determinar su viabilidad. Ambas pruebas se colocaron por 24 horas, en oscuridad, a 25±2 °C.

Luego del periodo de incubación, se determinó el porcentaje de viabilidad utilizando el microscopio en un aumento de 4X. Se realizaron dos réplicas, cada una con tres repeticiones de lectura, cada una compuesta por 100 semillas.

2.8.3 Determinación del porcentaje de humedad

Se tomaron tres muestras de semilla recién extraída de las cápsulas abiertas y se determinó su peso fresco, utilizando canastas de aluminio desecadas y de peso conocido. Posteriormente, las semillas fueron colocadas en la estufa a 80°C por 24 horas. Luego de transcurrir este periodo, se determinó su peso seco. El porcentaje de humedad de las semillas se calculó mediante la fórmula $[(\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / \text{Peso fresco}] \times 100$.

De igual manera, utilizando el procedimiento descrito anteriormente, se tomaron muestras de semilla recién desinfectada con NaOCl y se colocaron en los sistemas de deshidratación (figura 3) con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl, y sus tratamientos testigos (absoluto y H_2O) para determinar el porcentaje de humedad que adquieren estas estructuras, luego de permanecer 24 horas en estos sistemas. Este experimento se hizo por triplicado para cada uno de los sistemas

2.8.4 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

Se estableció un diseño experimental factorial completo de tres factores, uno de ellos con cuatro niveles y los restantes dos factores con dos niveles cada uno (factorial $4 \times 2 \times 2$), tal y como se estableció en el cuadro 11. La combinación de factores y sus respectivos niveles dieron origen a 16 tratamientos distintos, según se expuso en el cuadro 12. En este caso el diseño se hizo por triplicado

La solución de carga, cuando se aplicó, se hizo por espacio de 20 minutos en todos los casos. Cuando esta se aplicó antes del PVS2, se retiró del criotubo y se reemplazó por PVS2. En los casos en que se aplicó solución de carga, seguido de inmersión de nitrógeno líquido, esta fue retirada luego de la crioconservación y las semillas se lavaron tres veces con medio de lavado, cada uno de tres minutos de duración.

Los tratamientos que incluyeron crioconservación, tuvieron una duración de inmersión en nitrógeno líquido de tres horas, haciendo uso de criotubos de 2 ml de capacidad.

El descongelamiento de los tratamientos que incluyeron nitrógeno líquido, se realizó por medio de Baño María a 40°C, por 90 segundos. La solución PVS2 fue removida por medio de tres lavados con solución de lavado, de tres minutos de duración cada lavado. De igual forma, en los tratamientos 1 y 5 (cuadro 12), la solución de carga también fue retirada mediante tres lavados con solución de lavado, luego de la inmersión en nitrógeno líquido y su posterior descongelamiento.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S (1962) + 3% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

2.8.5 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Después de mantener por 24 horas en las cámaras o sistemas de deshidratación con tapa rosca, descritos en la figura 3, las semillas de *Sobralia* sp (código 05-13) fueron sometidas a un diseño factorial completo 4x2, de acuerdo con el cuadro 13. Se establecieron entonces los tratamientos descritos en el cuadro 14.

La inmersión en nitrógeno líquido se realizó por espacio de cinco horas, para luego realizar el descongelamiento por medio de Baño María a 40°C, por 60 segundos.

Las semillas de cada tratamiento fueron cultivadas en dos frascos con medio M&S (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S + 3% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

2.8.6 Germinación

Después de 15 días en medio de germinación, se evaluó el porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos aplicados. Para ello, se tomó una muestra de semillas de cada tratamiento y se prepararon láminas de microscopio, utilizando glicerol como medio de suspensión. Se realizaron tres repeticiones de la lectura en cada tratamiento, cada una compuesta de 100 semillas, en un aumento 4X.

2.9 Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de *Maxillaria* sp.

2.9.1 Obtención y desinfección de semilla

Se colectaron cuatro cápsulas cerradas de *Maxillaria* sp. provenientes del Jardín Botánico Lankester. Estas fueron lavadas con agua y jabón, luego de eliminar los restos florales. Posteriormente, debido a su pequeño tamaño, se sumergieron en una solución de NaOCl al 3% por 15 minutos, en constante agitación. Finalmente, el NaOCl fue eliminado por medio de tres lavados con agua estéril, cada uno con una duración de tres minutos. Las semillas fueron extraídas y cultivadas en medio de cultivo con el fin de obtener protocormos.

2.9.2 Germinación

Las semillas extraídas se colocaron en medio de cultivo de acuerdo con la siguiente distribución:

9 frascos en medio Murashige & Skoog (1962) al 100% de sales minerales
1 frasco en medio Murashige & Skoog (1962) al 50% de sales minerales

1 frasco en medio Knudson (1946) al 100% de sales minerales
1 frasco en medio Knudson (1946) al 50% de sales minerales

Todos los anteriores medios fueron suplementados con Vitaminas M&S (1962) + 2% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

2.9.3 Crioconservación de protocormos con precultivo en altas concentraciones de sacarosa y aplicación de PVS2

Se tomaron protocormos de *Maxillaria* sp de un tamaño aproximado de 1-2 mm de diámetro, con 70 días de cultivo en medio M&S al 100% y se subcultivaron por siete días en medios M&S (1962) al 100%, con diferentes concentraciones de sacarosa. Cada uno de los siguientes tratamientos tuvo dos repeticiones.

Tratamiento 1: 0,088 M sacarosa
Tratamiento 2: 0,150 M sacarosa
Tratamiento 3: 0,250 M sacarosa
Tratamiento 4: 0,500 M sacarosa
Tratamiento 5: 0,750 M sacarosa

Luego del precultivo con concentraciones altas de sacarosa, los protocormos se colocaron en criotubos con PVS2 por 60 minutos y pasaron a Nitrógeno Líquido por 24 horas. Luego de transcurrido ese tiempo, los protocormos fueron descongelados utilizando Baño María a 40°C, por 90 segundos; se realizaron tres lavados con medio o solución de lavado (de dos minutos de duración cada uno) y finalmente cultivados en medio de recuperación M&S (1962) completo. Los protocormos fueron colocados en el cuarto de crecimiento en condiciones de luz directa, a una temperatura constante de 25 ± 2 °C.

2.9.4 Crioconservación de protocormos con pretratamiento en solución de precultivo y aplicación de PVS2

Se tomaron protocormos de *Maxillaria* sp. con 71 días de cultivo en medio M&S (1962) al 100% y se sometieron a diferentes tratamientos que incluyeron el cultivo en solución de precultivo (medio de cultivo líquido M&S -1962- completo, suplementado con 0,3M de sacarosa y un pH ajustado a 5,7), por cuatro horas, en agitación (100 rpm), seguido de la aplicación de PVS2 por diferentes tiempos de exposición y la aplicación de nitrógeno líquido por 24 horas, según se muestra en el siguiente cuadro

Cuadro 15. Tratamientos de crioconservación de protocormos de *Maxillaria* sp., por medio de la aplicación de solución de precultivo y aplicación de PVS2.

Tratamiento	Solución de precultivo (100 rpm x 4 horas)	Exposición en PVS2 (minutos)	Nitrógeno Líquido
1	Sí	0	Sí
2	Sí	20	Sí
3	Sí	40	Sí

4	Sí	60	Sí
---	----	----	----

Luego de la inmersión en nitrógeno líquido, los protocormos fueron descongelados utilizando Baño María a 40°C, por 90 segundos. Posteriormente, se retiró el PVS2 y se realizaron tres lavados con medio o solución de lavado (de dos minutos de duración cada uno) y finalmente cultivados en medio de recuperación M&S (1962) con 0,25M de sacarosa. Los protocormos fueron colocados en el cuarto de crecimiento en condiciones de luz directa, a una temperatura constante de 25 ± 2 °C.

2.10 Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de *Prostechea ochracea*.

2.10.1 Obtención y desinfección de semilla

Se colectaron seis cápsulas cerradas de *Prostechea ochracea* obtenidas en el Jardín Botánico Lankester. Estas fueron lavadas con agua y jabón, y posteriormente desinfectadas por medio de una solución de NaOCl al 3% por 15 minutos, en constante agitación. Finalmente, el NaOCl fue eliminado por medio de tres lavados con agua estéril, cada uno con una duración de tres minutos.

2.10.2 Germinación

Las semillas extraídas se colocaron en medio de cultivo de acuerdo con la siguiente distribución:

- 3 frascos en medio Murashige & Skoog (1962) al 100% de sales minerales
- 1 frasco en medio Murashige & Skoog (1962) al 50% de sales minerales
- 1 frasco en medio Knudson (1946) al 100% de sales minerales
- 1 frasco en medio Knudson (1946) al 50% de sales minerales

Todos los anteriores medios fueron suplementados con Vitaminas M&S (1962) + 2% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

2.10.3 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

Se tomaron protocormos de *Prostechea ochracea* con 61 días de cultivo en medio M&S al 100% y se sometieron a diferentes tratamientos que incluyeron el pretratamiento con solución de carga (por 20 minutos) y aplicación de PVS2 por diferentes periodos de tiempo (Cuadro 16).

Cuadro 16. Tratamientos de crioconservación de protocormos de *Prostechea ochracea*, aplicando la técnicas de vitrificación con PVS2.

Tratamiento	Solución de carga	Exposición en	Nitrógeno Líquido
-------------	-------------------	---------------	-------------------

	(20 minutos)	PVS2 (minutos)	
1	Sí	0	Sí
2	Sí	20	Sí
3	Sí	40	Sí
4	Sí	60	Sí

Luego de la aplicación de solución de carga, esta fue retirada de los criotubos y reemplazada por PVS2. Después de la inmersión en nitrógeno líquido, los protocormos fueron descongelados utilizando Baño María a 40°C, por 90 segundos. Posteriormente, se retiró el PVS2 y se realizaron tres lavados con medio o solución de lavado (de dos minutos de duración cada uno) y finalmente cultivados en medio de recuperación M&S (1962) al 100% con 3% de sacarosa. Los protocormos fueron colocados en el cuarto de crecimiento en condiciones de luz directa, a una temperatura constante de 25 ± 2 °C.

2.11 Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de *Oncidium* sp.

2.11.1 Obtención y desinfección de semilla

Se tomaron dos cápsulas cerradas de *Oncidium* sp, las cuales fueron desinfectadas superficialmente, luego estar almacenadas por siete días en refrigeración. Para ello se lavaron con agua y jabón, con ayuda de un cepillo de dientes, para posteriormente ser sumergidas en etanol 95% por cinco minutos y se flameadas dos veces.

2.11.2 Germinación

Las semillas extraídas se colocaron en medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) al 100% de sales minerales, suplementado con Vitaminas M&S (1962) + 3% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel. pH 5,5.

2.11.3 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

Los protocormos de *Oncidium* sp., con 162 días de cultivo y con un subcultivo realizado, se sometieron a diferentes tratamientos que incluyeron el pretratamiento por 24 horas en medio de cultivo con alta concentración de sacarosa (M&S -1962-completo con 0,3 M sacarosa), aplicación de solución de carga y PVS2 por diferentes periodos de tiempo (Cuadro 17).

Cuadro 17. Tratamientos de crioconservación de protocormos de *Oncidium* sp., aplicando la técnicas de vitrificación con PVS2.

Tratamiento	Medio de precultivo (0,3M sacarosa x 24 horas)	Solución de carga (20 minutos)	Exposición en PVS2 (minutos)	Nitrógeno Líquido	Número de protocormos
1	Sí	Sí	40	Sí	17
2	Sí	Sí	20	No	22
3	Sí	Sí	40	Sí	13
4	Sí	Sí	60	No	8

Luego de la aplicación de solución de carga, esta fue retirada de los criotubos y reemplazada por PVS2. Después de la inmersión en nitrógeno líquido, en los tratamientos en que aplicaba, los protocormos fueron descongelados utilizando Baño María a 40°C, por 90 segundos. Luego de eliminar el PVS2, se realizaron tres lavados con medio o solución de lavado (de cinco minutos de duración cada uno) y finalmente cultivados en medio de recuperación M&S (1962) al 100% con 0,3M de sacarosa por 24 horas. Posteriormente se transfirieron a un medio similar con 3% de sacarosa. Los protocormos fueron colocados en el cuarto de crecimiento en condiciones de luz directa, a una temperatura constante de 25 ± 2 °C.

2.11.4 Deshidratación de protocormos por medio de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl

A partir de protocormos formados después del primer subcultivo, se determinó la capacidad de deshidratación de las soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl en estas estructuras. Para ello se colocaron los protocormos en los sistemas de deshidratación (sistema de tapa rosca, figura 3) por espacio de 3 y 7 días, para luego cultivarlos en medio de cultivo y evaluar su regeneración. A continuación se detallan los tratamientos establecidos:

Cuadro 18. Tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , aplicadas a protocormos de *Oncidium* sp.

Tratamiento	Solución deshidratante	Tiempo de deshidratación (días)	Número protocormos	Medio de cultivo
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3	3	A
2	LiCl	3	5	A
3	Testigo absoluto	3	4	A
4	Testigo H_2O	3	5	A
5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3	5	B
6	LiCl	3	5	B
7	Testigo absoluto	3	5	B
8	Testigo H_2O	3	6	B
9	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7	4	A

10	LiCl	7	4	A
11	Testigo absoluto	7	5	A
12	Testigo H ₂ O	7	5	A
13	CaCl ₂ *2H ₂ O	7	5	B
14	LiCl	7	4	B
15	Testigo absoluto	7	5	B
16	Testigo H ₂ O	7	4	B

Donde

A= M&S (1962) al 100% de sales, suplementado con Vitaminas M&S, 3% sacarosa, 3,3 g/l Phytigel. pH ajustado a 5,5

B = M&S (1962) al 30% de sales, suplementado con Vitaminas M&S al 30%, 1% sacarosa, 1 mg/l Ácido Naftalenacético (ANA), 1,5 mg/l de Benciladenina (BA), 10% v/v de Agua de coco, 50 g/l de Banano, 1 g/l de Caseína hidrolizada, 1g/l de Carbón activado, 4,5 g/l Gellan Gum. pH ajustado a 5,5.

2.12 Cultivo de protocormos de *Brassia verrucosa*

2.12.1 Capacidad de eliminación de humedad de soluciones saturadas de CaCl₂ * 2H₂O y LiCl

Para determinar el porcentaje de eliminación de humedad de protocormos se utilizaron protocormos de *Brassia verrucosa* que fueron expuestos a atmósferas controladas de soluciones saturadas de CaCl₂ * 2H₂O y LiCl (y sus testigos) por 24, 48 y 72 horas, en los sistemas de deshidratación de tapa rosca (figura 3). Por cada sistema establecido se colocaron 5 protocormos por 2 y 3 días. El medio de origen consistió en un M&S (1962) al 30% de sales + 1 mg/l ANA + 1,5 mg/l BA + 10% Agua de coco + 50 g/l Banano + 1g/l Caseína Hidrolizada + 1% sacarosa + 1 g/l Carbón activado + 4,5 g/l Gellan Gum. pH 5,5.

Se determinó el peso de los protocormos antes y después de pasar por los sistemas de deshidratación, y así se determinó el porcentaje de eliminación de humedad, por medio de la fórmula $[(\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{Peso inicial}] \times 100$.

Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de dos factores, siendo uno de ellos la solución de deshidratación y el otro el tiempo. Lo anterior con un nivel de confianza del 95%.

2.13 Crioconservación de ápices de *Trichocentrum cebolleta*

2.13.1 Cultivo de ápices

Se tomaron plantas *in vitro* de *Trichocentrum cebolleta* previamente establecidas y en fase de multiplicación, cultivadas en un medio de cultivo M&S (1962) al 30% de sales + 1

mg/l ANA + 1,5 mg/l BA + 10% Agua de coco + 50 g/l Banano + 1g/l Caseína Hidrolizada + 1% sacarosa + 1 g/l Carbón activado + 4,5 g/l Gellan Gum. pH 5,5.

Los ápices fueron extraídos con ayuda de un estereoscopio y cultivados en medio semisólido M&S (1962) al 100% de sales + 0,5 mg/l ANA + 0,5 mg/l BA + 1,5% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel, y pH 5,5, utilizado como medio de recuperación.

2.13.2 Crioconservación de ápices

Una vez que se estableció la técnica de extracción de ápices y se determinó un medio de recuperación adecuado, se estableció un diseño factorial completo 5x2x2, siendo los factores solución de carga (en los niveles Sí y No), la solución PVS2 (en sus niveles de 0, 5, 10, 15 y 20 minutos) y el Nitrógeno Líquido (en sus niveles Sí y No), tal y como se muestra en el cuadro 19. Previo a la aplicación de solución de carga los ápices fueron precultivados por 16 horas en un medio semisólido M&S (1962) al 100% de sales con 0,3M de sacarosa. Para cada tratamiento se utilizaron 10 ápices.

Cuadro 19. Tratamientos de crioconservación de ápices de *Trichocentrum cebolleta*, aplicando la técnicas de vitrificación con PVS2.

Tratamiento	Solución de carga (20 minutos)	Exposición en PVS2 (minutos)	Nitrógeno Líquido
1	Sí	0	Sí
2	Sí	5	Sí
3	Sí	10	Sí
4	Sí	15	Sí
5	Sí	20	Sí
6	No	0	Sí
7	No	5	Sí
8	No	10	Sí
9	No	15	Sí
10	No	20	Sí
11	Sí	0	No
12	Sí	5	No
13	Sí	10	No
14	Sí	15	No
15	Sí	20	No
16	No	0	No
17	No	5	No
18	No	10	No
19	No	15	No
20	No	20	No

Luego de la aplicación de solución de carga, esta fue retirada de los criotubos y reemplazada por PVS2. Después de la inmersión en nitrógeno líquido, en los tratamientos en que aplicaba, los protocormos fueron descongelados utilizando Baño María a 40°C, por 90 segundos. Luego de eliminar el PVS2, se realizaron tres lavados con medio o solución de lavado (de cinco minutos de duración cada uno) y finalmente cultivados en medio de recuperación (M&S (1962) al 100% de sales + 0,5 mg/l ANA +

0,5 mg/l BA + 1,5% sacarosa + 3,3 g/l Phytigel, y pH 5,5). Los protocormos fueron colocados en el cuarto de crecimiento en condiciones de luz directa, a una temperatura constante de 25 ± 2 °C.

3. Resultados

3.1 Crioconservación de *Warscewiczella discolor*

3.1.1 Viabilidad de semilla

Cuadro 20. Porcentaje de viabilidad de semillas de *Warscewiczella discolor*, a partir de cápsula abierta, utilizando la tinción TTC al 1% según método Lauzer *et al.* (1994).

Tratamiento	Porcentaje de Viabilidad		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
A	40,98	39,34	47,62
B	31,14	52,45	38,18
C	36,06	47,54	45,90
Promedio	36,06	46,44	43,90

Utilizando un análisis estadístico ANOVA de una vía se determinó que los tres tratamientos aplicados para determinar el porcentaje de viabilidad de la semilla de *W. discolor*, en los que se varió la temperatura y la adición en uno de ellos de Tween 20, no presentaron diferencia significativa entre sí, pudiéndose esto afirmar con el 95% de confianza.

A continuación algunas imágenes de las semillas luego de la prueba de viabilidad

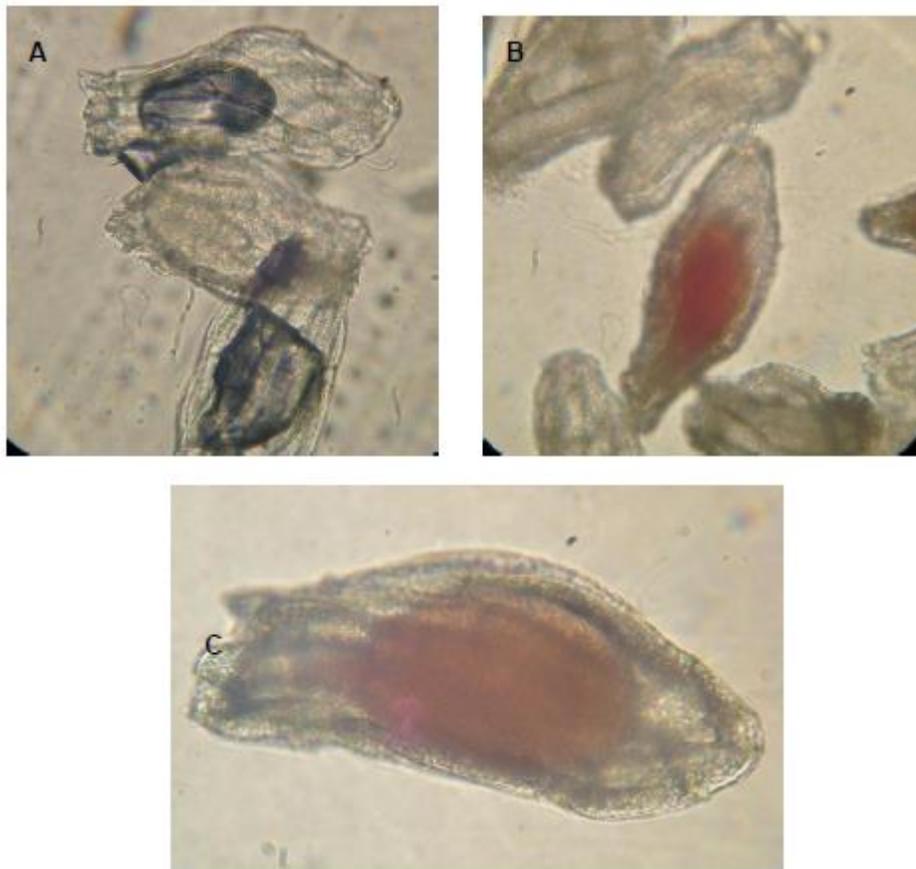


Figura 4. Semillas de *Warscewiczella discolor* de cápsula abierta. A) Semillas recién extraídas de la cápsula. B) y C) Semillas luego de aplicar TTC al 1% por 96 horas.

De acuerdo con la figura 4, en las semillas recién colectadas (A) se aprecian los embriones, incluso a través de la testa de pocas células de grosor. En (B) se aprecia una semilla teñida de color rojo que indica su viabilidad; en esta misma figura se aprecian semillas sin teñir lo cual indica que no son viables o carecen de embrión (semillas vacías). En (C) se muestra una sola semilla cuyo embrión se tiñó de rojo, indicando su viabilidad.

La muestra de semilla de cápsula cerrada, que fue colocada en la solución de TTC al 1% más Tween 20, a 25 ± 2 °C, presentó un porcentaje de viabilidad promedio de 30,67%, a partir del conteo de dos muestras de 300 semillas

3.1.2 Crioconservación de semillas utilizando la técnica de vitrificación con PVS2, la técnica de deshidratación con aire estéril y la técnica de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl

Después de cuatro meses de cultivo, no se dio la germinación en ninguno de los tratamientos evaluados, ni siquiera en los tratamientos testigos.

3.2 Crioconservación de *Guarianthe skinneri* (Código 01-13)

3.2.1 Viabilidad de semilla

La muestra de semilla de *Guarianthe skinneri* (código 01-13), que fue colocada en la solución de TTC al 0,6%, presentó un porcentaje de viabilidad promedio de 68,37%, a partir del conteo de dos muestras de 370 semillas

A continuación algunas imágenes tomadas en el conteo

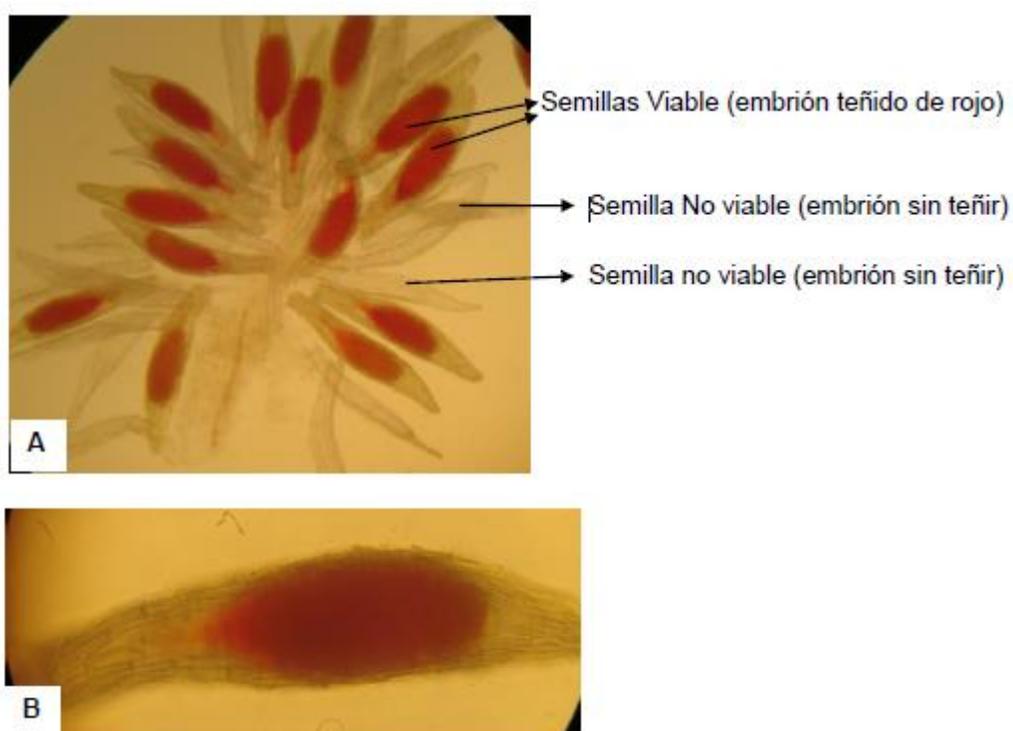


Figura 5. Prueba de viabilidad con TTC al 0,6%, aplicada a semillas de *G. skinneri* obtenidas de cápsula cerrada. A) Aumento 10X. B) Aumento 40X

3.2.2 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

El período de germinación de esta semilla se estableció en siete días y a los 14 días se realizó la evaluación del porcentaje de germinación de los siete tratamientos realizados, obteniéndose los siguientes resultados

Cuadro 21. Porcentaje de germinación de semillas de *Guarianthe skinneri* (código 01-13), luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación.

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación					
		Repetición 1		Repetición 2		Promedio	
		Dato original	Factor Corrección	Dato original	Factor Corrección	Dato original	Factor Corrección
1	Testigo sin NL	72,16	105,54	72,43	105,94	72,30	105,75
2	Testigo + NL	0,54	0,79	0,54	0,79	0,54	0,79
3	Solución carga + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	Solución carga + PVS2 20 min + NL	40,81	59,69	43,51	63,64	42,16	61,66
5	Solución carga + PVS2 40 min + NL	42,97	62,85	57,56	84,19	50,27	73,53
6	PVS2 20 min + NL	25,13	36,76	26,48	38,73	25,81	37,75
7	PVS2 40 min + NL	45,40	66,40	44,86	65,61	45,13	66,01

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 370 semillas.

Factor de corrección= 68,37% (porcentaje de viabilidad)

NL= Nitrógeno Líquido

El análisis estadístico demostró que existe una interacción doble entre el factor *solución de carga* y el factor *PVS2*, pudiéndose asegurar esto con un 95% de confianza. Ahora bien, tomando los factores principales por separado, se obtuvo un mayor porcentaje de germinación cuando se utilizó la solución de carga en comparación de cuando no se utilizó (figura 6). En cuanto al PVS2 como factor principal, el mayor porcentaje de germinación se obtuvo cuando se utilizó por 40 minutos. Tomando en cuenta la interacción doble, el mayor porcentaje de germinación, después de la crioconservación se obtuvo al utilizar la solución de carga (por 20 minutos) y el PVS2 por 40 minutos (figura 7).

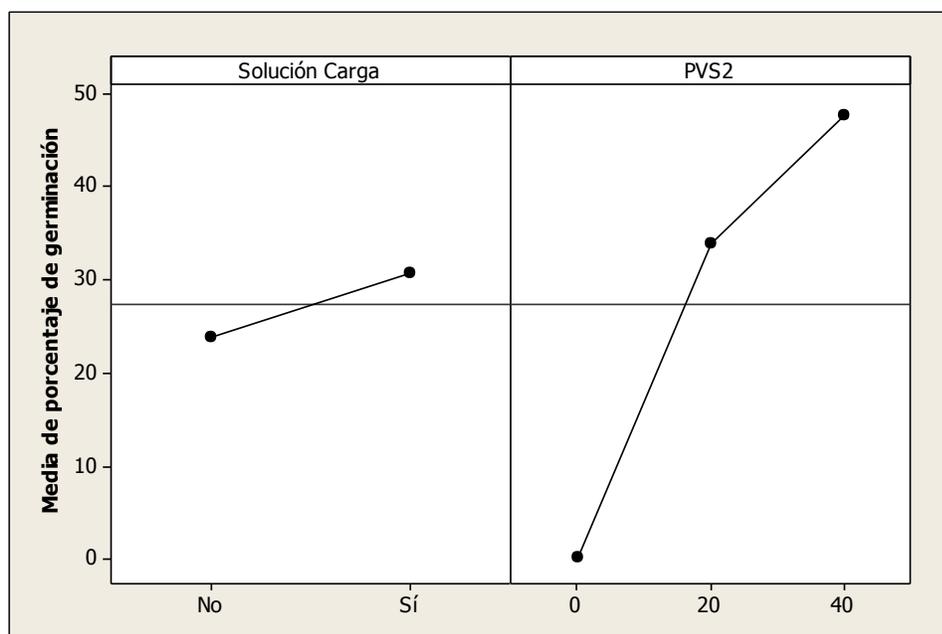


Figura 6. Gráfico de efectos principales *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Guarjanthe skinneri* (código 01-03), luego de ser crioconservadas

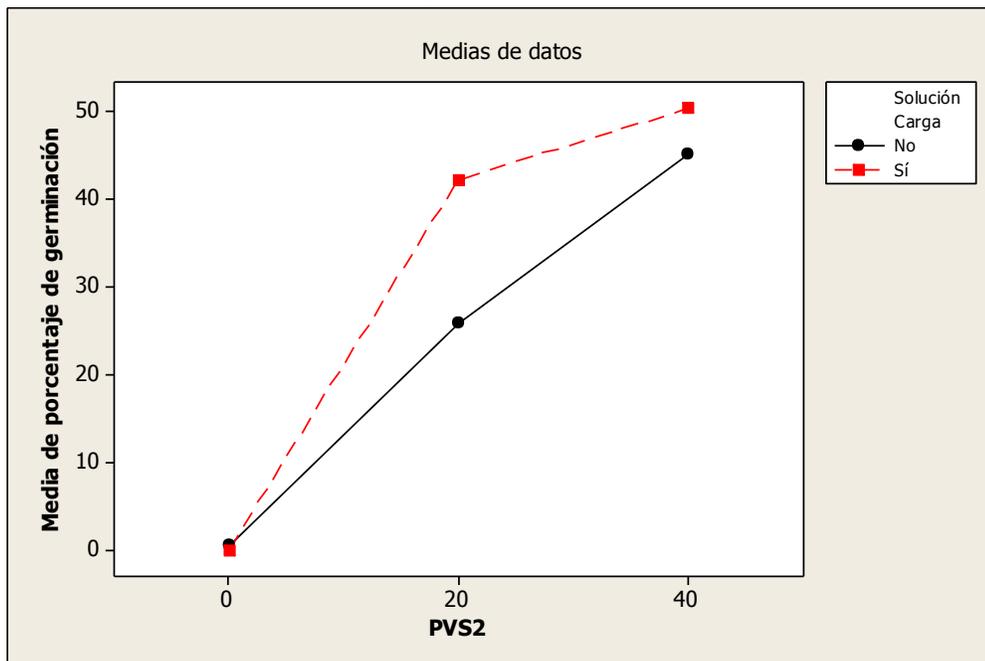
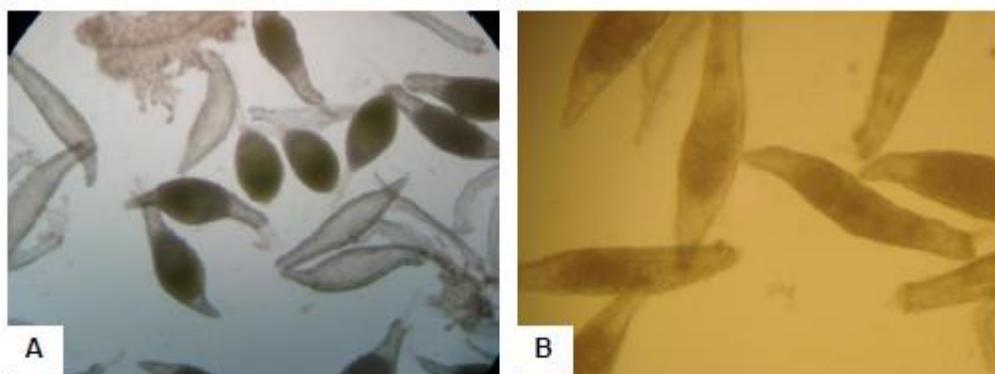


Figura 7. Gráfico de interacción doble de los factores *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Guarjanthe skinneri* (código 01-03), luego de ser crioconservadas

A continuación se muestran algunas fotografías de las semillas de *G. skinneri* después de ser crioconservadas



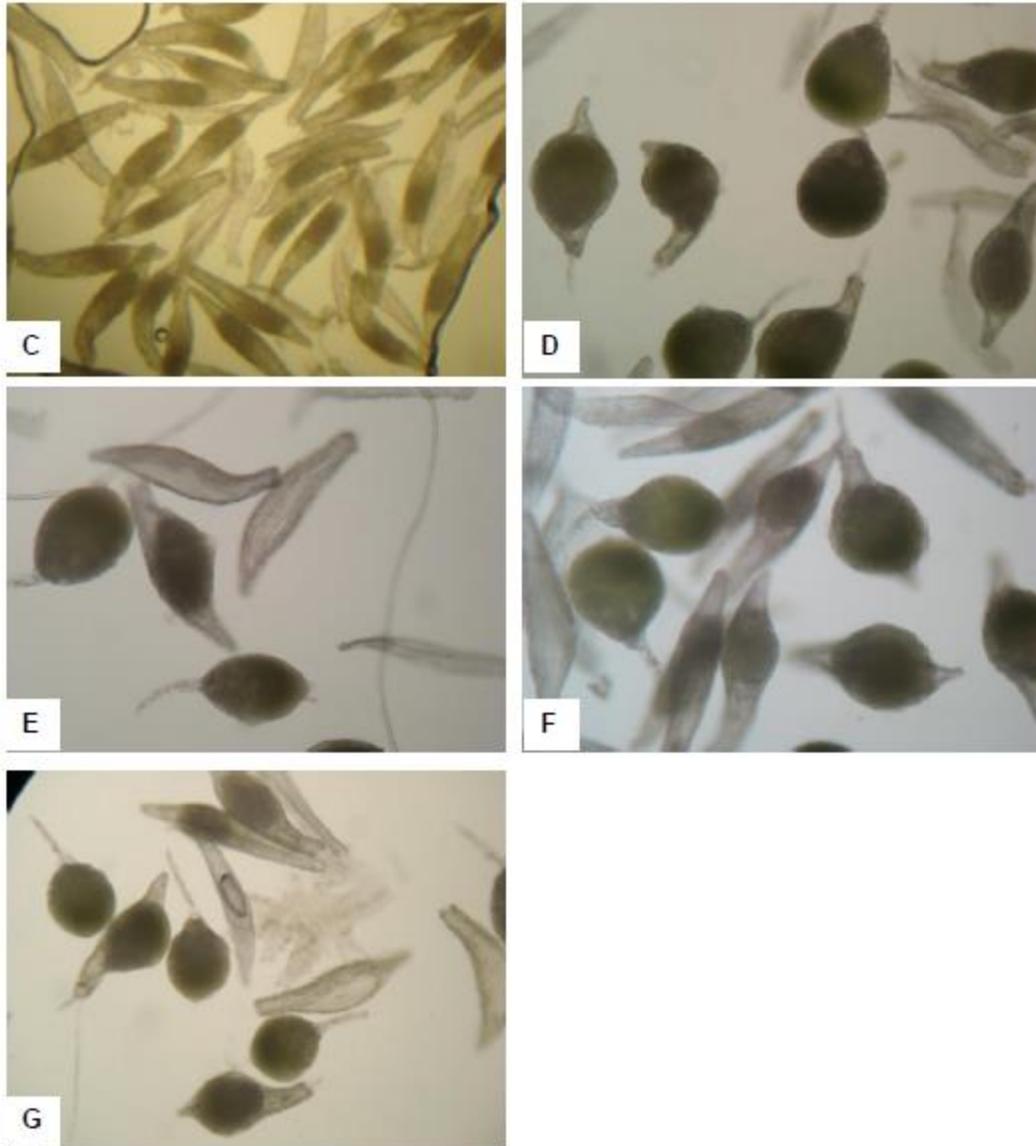


Figura 8. Germinación de semillas de *Guarianthe skinneri* de acuerdo con diferentes tratamientos de crioconservación. A) Tratamiento testigo sin NL. B) Tratamiento Testigo + NL. C) Tratamiento Solución de Carga sin PVS2 + NL D) Tratamiento Solución de Carga + PVS2 20 minutos + NL E) Tratamiento Solución de Carga + PVS2 40 minutos + NL F) Tratamiento PVS2 20 minutos + NL G) Tratamiento PVS2 40 minutos + NL.

3.2.3 Formación de protocormos

A los 27 días de cultivo, se tomaron las siguientes fotografías que muestran la formación de protocormos, donde los embriones se han ensanchado al punto de romper la testa y se empiezan a formar rizoides.

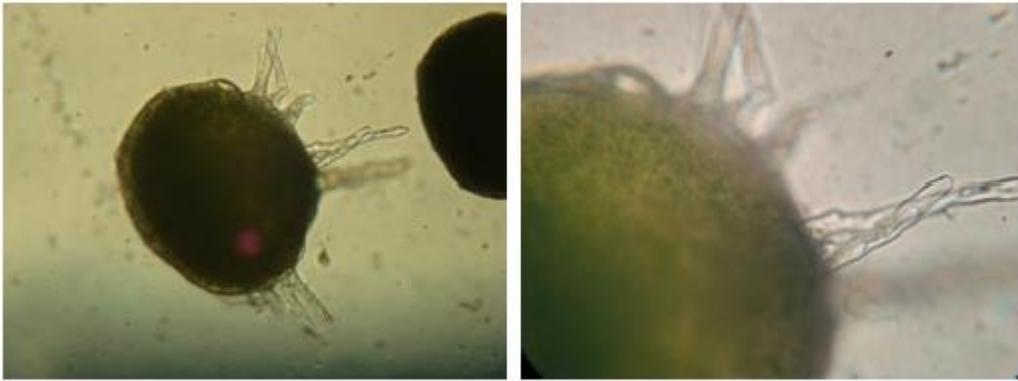


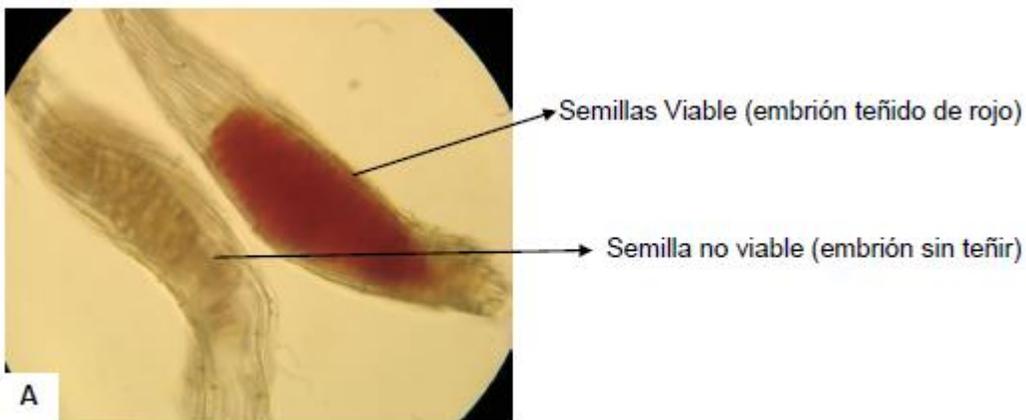
Figura 9. Protocormos de *Guarianthe skinneri* a los 27 días de cultivo en medio M&S (1962) completo (Tratamiento Testigo sin Nitrógeno Líquido)

3.3 Crioconservación de *Epidendrum* sp.

3.3.1 Viabilidad de semilla

La muestra de semilla de *Epidendrum* sp., que fue colocada en la solución de TTC al 0,6%, presentó un porcentaje de viabilidad promedio de 19,19%, a partir del conteo de dos muestras de 370 semillas

A continuación algunas imágenes tomadas en el conteo



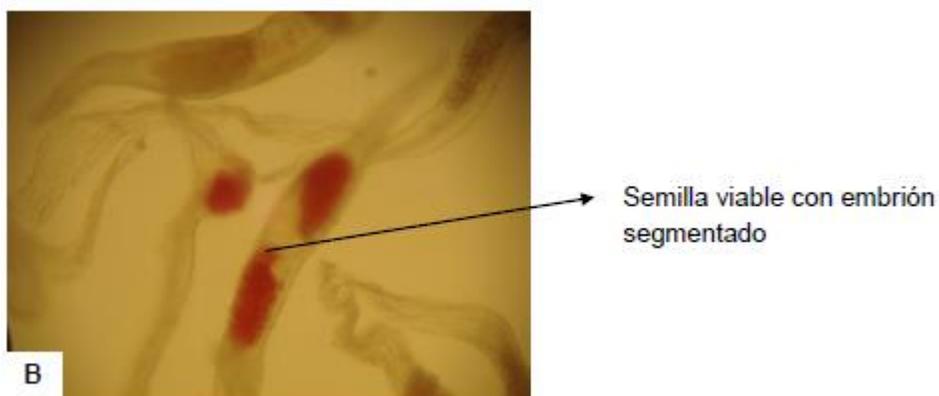


Figura 10. Prueba de viabilidad con TTC al 0,6% aplicada a semillas de *Epidendrum* sp., obtenidas de cápsula cerrada. A) Aumento 40X. B) Aumento 10X

3.3.2 Crioprotección con PVS2 y criopreservación

El período de germinación de la semilla de *Epidendrum* sp. se estableció en 14 días y a los 28 días se evaluó el porcentaje de germinación de los tratamientos aplicados, obteniéndose los siguientes resultados

Cuadro 22. Porcentaje de germinación de semillas de *Epidendrum* sp. luego de ser sometidas a varios tratamientos de criopreservación.

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación					
		Repetición 1		Repetición 2		Promedio	
		Dato original	Factor Corrección	Dato original	Factor Corrección	Dato original	Factor Corrección
1	Testigo sin NL	4,86	25,33	5,40	28,14	5,13	26,73
2	Testigo + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	Solución carga + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	Solución carga + PVS2 20 min + NL	3,51	18,29	3,51	18,29	3,51	18,29
5	Solución carga + PVS2 40 min + NL	0,27	1,41	1,08	5,63	0,67	3,49
6	PVS2 20 min + NL	1,89	9,85	2,70	14,07	2,29	11,93
7	PVS2 40 min + NL	0,27	1,41	0,27	1,41	0,27	1,41

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 370 semillas.

Factor de corrección= 19,19% (porcentaje de viabilidad)

NL= Nitrógeno Líquido

El análisis estadístico demostró que existe una interacción doble entre el factor *solución de carga* y el factor *PVS2*, pudiéndose asegurar esto con un 95% de confianza. Ahora bien, tomando los factores principales por separado, se obtuvo un mayor porcentaje de germinación cuando se utilizó la solución de carga en comparación de cuando no se

utilizó (figura 11). En cuanto al PVS2 como factor principal, el mayor porcentaje de germinación se obtuvo cuando se utilizó por 20 minutos. Tomando en cuenta la interacción doble, el mayor porcentaje de germinación, después de la crioconservación se obtuvo al utilizar la solución de carga (por 20 minutos) y el PVS2 por 20 minutos (figura 12).

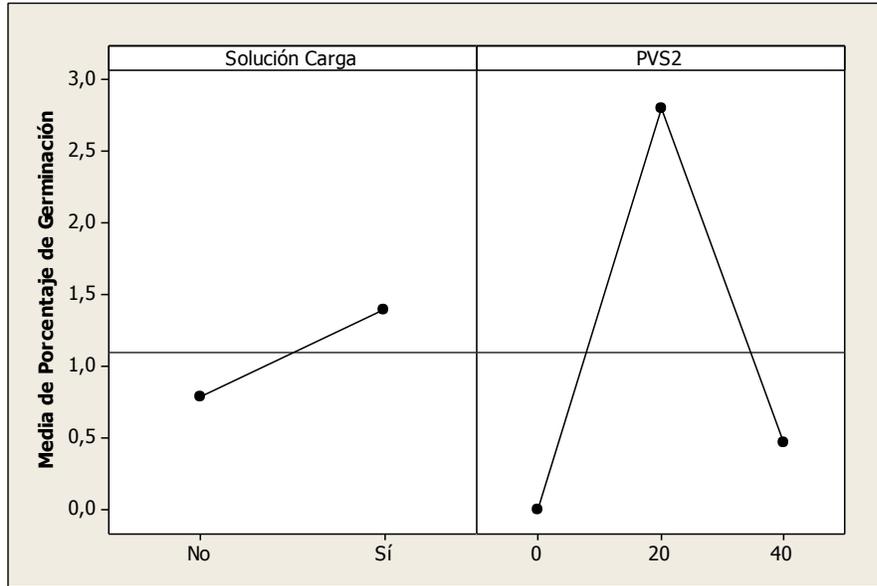


Figura 11. Gráfico de efectos principales *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Epidendrum sp.*, luego de ser crioconservadas

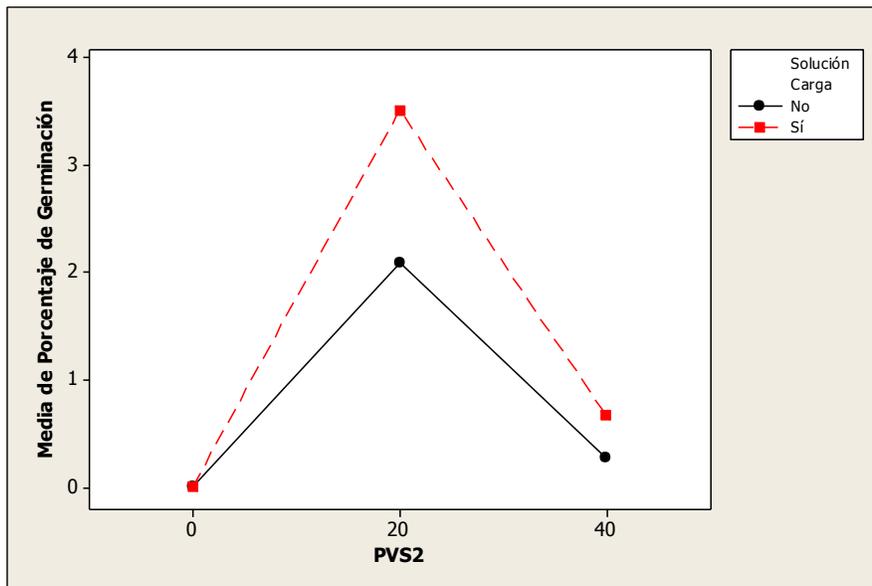


Figura 12. Gráfico de interacción doble de los factores *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Epidendrum sp.*, luego de ser crioconservadas

A continuación se muestran algunas fotografías de las semillas de *Epidendrum* sp después de ser criopreservadas

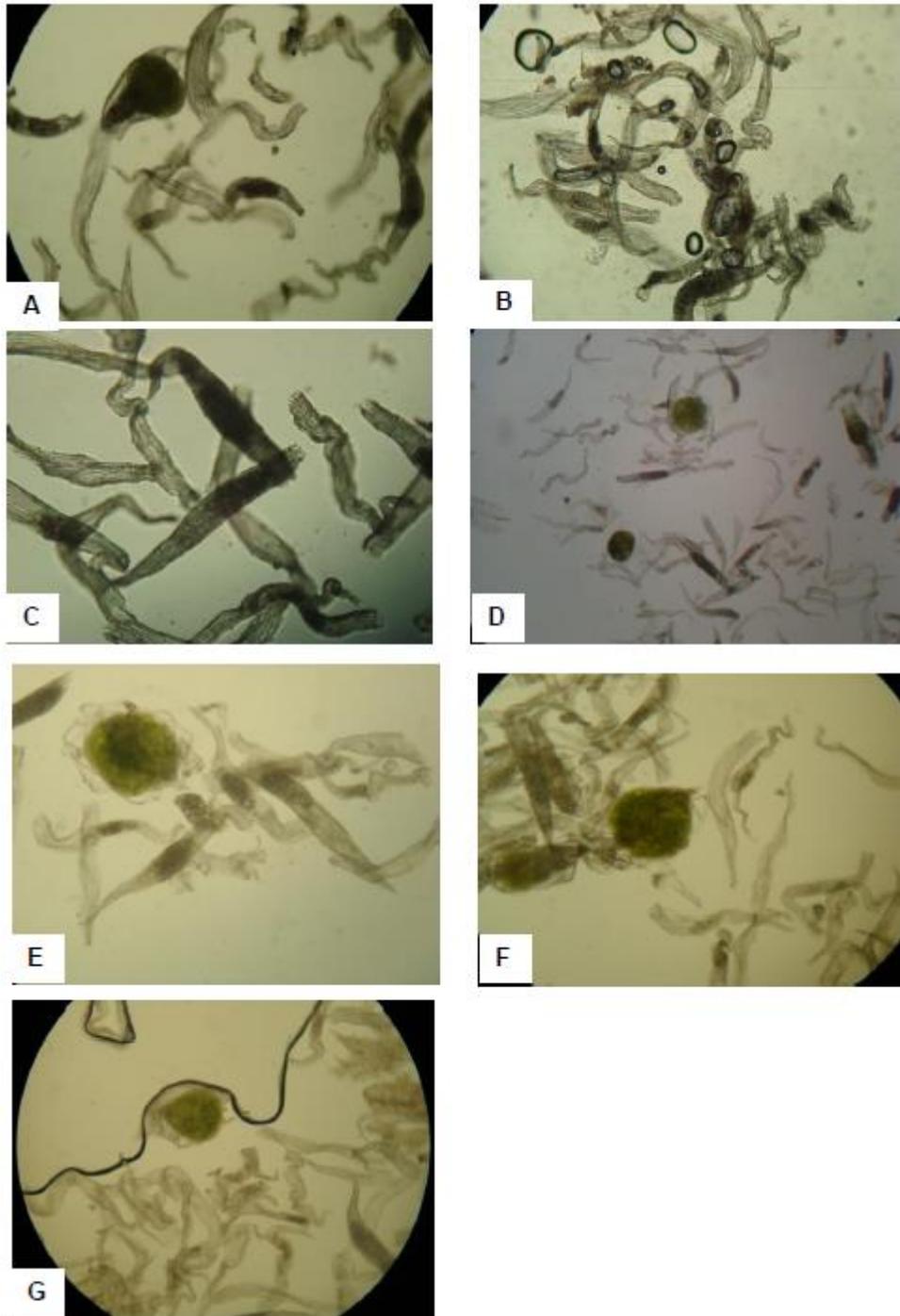


Figura 13. Germinación de semillas de *Epidendrum* sp. de acuerdo con diferentes tratamientos de criopreservación. A) Tratamiento testigo sin NL. B) Tratamiento Testigo + NL. C) Tratamiento Solución de Carga sin PVS2 + NL D) Tratamiento Solución de Carga + PVS2 20 minutos + NL E) Tratamiento Solución de Carga +

PVS2 40 minutos + NL F) Tratamiento PVS2 20 minutos + NL G) Tratamiento PVS2 40 minutos + NL.

3.3.3 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Con respecto al experimento realizado utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se obtuvieron los siguientes porcentajes de germinación

Cuadro 23. Porcentaje de germinación de semillas de *Epidendrum* sp. luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación, utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación					
		Repetición 1		Repetición 2		Promedio	
		Dato original	Factor Corrección	Dato original	Factor Corrección	Dato original	Factor Corrección
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{NL}$	2,70	14,07	4,05	21,10	3,37	17,56
2	$\text{LiCl} + \text{NL}$	2,70	14,07	2,70	14,07	2,70	14,07
3	Testigo Absoluto+ NL	2,97	15,48	2,43	12,66	2,70	14,07

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 370 semillas.

Factor de corrección= 19,19% (porcentaje de viabilidad)

NL= Nitrógeno Líquido

Utilizando un análisis estadístico ANOVA de una vía, para evaluar la sobrevivencia, por medio del porcentaje de germinación de las semillas expuestas a los tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas, se obtuvo que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

3.4 Crioconservación de *Guarianthe skinneri* (Código 02-13)

3.4.1 Viabilidad de semilla

La muestra de semilla de *Guarianthe skinneri* (código 02-13), mediante la prueba TTC al 0,6%, presentó un porcentaje de viabilidad promedio de 30,81%, a partir del conteo de dos muestras de 370 semillas

A continuación algunas imágenes tomadas en el conteo

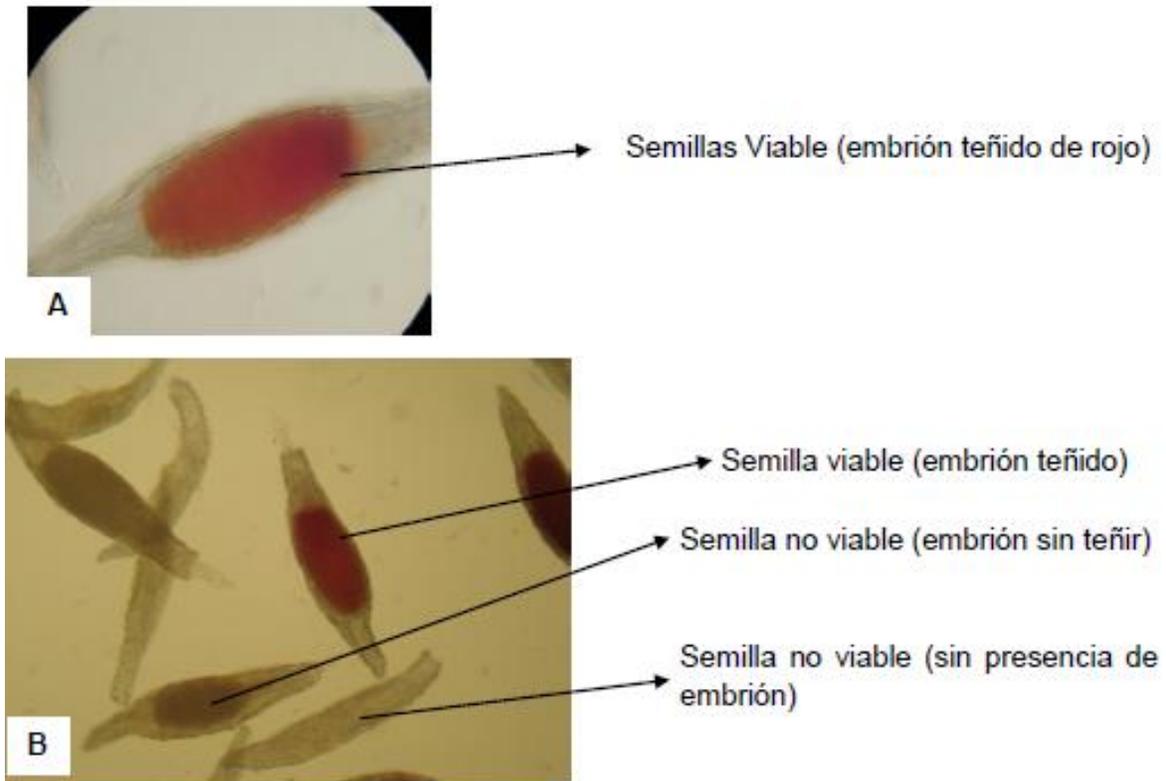


Figura 14. Prueba de viabilidad con TTC al 0,6% aplicada a semillas de *Guarianthe skinneri*, obtenidas de cápsula cerrada. A) Aumento 40X. B) Aumento 10X.

3.4.2 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

El período de germinación de esta semilla se estableció en siete días y a los 14 días se determinó el porcentaje de germinación de los tratamientos aplicados, presentados en el siguiente cuadro

Cuadro 24. Porcentaje de germinación de semillas de *Guarjanthe skinneri* (código 02-13), luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación.

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación					
		Repetición 1		Repetición 2		Promedio	
		Dato original	Factor Corrección	Dato original	Factor Corrección	Dato original	Factor Corrección
1	Testigo sin NL	33,24	107,89	33,24	107,89	33,24	107,89
2	Testigo + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	Solución carga + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	Solución carga + PVS2 20 min + NL	17,02	55,24	14,59	47,35	15,81	51,31
5	Solución carga + PVS2 40 min + NL	14,59	47,35	16,76	54,40	15,67	50,86
6	Solución carga + PVS2 60 min + NL	15,40	49,98	15,67	50,86	15,54	50,44
7	PVS2 20 min + NL	10,81	35,09	8,92	28,95	9,86	32,00
8	PVS2 40 min + NL	15,67	50,86	13,78	44,73	14,73	47,81
9	PVS2 60 min + NL	18,38	59,66	18,92	61,41	18,65	60,53

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 370 semillas.

Factor de corrección= 30,81% (porcentaje de viabilidad)

NL= Nitrógeno Líquido

El análisis estadístico demostró que existe una interacción doble entre el factor *solución de carga* y el factor *PVS2*, pudiéndose asegurar esto con un 95% de confianza. Ahora bien, tomando los factores principales por separado, el factor *solución de carga* resultó ser no significativo ($p > 0,05$), mientras que el factor *PVS2* sí lo fue.

Se obtuvo un mayor porcentaje de germinación cuando se utilizó la solución PVS2 como factor principal por espacio de 60 minutos. Tomando en cuenta la interacción doble, el mayor porcentaje de germinación, después de la crioconservación, se obtuvo cuando no se utilizó solución de carga, pero sí el PVS2 por 60 minutos (figura 16).

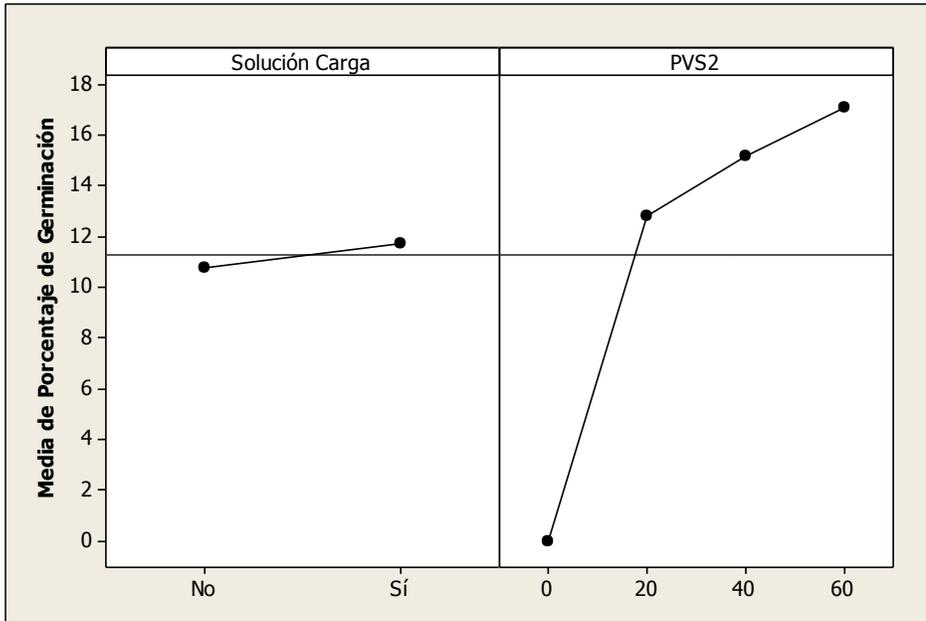


Figura 15. Gráfico de efectos principales *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Guarianthe skinneri* (código 02-13), luego de ser crioconservadas

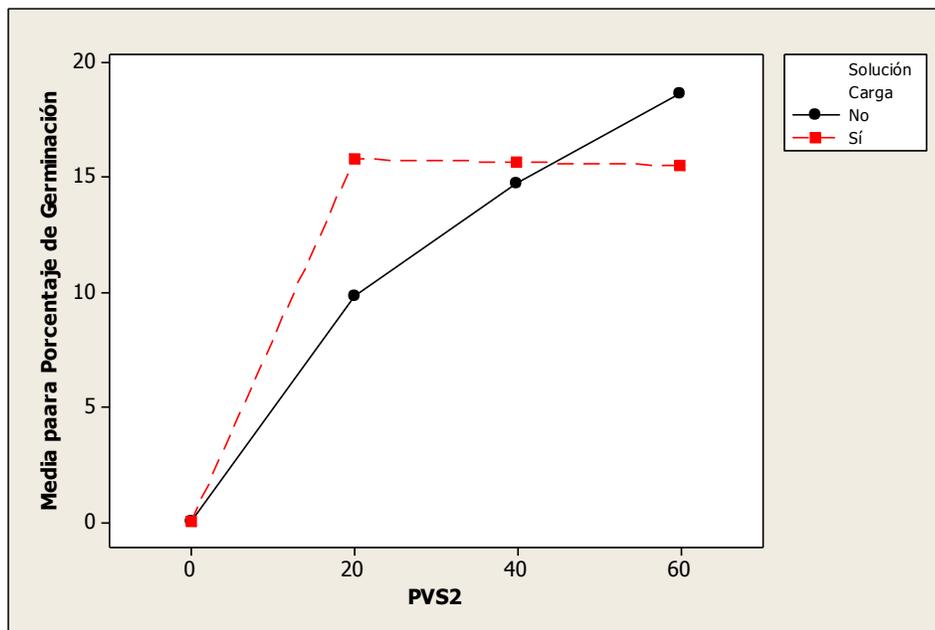


Figura 16. Gráfico de interacción doble de los factores *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Guarianthe skinneri* (código 02-13), luego de ser crioconservadas

A continuación se muestran imágenes de las semillas de *Guarianthe skinneri* después de ser sometidas a diferentes tratamientos de crioconservación

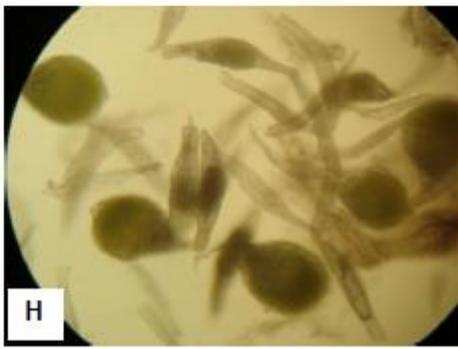
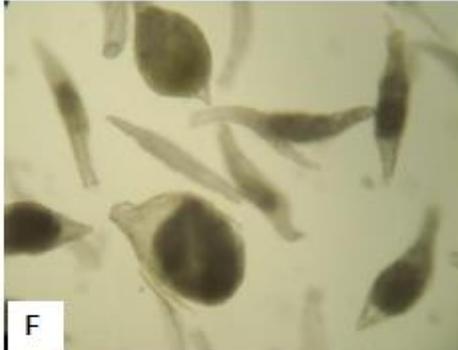
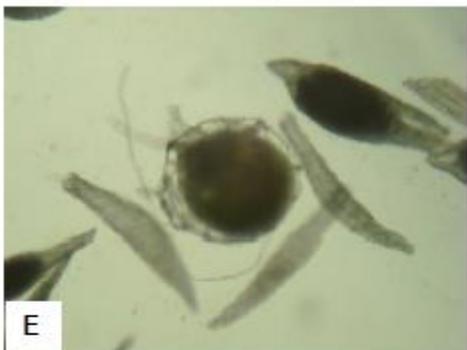
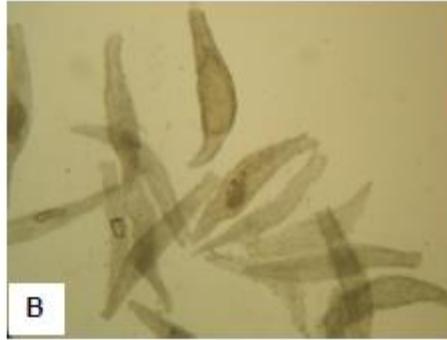




Figura 17. Germinación de semillas de *Guarianthe skinneri* de acuerdo con diferentes tratamientos de crioconservación. A) Tratamiento testigo sin NL. B) Tratamiento Testigo + NL. C) Tratamiento Solución de Carga sin PVS2 + NL. D) Tratamiento Solución de Carga + PVS2 20 minutos + NL. E) Tratamiento Solución de Carga + PVS2 40 minutos + NL. F) Tratamiento Solución de Carga + PVS2 60 minutos + NL. G) Tratamiento PVS2 20 minutos + NL. H) Tratamiento PVS2 40 minutos + NL. I) Tratamiento PVS2 60 minutos + NL

3.4.3 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Con respecto al experimento realizado utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se obtuvieron los siguientes porcentajes de germinación

Cuadro 25. Porcentaje de germinación de semillas de *Guarianthe skinneri* (código 02-13) luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación, utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación					
		Repetición 1		Repetición 2		Promedio	
		Dato original	Factor Corrección	Dato original	Factor Corrección	Dato original	Factor Corrección
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + NL	39,19	127,20	35,94	116,65	37,56	121,91
2	LiCl + NL	31,08	100,88	27,30	88,61	29,08	94,38
3	Testigo Absoluto+ NL	37,02	120,16	36,48	118,40	36,75	107,89

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 370 semillas.

Factor de corrección= 30,81% (porcentaje de viabilidad)

NL= Nitrógeno Líquido

Utilizando un análisis estadístico ANOVA de una vía, se determinó que sí existía diferencia significativa entre los tres tratamientos evaluados. Posterior a ello, por medio de la prueba estadística Tukey, con un 95% de confianza, se determinó que los tratamientos $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y el tratamiento testigo no difirieron estadísticamente entre sí, pero sí lo

hicieron del tratamiento con LiCl. Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron con los tratamientos deshidratantes con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y el tratamiento testigo.

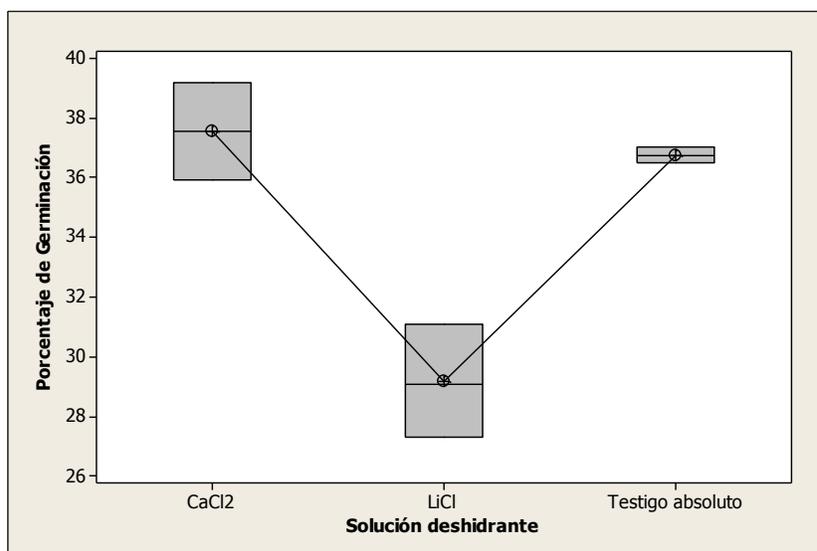


Figura 18. Gráfico de cajas para el porcentaje de germinación de los tratamientos de crioconservación de semillas de *Guarjanthe skinneri* (código 02-13) sometidos a tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl.

3.5 Crioconservación de *Sobralia* sp. (código 03-13)

3.5.1 Viabilidad de semilla

La muestra de semilla de *Sobralia* sp. (código 03-13), mediante la prueba TTC al 0,6%, presentó un porcentaje de viabilidad promedio de 93,11%, a partir del conteo de tres muestras de 100 semillas, cada una con tres repeticiones.

A continuación algunas imágenes tomadas en el conteo

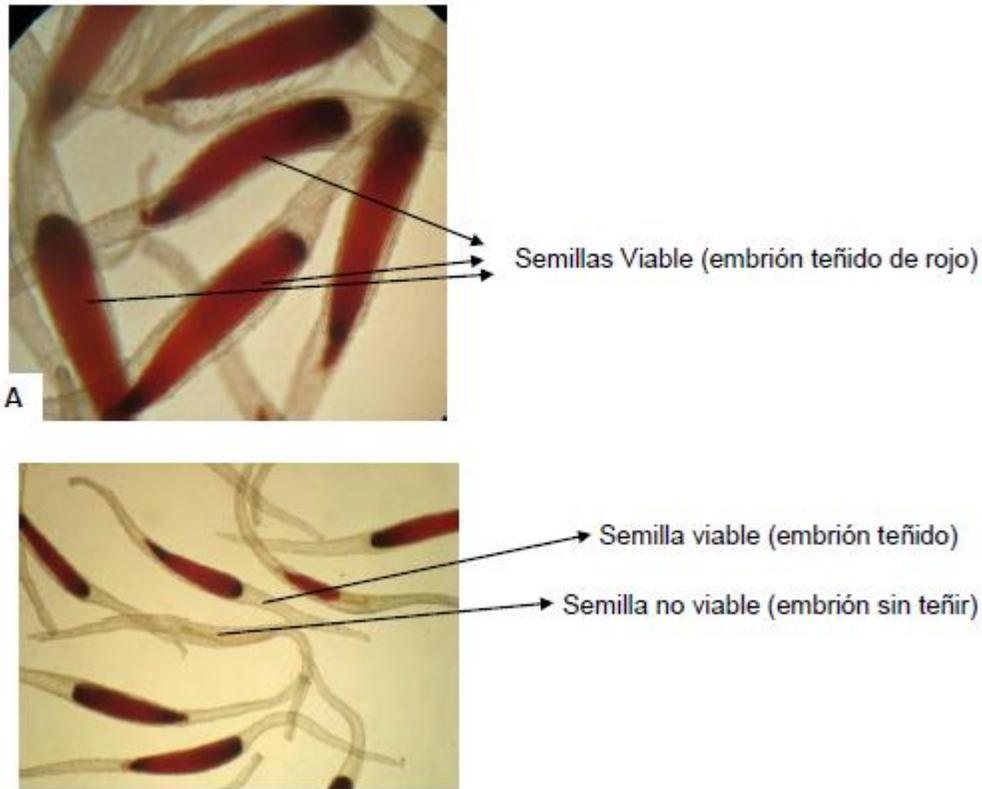


Figura 19. Prueba de viabilidad con TTC al 0,6% aplicada a semillas de *Sobralia* sp, obtenidas de cápsula abierta. A) Aumento 40X. B) Aumento 10X

3.5.2 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

El período de germinación de esta semilla se estableció en tres días y a los cinco días se determinó el porcentaje de germinación de los diferentes tratamientos aplicados, según se presenta en el siguiente cuadro

Cuadro 26. Porcentaje de germinación de semillas de *Sobralia* sp. (código 03-13), luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación.

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación							
		Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3		Promedio	
		Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC
1	Testigo sin NL	95,00	102,03	95,00	102,03	96,00	103,10	95,33	102,38
2	Testigo + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	Solución carga + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	Solución carga + PVS2 20 min + NL	60,00	64,44	66,00	70,88	65,00	69,81	63,67	68,38
5	Solución carga + PVS2 40 min + NL	77,00	82,70	83,00	89,14	81,00	86,99	80,33	86,27

6	Solución carga + PVS2 60 min + NL	76,00	81,62	73,00	78,40	79,00	84,85	76,00	81,62
7	PVS2 20 min + NL	24,00	25,78	28,00	30,07	31,00	33,29	27,67	29,71
8	PVS2 40 min + NL	82,00	88,07	82,00	88,07	85,00	91,29	83,00	89,14
9	PVS2 60 min + NL	77,00	82,70	73,00	78,40	72,00	77,32	74,00	79,48

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 100 semillas.
 Factor de corrección (FC) = 93,11% (porcentaje de viabilidad)
 NL= Nitrógeno Líquido

De acuerdo con el análisis estadístico del modelo factorial, se obtuvo que tanto los factores principales por separado, como la interacción doble que se genera entre ellos, fueron estadísticamente significativos. Así, tomando la interacción doble generada, se obtuvo un mayor porcentaje de germinación cuando se utilizó solución de carga junto con el PVS2 por 40 minutos (figuras 20 y 21).

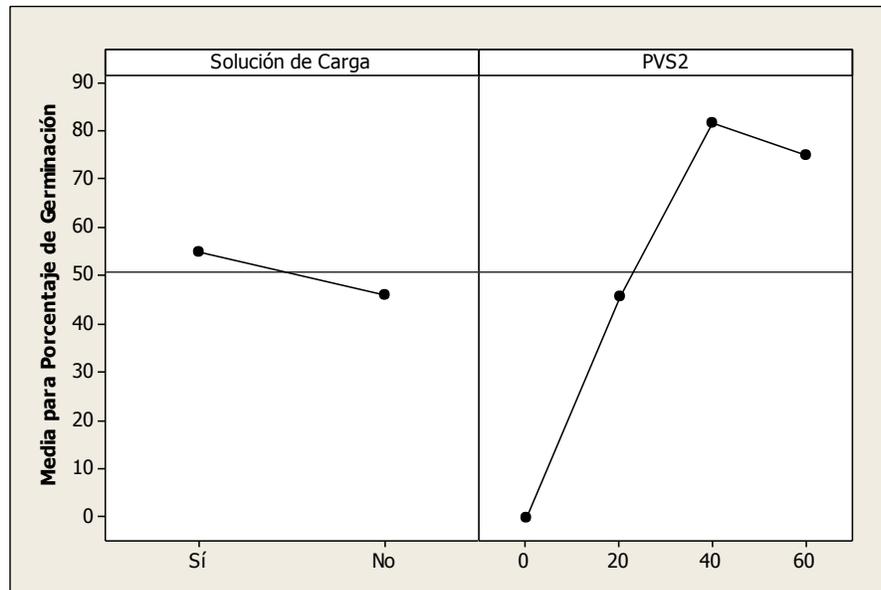


Figura 20. Gráfico de efectos principales *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Sobralia* sp. (código 03-13), luego de ser crioconservadas

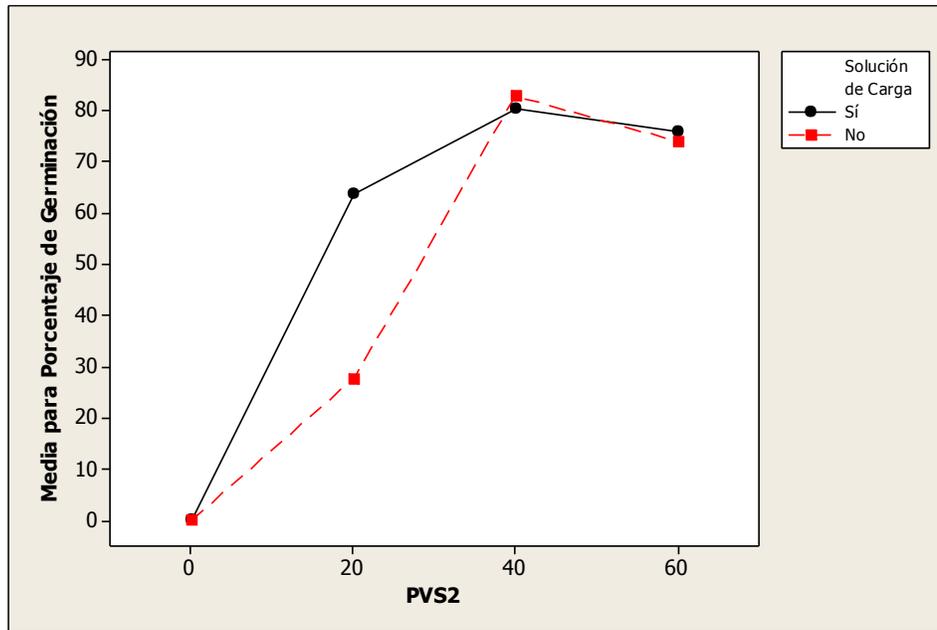


Figura 21. Gráfico de interacción doble de los factores *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Sobralia* sp. (código 03-13), luego de ser crioconservadas

A continuación se muestran imágenes de las semillas de *Sobralia* sp. después de ser sometidas a diferentes tratamientos de crioconservación

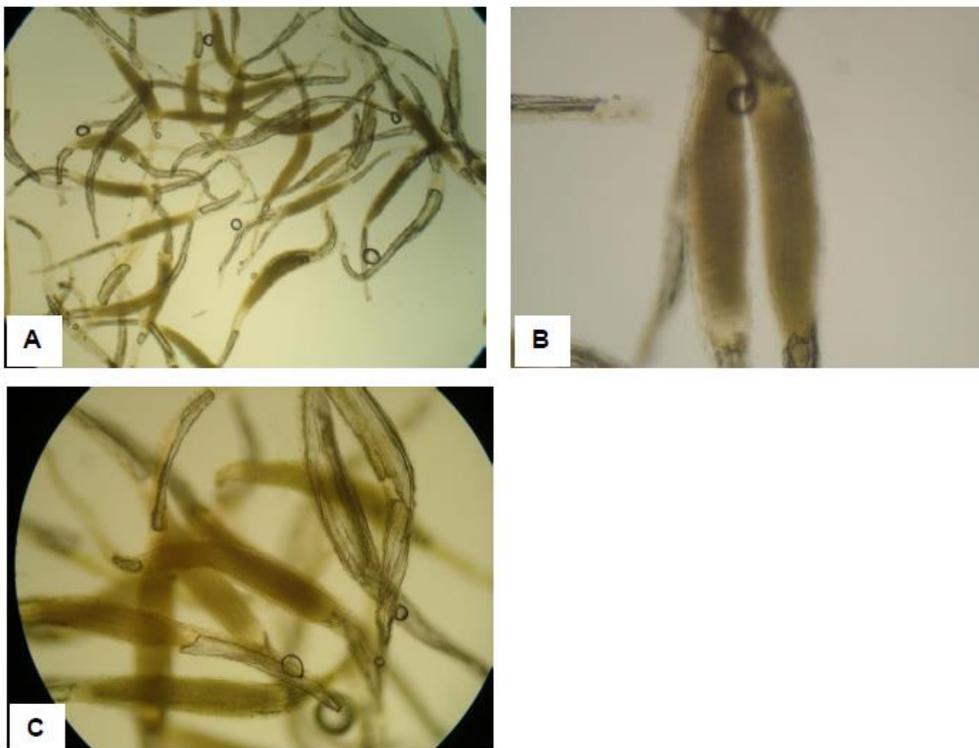


Figura 22. Germinación de semillas de *Sobralia* sp, de acuerdo con diferentes tratamientos de crioconservación. A) Tratamiento testigo sin NL. B) Tratamiento Testigo + NL. C) Tratamiento Solución de Carga + PVS2 60 minutos + NL.

3.5.3 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Con respecto al experimento realizado utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se obtuvieron los siguientes porcentajes de germinación

Cuadro 27. Porcentaje de germinación de semillas de *Sobralia* sp. (código 03-13) luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación, utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación							
		Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3		Promedio	
		Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + NL	90,00	96,66	88,00	94,51	88,00	94,51	88,67	95,23
2	LiCl + NL	82,00	88,07	80,00	85,92	79,00	84,85	80,33	86,27

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 100 semillas.
 Factor de corrección (FC) = 93,11% (porcentaje de viabilidad)
 NL= Nitrógeno Líquido

De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA de una vía, se determinó que sí existía diferencia significativa entre los dos tratamientos $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl evaluados. La prueba estadística Tukey confirmó esa diferencia con un 95% de confianza

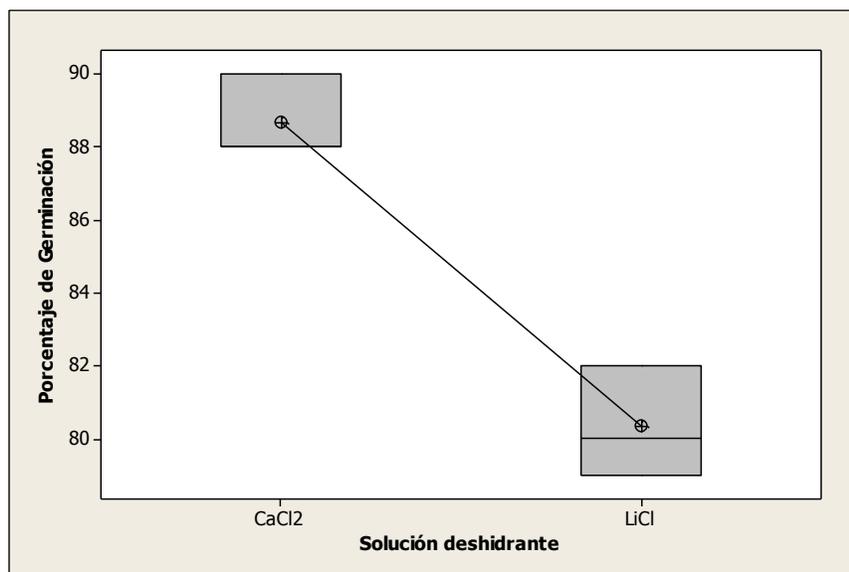


Figura 23. Gráfico de cajas para el porcentaje de germinación de los tratamientos de crioconservación de semillas de *Sobralia* sp. (código 03-13) sometidos a tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

3.6 Crioconservación de *Sobralia* sp. (código 04-13)

3.6.1 Viabilidad de semilla

La muestra de semilla de *Sobralia* sp. (código 04-13) recién extraída de la cápsula, antes de ser desinfectada presentó un porcentaje de viabilidad promedio de 95,33%, a partir del conteo de tres muestras de 100 semillas, correspondientes a tres réplicas establecidas, utilizando la prueba TTC al 0,6%.

Luego de la desinfección de la semilla con NaOCl se obtuvo un porcentaje de viabilidad de 95,33% en un caso y 92,33% en otra muestra desinfectada por separado, para un promedio de 93,83%

3.6.2 Determinación del porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad de las semillas recién extraídas de las cápsulas abiertas se estableció en 28,77%

El porcentaje de humedad que adquieren las semillas de *Sobralia* sp., luego de permanecer por 24 horas en los sistemas de deshidratación es el siguiente

Sistema con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 30,16%

Sistema con LiCl: 14,54%

Sistema Testigo Absoluto: 79,56%

Sistema Testigo H_2O : 84,66%

3.6.3 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

El período de germinación de esta semilla se estableció en cuatro días y a los 14 días se determinó el porcentaje de germinación de los diferentes tratamientos aplicados, según se presenta en el siguiente cuadro

Cuadro 28. Porcentaje de germinación de semillas de *Sobralia* sp. (código 04-13), luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación.

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación							
		Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3		Promedio	
		Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC
1	Testigo sin NL	94,00	100,18	96,00	102,31	95,00	101,25	95	101,25
2	Testigo + NL	24,00	25,58	24,00	25,58	19,00	20,25	22,33	23,80
3	Solución carga sin NL	88,00	93,79	88,00	93,79	92,00	98,05	89,33	95,20
4	Solución carga + PVS2 20 min sin NL	83,00	88,46	80,00	85,26	85,00	90,59	82,67	88,11
5	Solución carga + PVS2 40 min sin NL	85,00	90,59	88,00	93,79	91,00	96,98	88,00	93,79
6	Solución carga + PVS2 60 min sin NL	79,00	84,19	76,00	81,00	72,00	76,73	75,67	80,65
7	PVS2 20 min sin NL	86,00	91,65	88,00	93,79	82,00	87,39	85,33	90,94
8	PVS2 40 min sin NL	44,00	46,89	43,00	45,83	40,00	42,63	42,33	45,11
9	PVS2 60 min sin NL	86,00	91,65	89,00	94,85	83,00	88,46	86,00	91,66
10	Solución carga + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	Solución carga + PVS2 20 min + NL	16,00	17,05	12,00	12,79	19,00	20,25	15,67	16,70
12	Solución carga + PVS2 40 min + NL	14,00	14,92	18,00	19,18	12,00	12,79	14,67	15,63
13	Solución carga + PVS2 60 min + NL	40,00	42,63	31,00	33,04	45,00	47,96	38,67	41,21
14	PVS2 20 min + NL	0,00	0,00	1,00	1,07	0,00	0,00	0,33	0,35
15	PVS2 40 min + NL	12,00	12,79	8,00	8,53	7,00	7,46	9,00	9,59
16	PVS2 60 min + NL	61,00	65,01	66,00	70,34	63,00	67,14	63,33	67,49

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 100 semillas.
 Factor de corrección (FC) = 93,83% (porcentaje de viabilidad)
 NL= Nitrógeno Líquido

En el análisis estadístico del modelo factorial, se obtuvo que los factores principales PVS2 y Nitrógeno Líquido fueron estadísticamente significativos, mientras que el factor principal Solución de Carga no lo fue. En cuanto las interacciones dobles y triples generadas, todas fueron estadísticamente significativas. Así, el mejor tratamiento se logra al aplicar PVS2 por 60 minutos sin la necesidad de una etapa previa con solución de carga (figuras 24 y 25).

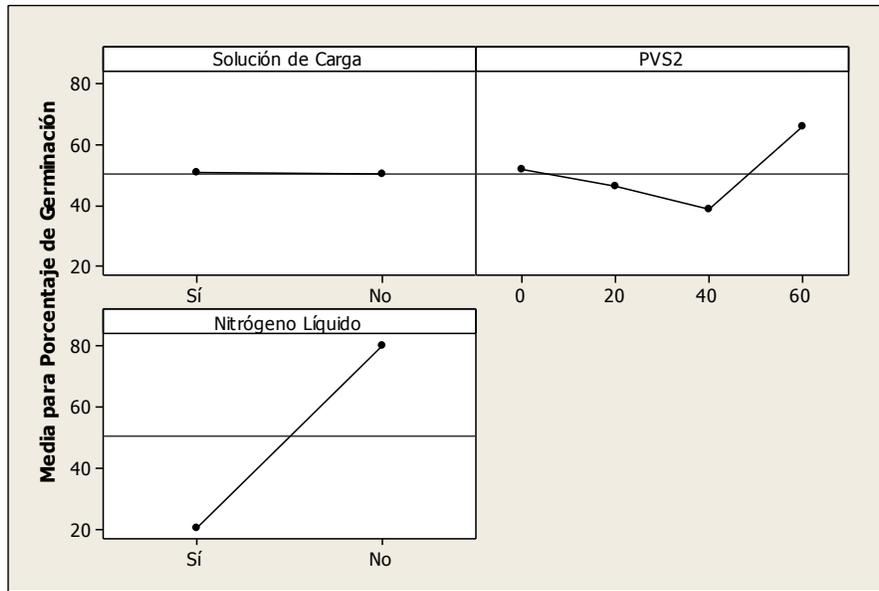


Figura 24. Gráfico de efectos principales *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Sobralia* sp. (código 04-13), luego de ser crioconservadas

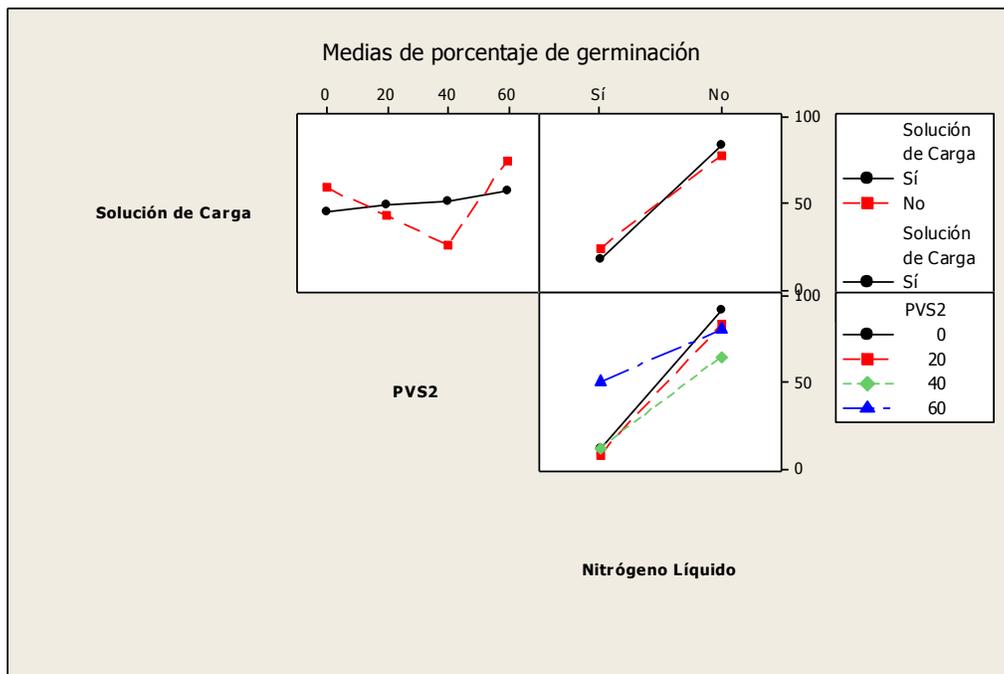


Figura 25. Gráfico de interacción de los factores *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Sobralia* sp. (código 04-13), luego de ser crioconservadas

3.6.4 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Con respecto al experimento realizado utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se obtuvieron los siguientes porcentajes de germinación

Cuadro 29. Porcentaje de germinación de semillas de *Sobralia* sp. (código 03-13) luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación, utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación							
		Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3		Promedio	
		Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sin NL	87,00	92,72	90,00	95,92	89,00	94,85	88,67	94,50
2	LiCl sin NL	82,00	87,39	82,00	87,39	82,00	87,39	82,00	87,39
3	Testigo H_2O sin NL	96,00	102,31	95,00	101,25	98,00	104,44	96,33	102,66
4	Testigo Absoluto sin NL	91,00	96,98	94,00	100,18	93,00	99,12	92,67	98,76
5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + NL	78,00	83,13	82,00	87,39	77,00	82,06	79,00	84,19
6	LiCl + NL	90,00	95,92	89,00	94,85	89,00	94,85	89,33	95,20
7	Testigo H_2O + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	Testigo Absoluto + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 100 semillas.
 Factor de corrección (FC) = 93,83% (porcentaje de viabilidad)
 NL= Nitrógeno Líquido

En el análisis estadístico del modelo factorial en la que se aplicaron soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se obtuvo que los factores principales solución deshidratante y Nitrógeno Líquido fueron estadísticamente significativos, así como la interacción doble generada entre ellos. El mejor tratamiento se logró al deshidratar las semillas con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 24 horas y luego aplicar Nitrógeno Líquido (79,00%, sin factor de corrección) (figuras 26 y 27).

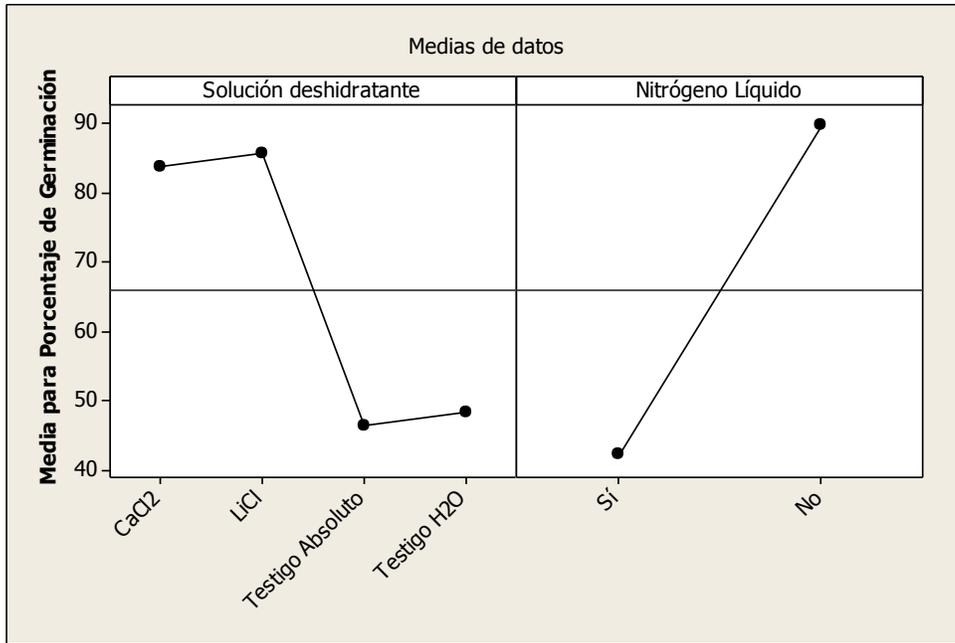


Figura 26. Gráfico de efectos principales para el porcentaje de germinación de los tratamientos de crioconservación de semillas de *Sobralia* sp. (código 04-13) sometidos a tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de CaCl₂ *2H₂O y LiCl.

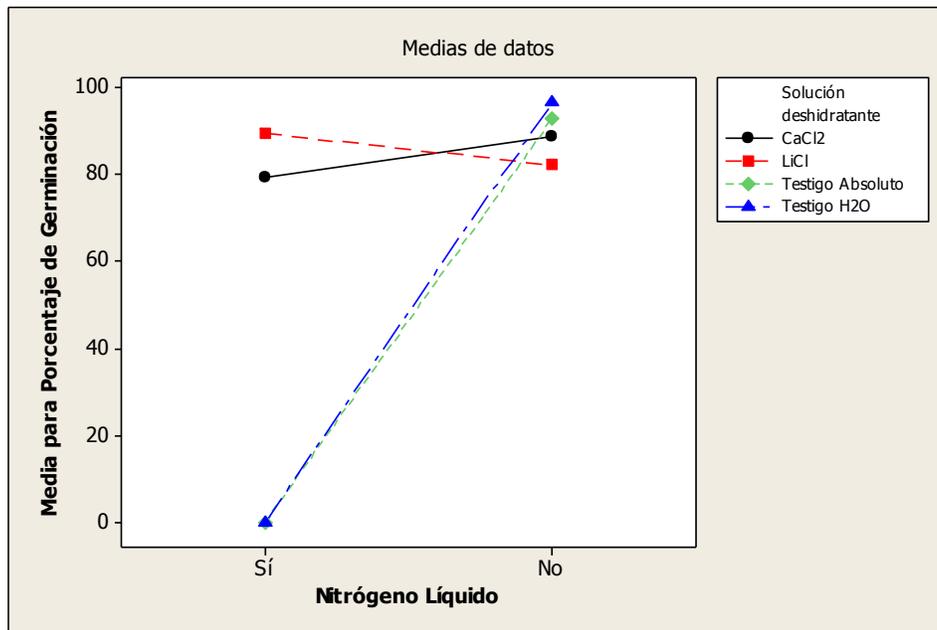


Figura 27. Gráfico de interacción de factores y porcentaje de germinación de los tratamientos de crioconservación de semillas de *Sobralia* sp. (código 04-13) sometidos a tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de CaCl₂ *2H₂O y LiCl.

3.7 Crioconservación de *Lycaste tricolor*

3.7.1 Viabilidad de semilla

La muestra de semilla de *Lycaste tricolor* recién extraída de la cápsula, antes de ser desinfectada presentó un porcentaje de viabilidad promedio de 75,00%, a partir del conteo de tres muestras de 100 semillas, correspondientes a tres réplicas establecidas, utilizando la prueba TTC al 0,6%.

Luego de la desinfección de la semilla con NaOCl se obtuvo un porcentaje de viabilidad promedio 85,33%.

Algunas imágenes de las semillas luego de la prueba de viabilidad con TTC al 0,6% se presentan a continuación

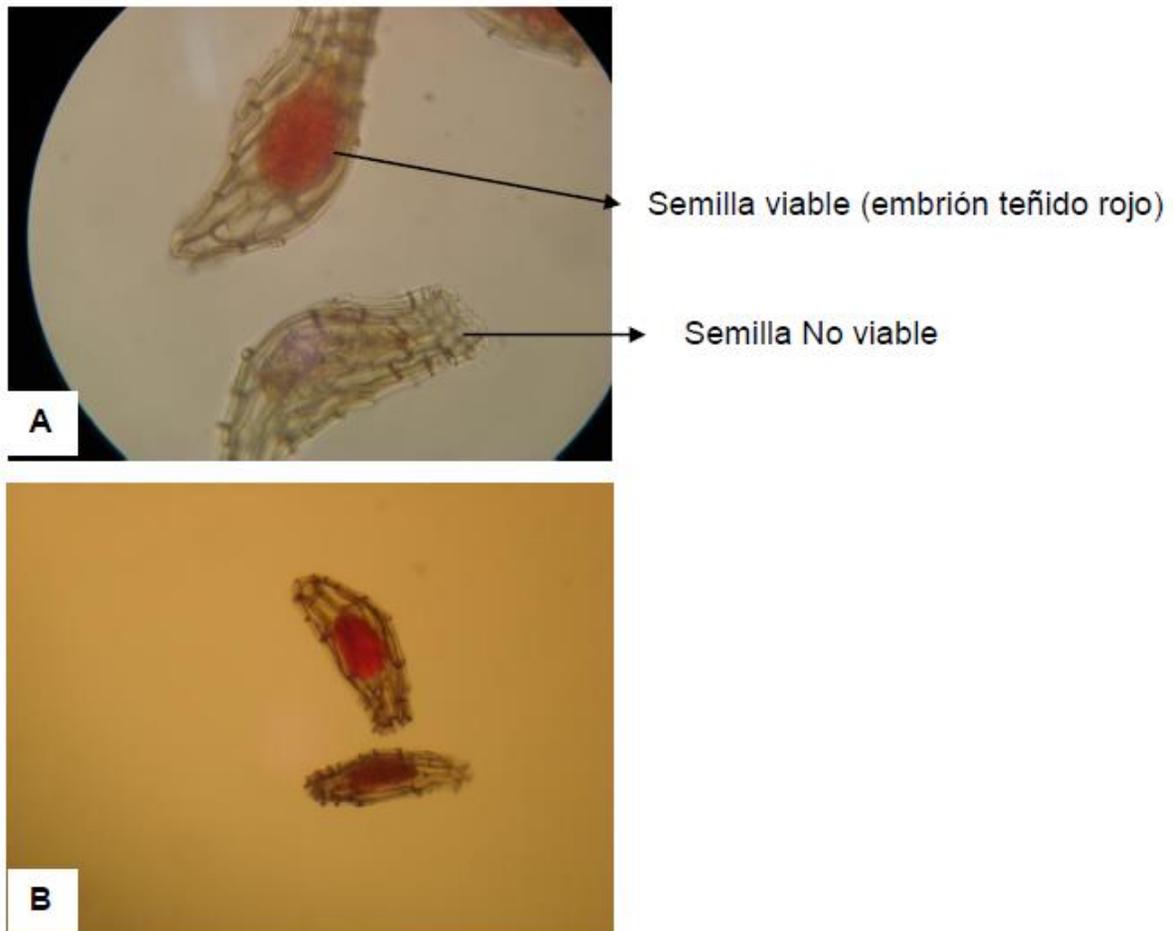


Figura 28. Prueba de viabilidad con TTC al 0,6% aplicada a semillas de *Lycaste tricolor*, obtenidas de cápsula abierta. A) Aumento 40 X. B) Aumento 10X

3.7.2 Determinación del porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad que adquieren las semillas de *Lycaste tricolor*, luego de permanecer por 24 horas en los sistemas de deshidratación es el siguiente

Sistema con CaCl₂ * 2H₂O : 6,93%

Sistema con LiCl: 3,97%

Sistema Testigo Absoluto: 9,09%

Sistema Testigo H₂O: 92,20%

3.7.3 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

El período de germinación de esta semilla se estableció en 25 días y a los 30 días se determinó el porcentaje de germinación de los diferentes tratamientos aplicados, según se presenta en el siguiente cuadro

Cuadro 30. Porcentaje de germinación de semillas de *Lycaste tricolor*, luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación.

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación							
		Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3		Promedio	
		Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC
1	Testigo sin NL	71,00	83,21	68,00	79,69	72,00	84,38	70,33	82,43
2	Testigo + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	Solución carga sin NL	72,00	84,38	72,00	84,38	78,00	91,41	74,00	86,72
4	Solución carga + PVS2 20 min sin NL	79,00	92,58	78,00	91,41	73,00	85,55	76,67	89,85
5	Solución carga + PVS2 40 min sin NL	89,00	104,30	86,00	100,79	85,00	99,61	86,67	101,57
6	Solución carga + PVS2 60 min sin NL	77,00	90,24	72,00	84,38	72,00	84,38	73,67	86,33
7	PVS2 20 min sin NL	79,00	92,58	79,00	92,58	81,00	94,93	79,67	93,36
8	PVS2 40 min sin NL	80,00	93,75	75,00	87,89	81,00	94,93	78,67	92,19
9	PVS2 60 min sin NL	67,00	78,52	69,00	80,86	75,00	87,89	70,33	82,43
10	Solución carga + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	Solución carga + PVS2 20 min + NL	72,00	84,38	71,00	83,21	67,00	78,52	70,00	82,03
12	Solución carga + PVS2 40 min + NL	74,00	86,72	80,00	93,75	79,00	92,58	77,67	91,02
13	Solución carga + PVS2 60 min + NL	77,00	90,24	82,00	96,10	83,00	97,27	80,67	94,53
14	PVS2 20 min + NL	70,00	82,03	69,00	80,86	73,00	85,55	70,67	82,82
15	PVS2 40 min + NL	70,00	82,03	71,00	83,21	73,00	85,55	71,33	83,60
16	PVS2 60 min + NL	74,00	86,72	73,00	85,55	73,00	85,55	73,33	85,94

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 100 semillas.

Factor de corrección (FC) = 85,33% (porcentaje de viabilidad)

NL= Nitrógeno Líquido

En el análisis estadístico del modelo factorial se obtuvo que los tres factores principales evaluados (solución de carga, PVS2 y nitrógeno líquido) fueron estadísticamente significativos. La interacción triple generada no fue significativa, así como tampoco la interacción doble solución de carga*nitrógeno líquido. Las interacciones dobles solución de carga*PVS2 y PVS2* nitrógeno sí resultaron ser significativas (figuras 29 y 30).

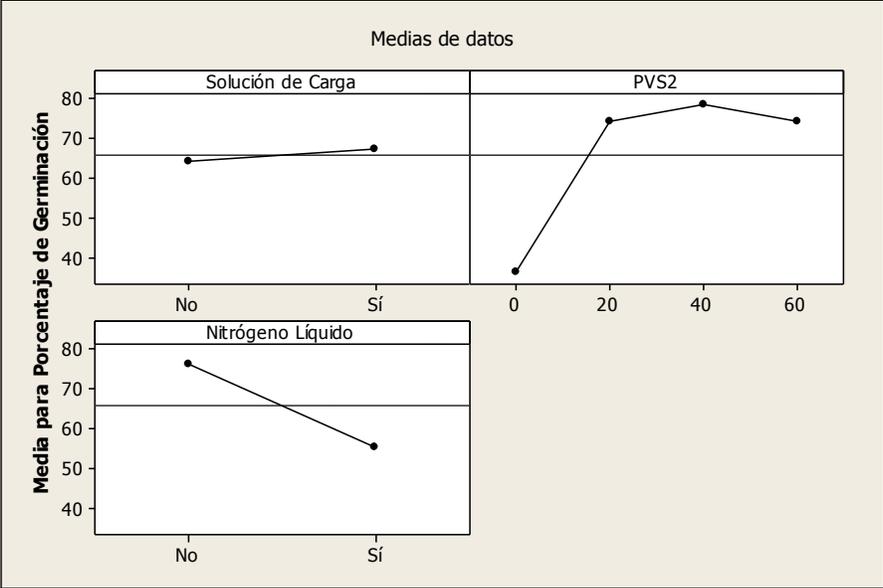


Figura 29. Gráfico de efectos principales *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Lycaste tricolor*, luego de ser crioconservadas

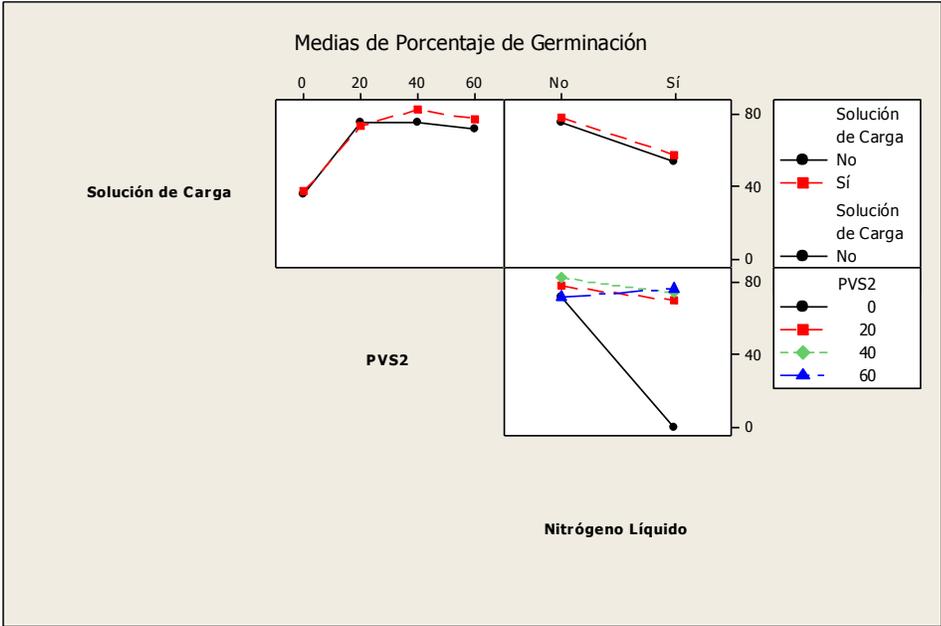


Figura 30. Gráfico de interacción de los factores *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Lycaste tricolor*, luego de ser crioconservadas.

3.7.4 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Con respecto al experimento realizado utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se obtuvieron los siguientes porcentajes de germinación

Cuadro 31. Porcentaje de germinación de semillas de *Lycaste tricolor* luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación, utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación							
		Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3		Promedio	
		Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sin NL	65	76,17	59	69,14	63	73,83	62,33	73,05
2	LiCl sin NL	79	92,58	71	83,21	73	85,55	74,33	87,11
3	Testigo H_2O sin NL	82	96,10	81	94,93	83	97,27	82,00	96,10
4	Testigo Absoluto sin NL	72	84,38	85	99,61	79	92,58	78,67	92,19
5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + NL	75	87,89	78	91,41	73	82,55	75,33	88,28
6	LiCl + NL	75	87,89	72	84,38	65	76,17	70,67	82,82
7	Testigo H_2O + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	Testigo Absoluto + NL	26,00	30,47	27,00	31,64	30,00	35,16	27,67	32,42

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 100 semillas.
 Factor de corrección (FC) = 85,33% (porcentaje de viabilidad)
 NL= Nitrógeno Líquido

En el análisis estadístico del modelo factorial en la que se aplicaron soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se obtuvo que los factores principales solución deshidratante y Nitrógeno Líquido fueron estadísticamente significativos, así como la interacción doble generada entre ellos. El mejor tratamiento se logró al deshidratar las semillas con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 24 horas y luego aplicar Nitrógeno Líquido (75,33%, sin factor de corrección) (figuras 31 y 32).

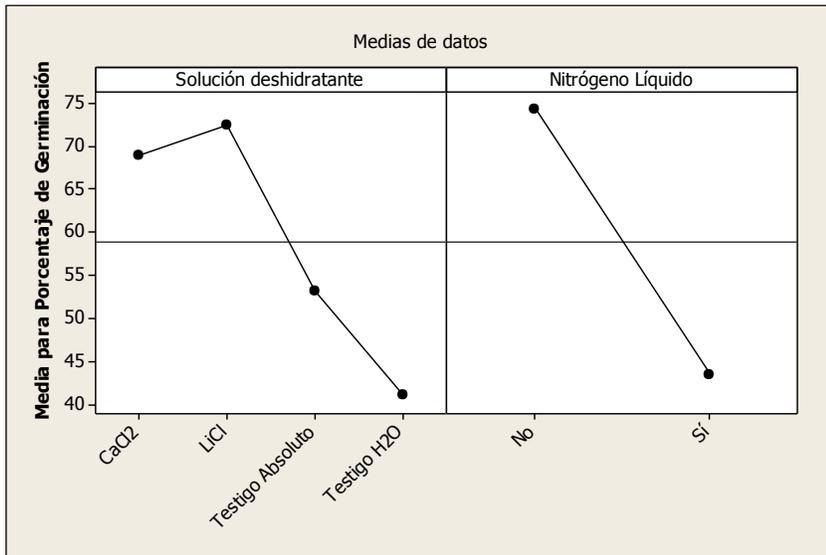


Figura 31. Gráfico de efectos principales para el porcentaje de germinación de los tratamientos de crioconservación de semillas de *Lycaste tricolor* sometidos a tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

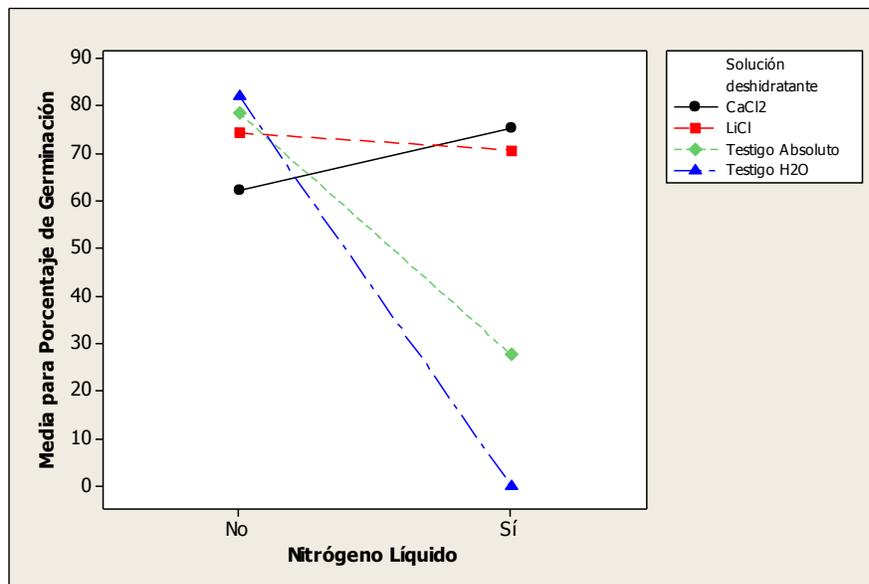


Figura 32. Gráfico de interacción doble y porcentaje de germinación de los tratamientos de crioconservación de semillas de *Lycaste tricolor* sometidos a tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

3.8 Crioconservación de *Sobralia* sp. (Código 05-13)

3.8.1 Viabilidad de semilla

Las muestras de semilla de *Sobralia* sp., después de ser desinfectadas con NaOCl al 0,5%, registraron un porcentaje de viabilidad promedio de 96,70% para la primera réplica y 94,00% para la segunda réplica, para un promedio general de 95,35%.

3.8.2 Determinación del porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad promedio registrado para la semilla de *Sobralia* sp., recién extraída de las cápsulas abiertas fue de 46,91%

El porcentaje de humedad que alcanzaron las semillas, luego de colocarse 24 horas en los diferentes sistemas de deshidratación con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl se presentan en el siguiente cuadro

Cuadro 32. Porcentaje de humedad de semillas de *Sobralia* sp. luego de ser sometidas a varios tratamientos de deshidratación, utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl,.

Tratamiento de deshidratación	Porcentaje de Humedad			
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 2	Promedio
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,50	3,57	4,85	3,97
LiCl	4,00	3,82	6,70	4,84
Testigo Agua	39,24	44,23	36,57	40,01
Testigo Absoluto	9,95	9,35	13,36	10,89

De acuerdo con lo expuesto en la figura 33, el testigo con agua se diferencia estadísticamente del resto de tratamientos, mientras que el testigo absoluto no difiere significativamente del tratamiento con LiCl, así como tampoco difieren los tratamientos con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl entre sí.

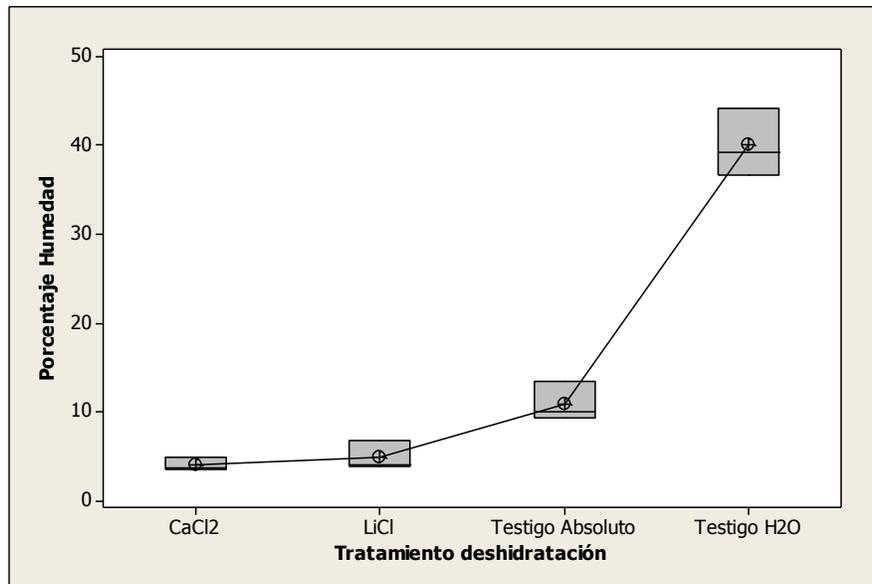


Figura 33. Porcentaje de humedad de semilla de *Sobralia* sp., luego de ser sometida por 24 horas a diferentes tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

3.8.3 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

El período de germinación de esta semilla se estableció en cuatro días y a los 15 días se determinó el porcentaje de germinación de los diferentes tratamientos aplicados, según se presenta en el siguiente cuadro

Cuadro 33. Porcentaje de germinación de semillas de *Sobralia* sp, luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación.

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación							
		Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio General	
		Promed	FC	Promed	FC	Promed	FC	Promed general	FC
1	Testigo sin NL	92,33	96,83	96,67	101,38	96,33	101,03	95,11	99,75
2	Testigo + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	Solución carga sin NL	91,00	95,44	96,33	101,03	95,66	100,33	94,33	98,93
4	Solución carga + PVS2 20 min sin NL	91,67	96,14	93,66	98,23	93,00	97,54	92,78	97,30
5	Solución carga + PVS2 40 min sin NL	85,33	89,49	95,67	100,34	96,67	101,38	92,56	97,07
6	Solución carga + PVS2 60 min sin NL	90,67	95,09	95,00	99,63	93,00	97,54	92,89	97,42
7	PVS2 20 min sin NL	84,00	88,10	86,66	90,89	95,00	99,63	88,55	92,87
8	PVS2 40 min sin NL	84,67	88,80	90,00	94,39	88,33	92,64	87,67	91,94
9	PVS2 60 min sin NL	89,33	93,69	89,33	93,69	83,00	87,05	87,22	91,47
10	Solución carga + NL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	Solución carga + PVS2 20 min + NL	65,67	68,87	84,33	88,44	91,00	95,44	80,33	84,25
12	Solución carga + PVS2 40 min + NL	86,33	90,54	96,33	101,03	87,33	91,59	90,00	94,39
13	Solución carga + PVS2 60 min + NL	77,60	81,38	83,00	87,05	84,67	88,80	81,76	85,74
14	PVS2 20 min + NL	42,30	44,36	57,00	59,78	64,66	67,81	54,65	57,32
15	PVS2 40 min + NL	68,00	71,32	74,33	77,95	73,33	76,91	71,89	75,39
16	PVS2 60 min + NL	77,66	81,45	68,66	72,01	54,00	56,63	66,77	70,03

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 100 semillas.
 Factor de corrección (FC) = 95,35% (porcentaje de viabilidad)
 NL= Nitrógeno Líquido

En el análisis estadístico del modelo factorial para *Sobralia* sp. (código 05-13) se obtuvo que los tres factores principales evaluados (solución de carga, PVS2 y nitrógeno líquido) fueron estadísticamente significativos. La interacción triple generada no fue significativa, mientras que la totalidad de las interacciones dobles sí lo fueron (figuras 34 y 35).

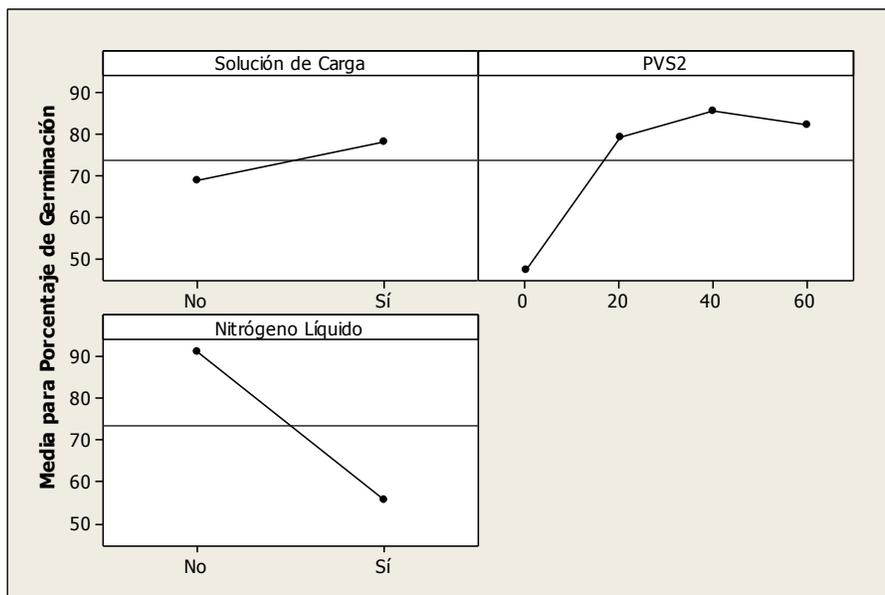


Figura 34. Gráfico de efectos principales *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Sobralia* sp. (05-13) luego de ser crioconservadas

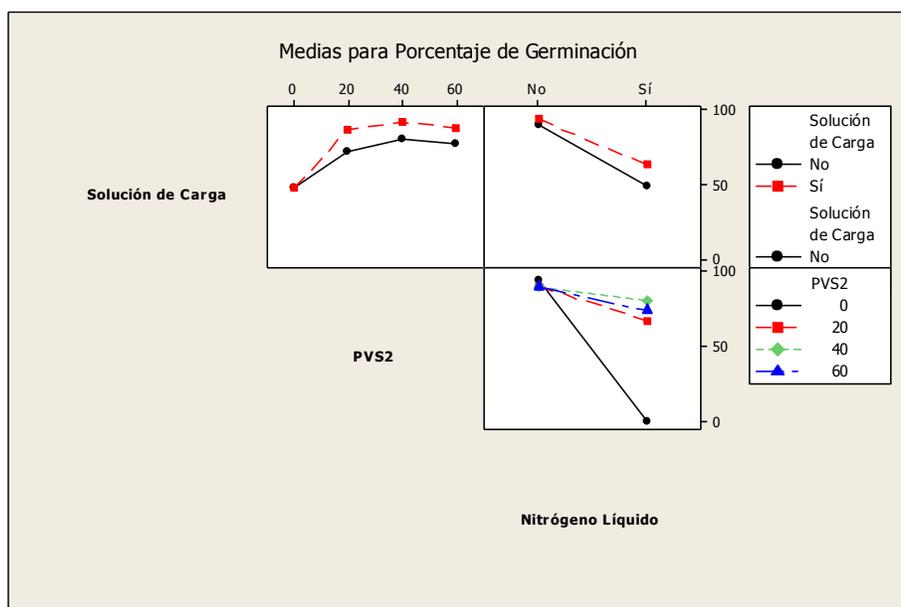


Figura 35. Gráfico de interacción de los factores *solución de carga* y *PVS2* en la germinación de semillas de *Sobralia* sp. (05-13), luego de ser crioconservadas

3.8.4 Deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl y crioconservación

Con respecto al experimento realizado utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se obtuvieron los siguientes porcentajes de germinación

Cuadro 34. Porcentaje de germinación de semillas de *Sobralia* sp. luego de ser sometidas a varios tratamientos de crioconservación, utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

Tratamiento	Descripción de tratamiento	Porcentaje de Germinación							
		Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3		Promedio	
		Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC	Dato original	FC
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sin NL	95,33	99,98	95,33	99,98	95,00	99,63	95,22	99,86
2	LiCl sin NL	90,66	95,08	91,00	95,44	91,00	95,44	90,89	95,32
3	Testigo H_2O sin NL	92,00	96,49	90,33	94,74	91,00	95,44	91,11	95,55
4	Testigo Absoluto sin NL	88,66	92,98	88,00	92,29	90,66	95,08	89,11	93,45
5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + NL	93,67	98,24	91,67	96,14	92,00	96,49	92,45	96,96
6	LiCl + NL	93,00	97,54	92,33	96,83	92,67	97,19	92,67	97,19
7	Testigo H_2O + NL	0,00	0,00	0,33	0,35	0,33	0,35	0,22	0,23
8	Testigo Absoluto + NL	0,33	0,35	0,00	0,00	0,33	0,35	0,22	0,23

El tamaño de la muestra en cada lectura fue de 100 semillas.
 Factor de corrección (FC) = 95,35% (porcentaje de viabilidad)
 NL= Nitrógeno Líquido

En el análisis estadístico del modelo factorial en la que se aplicaron soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se obtuvo que los factores principales solución deshidratante y Nitrógeno Líquido fueron estadísticamente significativos, así como la interacción doble generada entre ellos. El mejor tratamiento se logró al deshidratar las semillas con LiCl por 24 horas y luego aplicar Nitrógeno Líquido (92,67%, sin factor de corrección) aunque el tratamiento con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ produjo básicamente el mismo resultado (92,45% de germinación) (figuras 36 y 37).

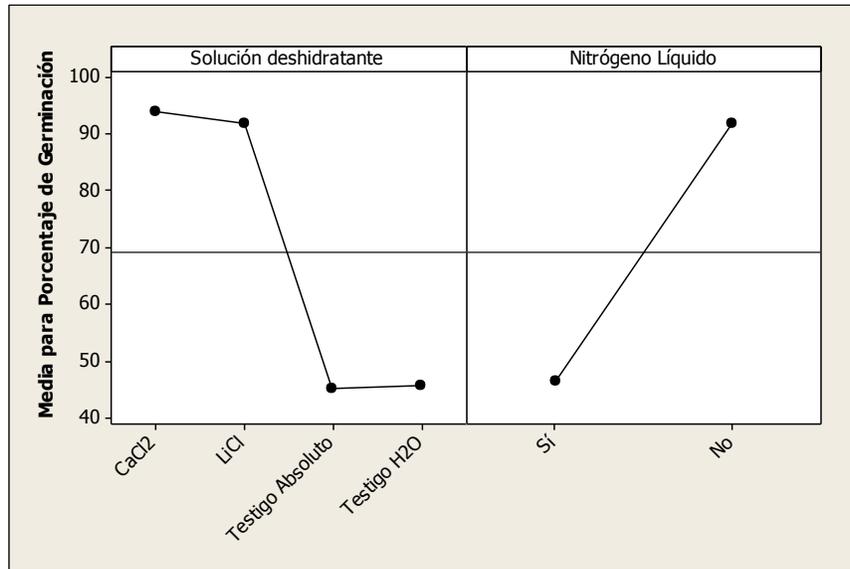


Figura 36. Gráfico de efectos principales para el porcentaje de germinación de los tratamientos de crioconservación de semillas de *Sobralia* sp. (código 05-13) sometidos a tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de CaCl₂ *2H₂O y LiCl.

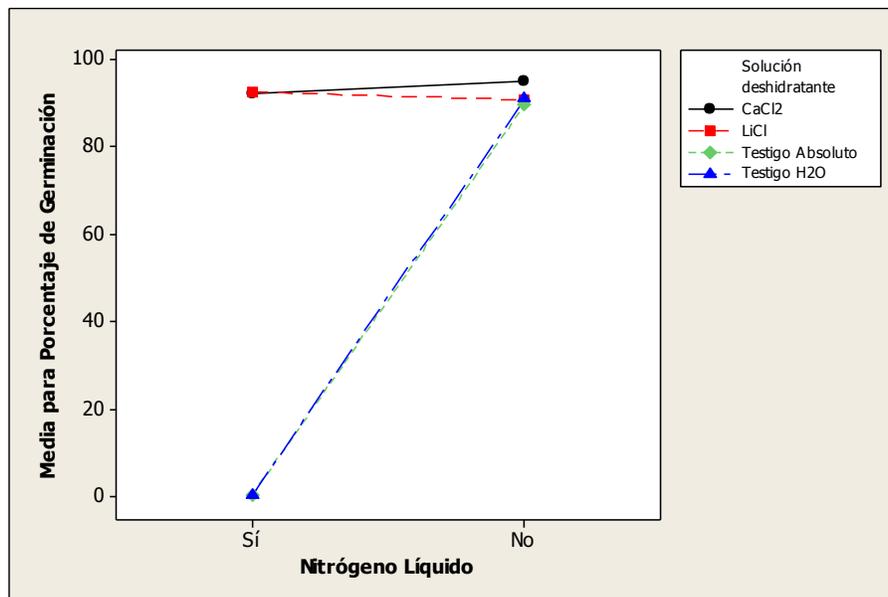


Figura 37. Gráfico de interacción doble y porcentaje de germinación de los tratamientos de crioconservación de semillas de *Sobralia* sp. (código 05-13) sometidos a tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de CaCl₂ *2H₂O y LiCl.

3.9 Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de *Maxillaria* sp.

3.9.1 Germinación

Después de 4 días de cultivo, las semillas de *Maxillaria* sp. germinaron en todos los medios evaluados. A continuación se presentan algunas fotografías al microscopio

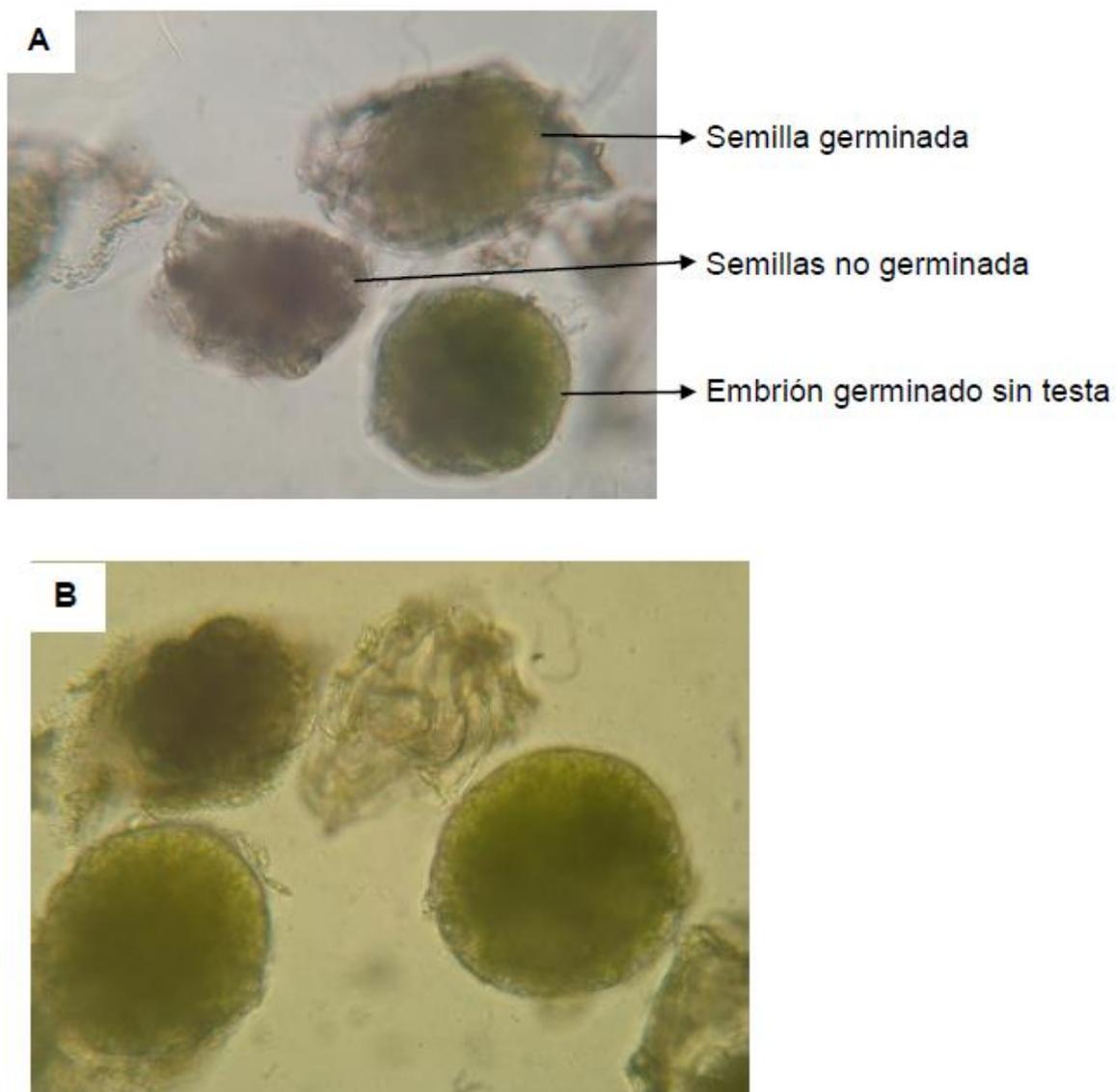


Figura 38. Germinación *in vitro* de semillas de *Maxillaria* sp después de 4 días de introducidas. Aumento 40X. A) Semillas en medio MS 100%. B) Semillas en medio MS 50%.

3.9.2 Crioconservación de protorcormos con precultivo en altas concentraciones de sacarosa y aplicación de PVS2

Después de siete días, ninguno de los protorcormos de los tratamientos evaluados presentó sobrevivencia. Los protorcormos se tornaron color blanco indicando la muerte de los mismos. Ni siquiera los protorcormos más pequeños lograron sobrevivir.

3.9.3 Crioconservación de protorcormos con pretratamiento en solución de precultivo y aplicación de PVS2

Después de cinco días, ninguno de los tratamientos evaluados presentó protorcormos sobrevivientes. Todos los explantes se tornaron color blanco indicando la muerte de los mismos.

3.10 Cultivo de semillas y crioconservación de protorcormos de *Prostechea ochracea*.

3.10.1 Germinación

El periodo de germinación de las semillas de *Prostechea ochracea* se estableció en 10-12 días.

Al comparar las semillas germinadas en los diferentes medios de cultivo, se determinó de forma cualitativa que el medio M&S (1962) al 100% es probablemente el mejor medio para germinación de esta especie, pues la formación de protorcormos se dio con mayor rapidez y mostraron mejor crecimiento y desarrollo.

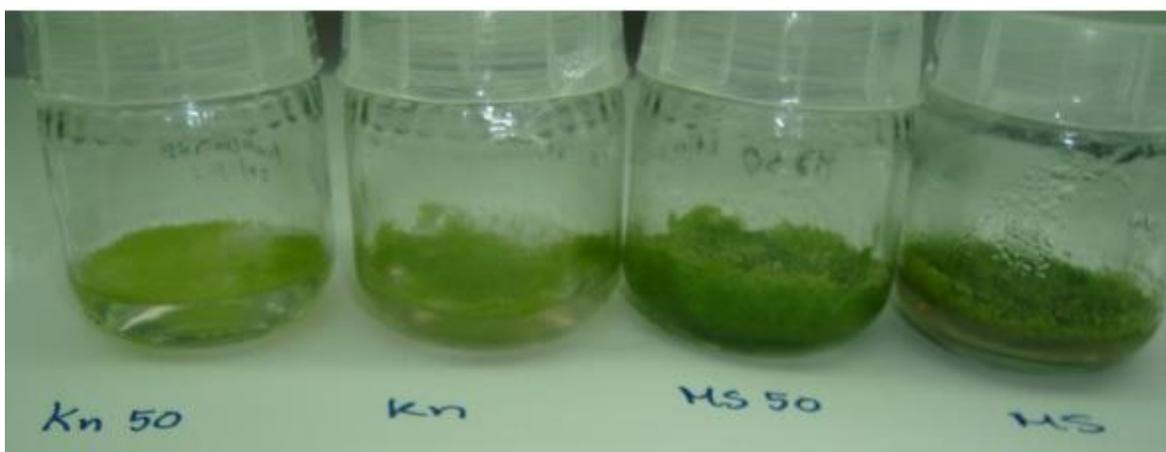


Figura 39. Germinación de *Prostechea ochracea* en diferentes medios de cultivo, a los 49 días de haber sido introducidas a condiciones *in vitro*.

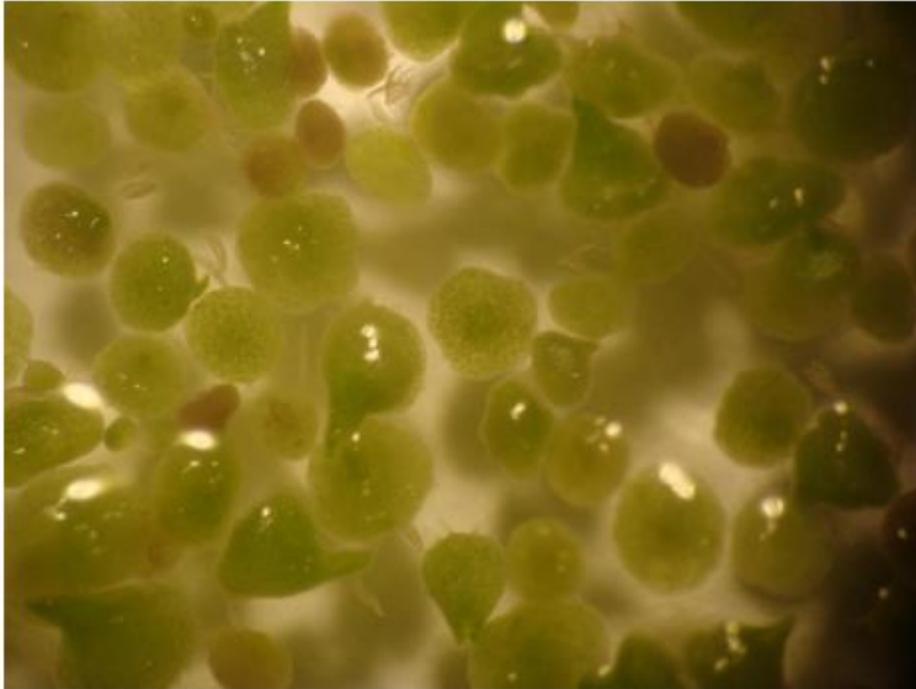


Figura 40. Protocormos de *Prostechea ochracea* desarrollados en medio M&S (1962) completo, luego de 49 días de cultivo.

3.10.2 Crioprotección con PVS2 y criopreservación

Después de cinco días de haber sido sometidos a los diferentes tratamientos con nitrógeno líquido, la sobrevivencia fue nula en todos ellos. A continuación se presentan imágenes de los protocormos luego de la criopreservación

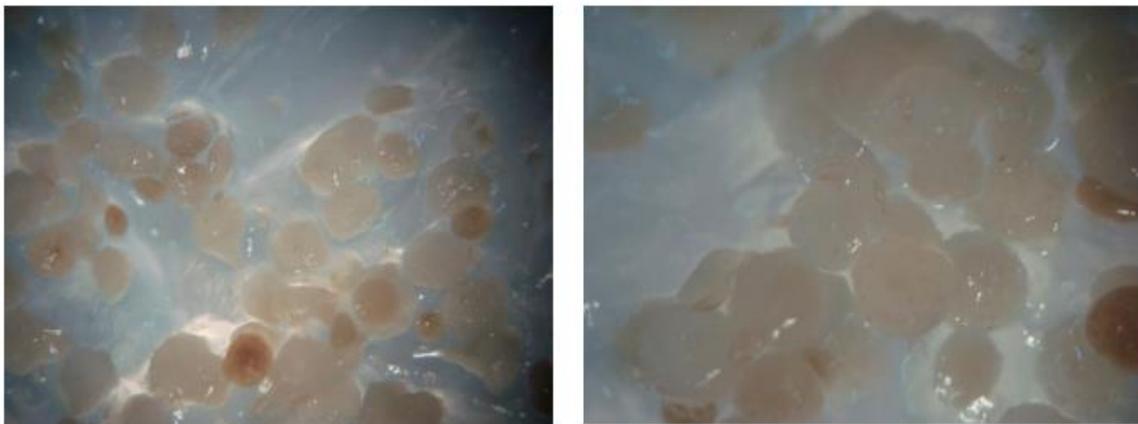


Figura 41. Protocormos de *Prostechea ochracea* luego de ser sometidos a diferentes tratamientos con PVS2 y criopreservación.

3.11 Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de *Oncidium* sp.

3.11.1 Germinación

Las semillas de *Oncidium* sp. germinaron en los medios de cultivo MS 100% a los 15 días de haber sido introducidas a condiciones *in vitro*.

3.11.2 Crioprotección con PVS2 y crioconservación

El 100% de los protocormos que se sometieron a los tratamientos con Nitrógeno Líquido fueron desechados por mortalidad. Todos se tornaron de color blanco.

De los tratamientos testigo (sin Nitrógeno Líquido), el correspondiente a PVS2 40 minutos presentó una sobrevivencia de 27,27% (6 protocormos de 22). El tratamiento PVS2 60 minutos presentó una sobrevivencia de 12,5% (1 protocormo de 8).

3.11.4 Deshidratación de protocormos por medio de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl

Al retirar los protocormos de los sistemas de deshidratación de tres y siete días, se observó que aquellos expuestos a la atmósfera con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl estaban de color negro y de menor tamaño. Los protocormos en el tratamiento con H_2O estaban verdes y de tamaño normal. Los protocormos en el sistema vacío tenían una coloración negra pero de tamaño normal, aunque los de siete días se observaron más pequeños y duros. Después de cultivarlos 8 horas en medio de cultivo (luego de la deshidratación), los protocormos de los tratamientos con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl adquirieron nuevamente una coloración verde. Algunos de los protocormos en el sistema vacío se tornaron verdes, otros se quedaron de color negro.

Comparando los resultados de los protocormos deshidratados por tres y siete días, se observa una mejor sobrevivencia si estos se deshidratan por tres días. De hecho en otros ensayos, se determinó que la pérdida de humedad posible se logra en 24 horas.

Cuadro 35. Supervivencia de protocormos de *Oncidium* sp. luego de ser sometidos a tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl ,

Tratamiento	Solución deshidratante	Tiempo de deshidratación (días)	Número protocormos deshidratados	Número protocormos sobrevivientes	Medio de cultivo
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3	3	0	A
2	LiCl	3	5	1	A
3	Testigo absoluto	3	4	4	A
4	Testigo H_2O	3	5	1	A
5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3	5	5	B
6	LiCl	3	5	4	B
7	Testigo absoluto	3	5	5	B
8	Testigo H_2O	3	6	2	B
9	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7	4	0	A
10	LiCl	7	4	0	A
11	Testigo absoluto	7	5	4	A
12	Testigo H_2O	7	5	0	A
13	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7	5	0	B
14	LiCl	7	4	0	B
15	Testigo absoluto	7	5	3	B
16	Testigo H_2O	7	4	2	B

Donde

A= M&S (1962) al 100% de sales, suplementado con Vitaminas M&S, 3% sacarosa, 3,3 g/l Phytigel. pH ajustado a 5,5

B = M&S (1962) al 30% de sales, suplementado con Vitaminas M&S al 30%, 1% sacarosa, 1 mg/l Ácido Naftalenacético (ANA), 1,5 mg/l de Benciladenina (BA), 10% v/v de Agua de coco, 50 g/l de Banano, 1 g/l de Caseína hidrolizada, 1g/l de Carbón activado, 4,5 g/l Gellan Gum. pH ajustado a 5,5.

3.12 Cultivo de protocormos de *Brassia verrucosa*

3.12.1 Capacidad de eliminación de humedad de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl

Luego de someter protocormos de *Brassia verrucosa* a diferentes tratamientos de deshidratación por medio de atmósferas controladas de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl (y sus testigos) por diferentes periodos de tiempo (24, 48 y 72 horas), se obtuvieron los siguientes porcentajes de eliminación de humedad

Cuadro 36. Capacidad de eliminación de humedad por medio de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl en protocormos de *Brassia verrucosa*

Tratamiento de deshidratación	Tiempo de exposición (horas)	Porcentaje de eliminación de humedad
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24	93,26
LiCl	24	74,26
Testigo H_2O	24	19,29
Testigo absoluto	24	71,32
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	48	93,62
LiCl	48	92,46
Testigo H_2O	48	15,17
Testigo absoluto	48	47,20
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	72	93,49
LiCl	72	92,26
Testigo H_2O	72	20,43
Testigo absoluto	72	65,38

En el análisis estadístico aplicado se obtuvo que el factor Tiempo no es estadísticamente significativo, mientras que la solución deshidratante sí lo es. El mayor porcentaje de reducción de humedad sobre los protocormos de *Oncidium* sp. se obtuvo con la solución saturada de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, seguido de la solución de LiCl . El tratamiento testigo logró reducir la humedad en menor medida en comparación con los otros agentes de deshidratación. Finalmente el tratamiento testigo con agua es el que provocó la menor deshidratación.

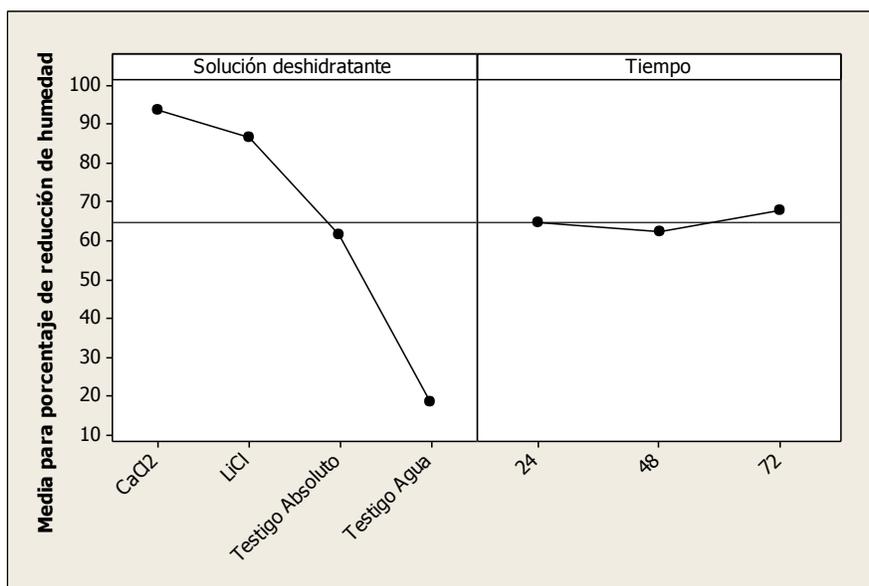


Figura 42. Gráfico de efectos principales para el porcentaje de reducción de humedad en protocormos de *Oncidium* sp. al aplicar diferentes tratamientos de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

3.13 Crioconservación de ápices de *Trichocentrum cebolleta*

2.13.1 Crioconservación de ápices

Una vez que se estableció la técnica de extracción de ápices y se determinó un medio de recuperación adecuado, se estableció un diseño factorial completo 5x2x2, siendo los factores solución de carga (en los niveles Sí y No), la solución PVS2 (en sus niveles de 0, 5, 10, 15 y 20 minutos) y el Nitrógeno Líquido (en sus niveles Sí y No), tal y como se muestra en el cuadro 19. Previo a la aplicación de solución de carga los ápices fueron precultivados por 16 horas en un medio semisólido M&S (1962) al 100% de sales con 0,3M de sacarosa. Para cada tratamiento se utilizaron 10 ápices.

Cuadro 37. Porcentaje de sobrevivencia de ápices de *Trichocentrum cebolleta*, luego de ser sometidos a diferentes tratamientos de crioconservación, aplicando la técnica de vitrificación con PVS2.

Tratamiento	Solución de carga (20 minutos)	Exposición en PVS2 (minutos)	Nitrógeno Líquido	Porcentaje de sobrevivencia
1	Sí	0	Sí	0
2	Sí	5	Sí	0
3	Sí	10	Sí	0
4	Sí	15	Sí	10
5	Sí	20	Sí	20
6	No	0	Sí	0
7	No	5	Sí	0
8	No	10	Sí	0
9	No	15	Sí	0
10	No	20	Sí	10
11	Sí	0	No	50
12	Sí	5	No	20
13	Sí	10	No	20
14	Sí	15	No	20
15	Sí	20	No	30
16	No	0	No	70
17	No	5	No	20
18	No	10	No	20
19	No	15	No	30
20	No	20	No	30

De acuerdo con el ANOVA aplicado, los factores solución de carga y el PVS2 no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$). Solamente el factor Nitrógeno Líquido resultó ser significativo. A continuación los resultados en la siguiente figura de efectos principales

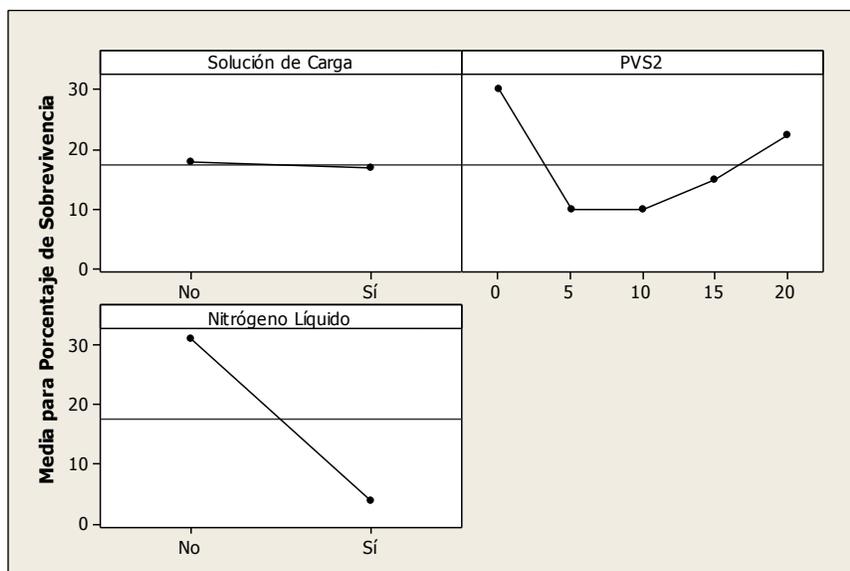


Figura 43. Gráfico de efectos principales para el porcentaje de sobrevivencia de protocormos de *Trichocentrum cebolleta*, luego de aplicar diferentes tratamientos de crioconservación utilizando la técnica de vitrificación.

4. Análisis de Resultados

4.1 Crioconservación de *Warscewiczella discolor*

La obtención de semilla estéril de *W. discolor*, a partir de una cápsula cerrada, se realizó utilizando un protocolo de desinfección en el cual se eliminaron todos los microorganismos superficiales por medio de dos agentes: etanol de 95% y calor. En el caso de *W. discolor*, el gran tamaño y consistencia del fruto, permitió la aplicación de este fuerte método de desinfección, que aunque dañara el tejido superficial del fruto, las semillas pudieron ser retiradas del interior sin haber sufrido daños y conservando su condición de esterilidad.

La utilización de TTC al 1% para conocer la viabilidad de la semilla obtenida de la cápsula abierta de *W. discolor*, de acuerdo con el método de Lauzer *et al.*(1994), permitió determinar que no existía diferencia significativa entre los tratamientos aplicados. Esto significa que la variación en temperatura y la aplicación de Tween 20 (como agente tensoactivo), no representó ninguna diferencia estadística, pudiéndose utilizar cualquiera de ellos indistintamente. De igual forma, la solución de TTC al 1%, tal y como se utilizó, permitió la tinción de las semillas viables o con posibilidades de germinar; sin embargo, esta solución presentaba el inconveniente de tener cambios de pH durante su almacenamiento, lo cual es indeseado en esta clase de prueba de viabilidad. La prueba con TTC se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenadas, que participan en las

reacciones de respiración de las células vivas. Estas enzimas están presentes en los tejidos vivos de las semillas y reducen la solución incolora que contiene la sal de tetrazolio a un compuesto insoluble denominado Formazán de color rojo/rosado. Los colores obtenidos típicamente en esta prueba corresponden al rojo indicativo de tejidos vivos y al blanco indicativo de tejidos muertos (Craviotto *et al.*, 2011).

Para una crioconservación exitosa, es esencial evitar el congelamiento intracelular letal, el cual ocurre durante el enfriamiento rápido en nitrógeno líquido. Así, los especímenes a conservarse tienen que ser suficientemente deshidratados para evitar el congelamiento intracelular (Sakai, 2000). En el caso de *W. discolor* se realizaron diferentes tratamientos para lograr una deshidratación efectiva: por medio de aire estéril, utilizando la solución vitrificadora PVS2 y el uso de atmósferas controladas con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl .

A pesar de la aplicación de los diferentes tratamientos de deshidratación y crioconservación, no fue posible obtener germinación de las semillas de *W. discolor* en ninguno de los medios y condiciones utilizadas, a pesar de haber establecido que había un porcentaje de alrededor 30% de estas que tenían posibilidad de germinar (viabilidad). Los tratamientos testigo, en los que las semillas no fueron expuestas a ningún tratamiento de deshidratación y fueron cultivadas directamente en medios nutritivos, demostraron que existe un factor probablemente relacionado a los medios de cultivo que debe tomarse en cuenta para lograr el éxito de un experimento de este tipo. Posiblemente los medios de germinación utilizados (M&S -1962- al 100% y 50% de sales minerales y medio Knudson -1946- al 100% y 50% de sales minerales) no fueron los óptimos para esta especie; o bien, factores físicos como pH, temperatura y luz (fotoperiodo y/o intensidad lumínica) no fueron los adecuados para esta especie en particular.

4.2 Crioconservación de *Guarianthe skinneri* (Código 01-13)

Debido al riesgo que poseía la solución de TTC al 1% de Lauzer *et al.*(1994), de variar su pH durante el periodo de almacenamiento, la determinación la viabilidad en *G. skinneri* se realizó con una nueva solución al 0,6%, esta vez incluyendo Na_2HPO_4 al 0,89% y Na_2HPO_4 al 0,68% como amortiguadores. Esta variación resultó igualmente efectiva al permitir la tinción de las semillas durante el periodo expuesto (figura 5).

Con respecto a los tratamientos de crioconservación utilizando la técnica de vitrificación combinando solución de carga y PVS2 a diferentes tiempos, se obtuvo germinación en casos en los que se aplicó nitrógeno líquido, siendo esto un indicativo del efecto positivo de estas soluciones en la crioprotección celular. La vitrificación incluye un tratamiento de las muestras con sustancias crioprotectoras, deshidratación con soluciones de vitrificación altamente concentradas, congelamiento rápido y descongelamiento, remoción de crioprotectores y recuperación (Engelmann, 2000).

De acuerdo con Sakai (2000), la vitrificación es un proceso físico definido como la fase de transición de una solución acuosa del líquido a un sólido vídrioso amorfo, o vidrio, a la temperatura de transición vítrea (T_g), mientras se evita la cristalización de hielo. Un vidrio llena los espacios en un tejido, y durante la deshidratación puede contribuir a evitar colapso de tejido adicional, concentración de solutos y alteraciones de pH. Se espera que un vidrio exhiba una presión de vapor de agua menor que el correspondiente sólido cristalino y así prevenir deshidratación adicional. El vidrio es excesivamente viscoso y detiene todas las reacciones químicas que requiere la difusión molecular; su formación

puede dar lugar a dormancia y estabilidad sobre el tiempo. Así, la técnica de vitrificación aplicada a estructuras vegetales, requiere del uso de una solución vitrificadora concentrada (como el PVS2), la cual deshidrata el citosol suficientemente sin causar daño, y lo pasa a un vidrio estable cuando es colocado en nitrógeno líquido.

Al evitarse la formación de hielo en un sistema celular, las técnicas de vitrificación simplifican los procedimientos de criopreservación y eliminan o reducen las posibilidades de efectos dañinos de la cristalización intra y extracelular, produciendo altos niveles de crecimiento luego de la inmersión en nitrógeno líquido.

La solución vitrificadora PVS2 no permea dentro del citosol durante el proceso de deshidratación. Esta solución se súper enfría debajo de -100°C a una velocidad de enfriamiento práctica y finalmente se solidifica a -115°C (Sakai, 2000)

Existen diferentes formas de inducir tolerancia a la deshidratación con PVS2 y la mitigación de daños durante este proceso. Normalmente los explantes *in vitro* son precultivados en un medio con alta concentración de sacarosa (0,3-0,6 M sacarosa) por algunas horas y luego con tratados con una solución de 2M glicerol + 0,4M sacarosa (solución de carga) por algunos minutos, antes de deshidratar con PVS2. Los efectos dañinos por la deshidratación con PVS2 se logran reducir o eliminar, ajustando el tiempo de exposición en esta solución. En el caso particular de *G. skinneri*, las semillas fueron sometidas a la solución de carga por 20 minutos y luego al PVS2 por 20 y 40 minutos. También se establecieron tratamientos sin aplicación de solución de carga, para conocer el efecto de ambos factores, por separado y su interacción; todo esto mediante el diseño experimental factorial 3x2. El factor nitrógeno líquido no se tomó como parte del diseño, pues solo fue evaluado en uno de sus niveles: cuando este fue aplicado.

La solución de carga se ha reportado como muy efectiva en la inducción de tolerancia a la deshidratación de congelamiento o al PVS2. Durante el tratamiento con solución de carga, las células se deshidratan y se plasmolizan considerablemente. La presencia de solución de carga en el espacio periprotoplasmático de células plasmolizadas puede mitigar el estrés mecánico causado por la severa deshidratación, y dar una acción protectora para minimizar los cambios dañinos en la membrana durante la deshidratación severa, aunque este mecanismo no es muy bien conocido (Sakai, 2000).

El análisis estadístico demostró que existe una interacción doble entre el factor *solución de carga* y el factor *PVS2*, lo cual significa que la combinación de ambos factores produce un efecto distinto del causado por los factores principales, que también tienen efecto significativo por separado. Teniendo en cuenta esto, para efectos de criopreservarse, bajo las condiciones estudiadas, las semillas de *G. skinneri* (código 01-13) produjeron el porcentaje de germinación más alto (45,13% sin factor de corrección y 66,01% aplicando el factor de corrección) cuando se utilizó la solución de carga (por 20 minutos) y el PVS2 por 40 minutos (figura 7).

El resultado del diseño experimental fue evaluado por medio del porcentaje de germinación y no por medio de la viabilidad. Según Ossenbach *et al.* (2007), la determinación de la viabilidad de semillas por medio de la prueba de tetrazolio es meramente otro instrumento útil, pero no es infalible y no es la respuesta final a todos los problemas de análisis. La precisión de los resultados depende de la capacidad del analista que los interpreta. Esta prueba revela los porcentajes de germinación basándose únicamente en las condiciones internas de la semilla, pero no revela el comportamiento

combinado de la calidad de las semillas y de unas condiciones dadas de crecimiento. Es por esta razón que al aplicar el factor de corrección, que consiste en eliminar al porcentaje de germinación el peso de las semillas no viables, hubo casos en que el porcentaje de germinación sobrepasó el 100%. Por esta razón los análisis estadísticos fueron realizados sin la aplicación del factor de corrección.

En el caso de *G. skinneri* también se demostró que el medio de cultivo semisólido M&S (1962) al 100% de sales minerales con 3% de sacarosa, ajustado a un pH de 5,5 permite la germinación de las semillas de forma exitosa. Este mismo medio de también logró llevar los embriones a formar protocormos y posteriormente plántulas.

4.3 Crioconservación de *Epidendrum* sp.

El protocolo de desinfección aplicado a la cápsula cerrada y la prueba de viabilidad realizada en las semillas de *Epidendrum* sp. demostraron ser efectivas, puesto que se obtuvieron semillas estériles y tinción de las semillas viables, respectivamente. En esta caso particular, el porcentaje de viabilidad fue muy bajo (19,19%), lo cual es un aspecto indeseado puesto que disminuye en gran medida la base de material para trabajar en las posteriores pruebas de crioconservación.

En el caso de los tratamientos de crioconservación por medio de vitrificación, haciendo uso de solución de carga y PVS2, se demostró, al igual que en el caso de *G. skinneri* (código 01-13), que los factores solución de carga y PVS2 tienen efecto significativo como factores principales y que además, su interacción también es significativa. Sin embargo, en este caso, se obtuvo que la combinación que arrojó el mayor porcentaje de germinación fue en la que se aplicó solución de carga por 20 minutos seguido de PVS2 por 40 minutos (2,29% sin factor de corrección y 11,93% con factor de corrección), como pasos previos a la inmersión en nitrógeno líquido. Estos resultados concuerdan con lo afirmado por Sakai (2000), quien indicó que los efectos dañinos por la deshidratación con PVS2 se logran reducir o eliminar, ajustando el tiempo de exposición en esta solución. Para el caso de *Epidendrum* sp. es probable que la exposición al PVS2 por 60 minutos resultara excesiva y dañara las células, mientras que la exposición a este mismo crioprotector por 20 minutos, por el contrario, resultara insuficiente; obteniéndose en ambos casos bajos porcentajes de germinación (figura 12).

El tratamiento en el que solamente se aplicó solución de carga, antes de la inmersión en nitrógeno líquido, provocó la muerte de la totalidad de la semilla, demostrando esto que la sola aplicación de la solución de carga no es suficiente para lograr una crioprotección efectiva, contrario de cuando esta es combinada con el PVS2, o bien, el PVS2 añadido por único agente crioprotector.

En relación con los tratamientos en los que las semillas de *Epidendrum* sp. fueron deshidratadas con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , previo a la inmersión en nitrógeno líquido, se obtuvo que no hubo diferencia significativa entre los mismos. Esto significa que, aunque sí se logró la deshidratación de las semillas, puesto que se obtuvo sobrevivencia (germinación) luego de aplicar nitrógeno líquido, los sistemas con las soluciones saturadas no mostraron diferencias con el sistema testigo que no incluía solución alguna. También debe tomarse en cuenta que en este caso no se determinó el porcentaje de humedad con el que ingresaron las semillas al sistema, por lo que no puede demostrarse el funcionamiento de los sistemas. Existe la probabilidad de que los sistemas

realmente no hayan ejercido ninguna deshidratación y que la semilla desde un inicio tenía un porcentaje de humedad relativa que le permitió soportar las condiciones del nitrógeno líquido. Ante esta duda, y por no existir diferencias significativas entre los sistemas, se decidió descartarlos (figura 2) y sustituirlos por otros distintos (figura 3).

4.4 Crioconservación de *Guarianthe skinneri* (Código 02-13)

Tal y como se demostró con la semilla de *G. skinneri* (código 01-13), el protocolo de desinfección aplicado y el método para determinar viabilidad fueron efectivos también para *G. skinneri* (código 02-13), representando una muestra de reproducibilidad de ambos. Sin embargo, a pesar de ser la misma especie, esta semilla presentó un porcentaje de viabilidad más bajo que la semilla del código 01-13, lo que comprueba las variaciones en la calidad de la semilla que se pueden encontrar y que dependen de aspectos genéticos y de cultivo.

En el diseño experimental para la crioconservación por medio de la técnica de vitrificación, se obtuvo que existía una interacción doble entre los factores solución de carga y PVS2, sin embargo, se obtuvo que el efecto principal del factor solución de carga no era estadísticamente significativo. Esto implica que, para este caso en particular, la solución de carga no representó un elemento que contribuyera a la obtención de mejores porcentajes de germinación luego de la crioconservación, a pesar de tener interacción con el factor PVS2. Por estas razones el mejor tratamiento fue aquel en el que no se empleaba solución de carga y la solución PVS2 se aplicaba por 60 minutos (18,65% sin factor de corrección y 60,53% con factor de corrección). Esto demuestra que, incluso tratándose de la misma especie, podrían obtenerse diferentes respuestas a procesos de crioconservación, posiblemente asociados a diferencias genéticas y de calidad de la semilla.

En el caso de los tratamientos de crioconservación utilizando las soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , con el uso de los sistemas descritos en la figura 2, el análisis estadístico ANOVA de una vía determinó en esta oportunidad que sí existía diferencia significativa entre los tres tratamientos evaluados, contrario a lo obtenido con la semilla de *Epidendrum* sp. La prueba estadística Tukey, determinó que los tratamientos $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y el tratamiento testigo no difirieron estadísticamente entre sí, pero sí lo hicieron del tratamiento con LiCl . Era de esperar que el tratamiento testigo se diferenciara estadísticamente entre los tratamientos con las soluciones saturadas, sin embargo, esto no ocurrió y las posibles explicaciones recaen nuevamente en el diseño del sistema, razón por la cual en los diseños posteriores con semillas de *Sobralia* sp. y *Lycaste tricolor*, el sistema se modificó por el descrito en la figura 3. Otras razones de las diferencias encontradas en la efectividad del sistema de deshidratación, comparando las semillas de *G. skinneri* y *Epidendrum* sp. radica en el tamaño de las semillas entre ambas especies, siendo más grandes las semillas de *Epidendrum* sp., y el tiempo de deshidratación (en *G. skinneri* tardó 24 horas más).

A pesar de las inconsistencias encontradas con el uso de los sistemas de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , es importante notar los altos porcentajes de germinación encontrados al utilizar estos, muchos de los cuales, al aplicar el factor de corrección superan el 100% de germinación luego de aplicar el nitrógeno líquido. Esto da una señal de que este método de crioconservación, a pesar de ser más sencillo, podría tener mayor efectividad que el método de vitrificación.

4.5 Crioconservación de *Sobralia* sp. (Código 03-13)

En el caso de *Sobralia* sp. (código 03-13), al tratarse de semilla recuperada de cápsula abierta, se aplicó un método de desinfección directamente a la semilla, utilizando en este caso el agente NaOCl al 0,5% por espacio de 10 minutos. La acción bactericida de las soluciones de hipoclorito se debe tanto al Ácido Hipocloroso (HOCl) como al ión OCl⁻. La primera forma es probablemente más efectiva que la del ión, ya que la eficiencia desinfectante del cloro es mejor en soluciones de hipoclorito ligeramente ácidas y decrece con el incremento del pH, correspondiente a la conversión del Ácido Hipocloroso en OCl⁻ (Dychdala, 1977). La escogencia de este compuesto para desinfectar el material vegetal se hizo por su fácil disponibilidad en el mercado y por ser económicamente accesible, mismas razones del uso del etanol al 95% utilizado en las desinfecciones de las cápsulas.

Se demostró entonces que la aplicación del protocolo de desinfección con NaOCl, en la concentración y tiempos indicados, permitió eliminar los microorganismos superficiales localizados en las semillas, sin afectar considerablemente la viabilidad de las mismas, siendo esta sumamente alta (93,11%), aunque no se haya determinado esa variación antes y después de aplicar el protocolo de desinfección.

Los tratamientos de crioconservación realizados por medio de la técnica de vitrificación incluyeron una repetición más que los tratamientos realizados en las especies anteriores, lo que le da mayor peso estadístico. El análisis del diseño experimental demostró que, tanto los factores principales por separado, como la interacción doble que se generó entre ellos, fueron estadísticamente significativos. El mejor tratamiento de crioconservación, tomando en cuenta la interacción doble generada, fue en el que se utilizó la solución de carga junto con el PVS2 por 40 minutos (figuras 20 y 21). Nuevamente se demuestra que la exposición al PVS2 por un tiempo prolongado como el de 60 minutos podría ser tóxico en algunos casos, reduciendo la sobrevivencia de las semillas, luego de sumergirlas en nitrógeno líquido.

En el caso de los tratamientos de crioconservación utilizando los sistemas de deshidratación con soluciones saturadas de CaCl₂ *2H₂O y LiCl, se puso a prueba el sistema descrito en la figura 3, caracterizado por tener un cierre más controlado por el sistema de tapa rosca y el diámetro de abertura reducido a 3 cm, asegurando la obtención de una verdadera atmósfera controlada. Se obtuvo que los tratamientos con CaCl₂ *2H₂O y LiCl presentaron diferencia significativa entre sí, siendo el mejor de ellos el que utilizó CaCl₂ *2H₂O como agente de deshidratación (88,67% de germinación sin factor de corrección y 95,23% con factor de corrección). Nuevamente se demuestra que las soluciones saturadas de estos compuestos se perfilan como una opción válida en la crioconservación de semillas de orquídeas, por ser de fácil implementación en comparación con sistemas que aplican la técnica de vitrificación, que aunque sí dan resultados positivos, exponen a las células a sustancias potencialmente tóxicas y que generan estrés celular. En este experimento en particular, no se aplicó el tratamiento testigo, lo cual hubiera demostrado la diferencia en la función de los sistemas, teniendo como variable el tipo de solución.

De hecho, el mejor tratamiento que utilizó CaCl₂ *2H₂O como agente de deshidratación dio como resultado 88,67% de germinación contra un 83,00% de germinación utilizando solución de carga por 20 minutos y PVS2 por 40 minutos, ambos datos sin aplicación del factor de corrección.

4.6 Crioconservación de *Sobralia* sp. (Código 04-13)

La semilla de *Sobralia* sp. (código 04-13) fue desinfectada con NaOCl al igual que la semilla de *Sobralia* sp. (código 03-13), solo que este caso se redujo el periodo de exposición a 8 minutos, obteniéndose resultados satisfactorios. Esto demuestra que, además de que el protocolo es reproducible y repetible, también es flexible e igualmente efectivo, aunque esto depende de factores tales como el grado y tiempo de apertura de la cápsula, la época de colecta, la forma de colecta, entre otros.

La prueba de viabilidad también sufrió una modificación con respecto a lo que se había venido aplicando, pues en este caso tuvo una duración de tan solo 24 horas en incubación, luego de las cuales la semillas estaban lo suficientemente teñidas como para realizar los conteos al microscopio. Esta especie tiene la ventaja de producir semillas lo suficientemente grandes que incluso se pueden apreciar a simple vista; su conteo al microscopio se hace en 4X y son sumamente fáciles de contabilizar. Un tipo de semilla como este es ideal para utilizar como modelo debido a la facilidad con la que se pueden manipular y visualizar. Y en este caso en particular, además poseen un alto porcentaje de viabilidad y muy rápida germinación (4-5 días).

El diseño experimental aplicado en la crioconservación de semillas *Sobralia* sp. (código 04-13) por medio de vitrificación, fue más complejo que los diseños aplicados anteriormente, ya que introdujo el factor nitrógeno líquido en dos niveles (sí y no); esto permitió valorar todas las opciones de tratamientos en los que se aplicó solución de carga y PVS2 sin nitrógeno líquido, a manera de tratamientos testigo, incluyendo el testigo absoluto en la que las semillas pasaron de ser desinfectadas al medio de cultivo directamente. En el análisis estadístico del modelo factorial 4x2x2, se obtuvo que los factores principales PVS2 y Nitrógeno Líquido fueron estadísticamente significativos, mientras que el factor principal Solución de Carga no lo fue. En relación a las interacciones dobles y triples generadas, todas fueron estadísticamente significativas, lo que significa que los factores deben considerarse como un todo en el momento de evaluar un diseño como el planteado. Así, el mejor tratamiento, en términos de un programa de crioconservación (con aplicación de nitrógeno líquido) se logró al aplicar PVS2 por 60 minutos sin la necesidad de una etapa previa con solución de carga (63,33% sin factor de corrección) (figura 25).

El diseño experimental aplicado a la crioconservación de semillas por medio de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl, incluyó, además del factor nitrógeno en sus niveles sí y no, un tratamiento testigo con agua para así comprobar mejor el efecto de los sistemas propuestos. El análisis del diseño arrojó que tanto el factor principal solución deshidratante como el factor nitrógeno líquido, así como su interacción, fueron estadísticamente significativos, siendo el mejor tratamiento, desde el punto de vista de un modelo de crioconservación, el que incluía la deshidratación con LiCl por 24 horas, dando un porcentaje de germinación de 89,33% (sin factor de corrección). Este porcentaje es incluso más alto que su correspondiente sin nitrógeno líquido (82,00%), lo cual corrobora la gran efectividad de estos sistemas. El agente de deshidratación con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ más nitrógeno líquido produjo porcentajes de germinación también altos (en promedio de 79,00%), lo cual también lo ubica como una opción válida en términos de aplicación. Los tratamientos testigo (absoluto y con agua) más nitrógeno líquido, funcionaron perfectamente al producir 0% de germinación, significando esto que el sistema sin ningún agente deshidratante o con agua, no producen la deshidratación necesaria para que las semillas resistan las ultrabajas temperaturas que

genera el nitrógeno líquido. De esta forma, el sistema propuesto en la figura 3 se considera un sistema apto, de bajo costo y accesible para estos propósitos.

Lo anterior se corrobora al ver las diferencias existentes entre los porcentajes de humedad que presentaron las semillas luego de ser deshidratados por 24 horas en estos sistemas. Así, el porcentaje de humedad inicial se estimó en 28,77%. Con la solución saturada de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ más bien aumentó a 30,16%, pero con la de LiCl se redujo a 14,54%, de ahí que produjo mejores porcentajes de germinación luego de sumergirlas en nitrógeno líquido. Los tratamientos testigo absoluto y con agua, aumentaron el porcentaje de humedad de las semillas a 79,56% y 84,66%, respectivamente, valores que no permiten la sobrevivencia de las semillas después del congelamiento. Estos resultados dependen del tiempo de permanencia de las semillas en los sistemas y de su tamaño. Después de 24 horas se obtuvieron esos porcentajes para semillas de *Sobralia* sp, caracterizadas por ser de gran tamaño y por tanto más difíciles de deshidratar.

4.7 Crioconservación de *Lycaste tricolor*

El protocolo de desinfección con NaOCl al 0,5% y la prueba de viabilidad con TTC al 0,6% nuevamente resultaron efectivos, y en este caso para una especie distinta: *Lycaste trocolor*.

El análisis estadístico del modelo factorial 4x2x2 en esta especie demostró que los tres factores principales evaluados (solución de carga, PVS2 y nitrógeno líquido) fueron estadísticamente significativos. De forma contraria, la interacción triple generada no fue significativa, así como tampoco la interacción doble solución de carga*nitrógeno líquido, lo que implica que estos casos no existió una dependencia de su efecto sobre la germinación de las semillas. Por otro lado, las interacciones dobles solución de carga*PVS2 y PVS2* nitrógeno líquido sí resultaron ser significativas, implicando que estos factores sí son dependientes entre sí. Así, cuando interaccionan los factores solución de carga*PVS2 el mejor tratamiento se obtiene cuando se utiliza la primera seguido del PVS2 por 40 minutos. En la interacción PVS2* nitrógeno líquido, el mejor tratamiento se obtiene al utilizar el PVS2 por 60 minutos y el nitrógeno líquido; esta última anotación se hace con base en un modelo de crioconservación en el que se debe de utilizar mandatoriamente nitrógeno líquido, de lo contrario, los porcentajes de germinación más altos se obtienen al no utilizar nitrógeno. Lo anterior demuestra que efectivamente la aplicación de nitrógeno líquido a las semillas causa siempre un daño irreversible en un porcentaje de los explantes tratados que, aunque hayan sido pretratados, no resisten las ultrabajas temperaturas.

En cuanto al diseño experimental aplicado a la crioconservación de semillas por medio de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se obtuvo que, tanto el factor principal solución deshidratante como el factor nitrógeno líquido, así como su interacción, fueron estadísticamente significativos, siendo el mejor tratamiento, desde el punto de vista de un modelo de crioconservación, el que incluía la deshidratación con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 24 horas, dando un porcentaje de germinación de 75,33% (sin factor de corrección). El agente de deshidratación LiCl también obtuvo altos porcentajes de germinación, lo cual vuelve a corroborar que no debe descartarse como elemento de trabajo en un modelo de crioconservación, especialmente porque, de acuerdo con los resultados, puede resultar más exitoso que el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en otras especies. Con respecto a los tratamientos testigo (absoluto y con agua) más nitrógeno líquido, se notó

como el que incluía agua produjo un 0% de germinación debido a la transferencia de humedad hacia las semillas; el tratamiento testigo absoluto, produjo cierto porcentaje de sobrevivencia (27,67% de germinación), lo cual indica que parte de las semillas lograron reducir su porcentaje de humedad mientras se encontraban dentro de este sistema en las 24 horas de incubación. El tamaño tan reducido de las semillas, en comparación con el tamaño de semillas de una especie como *Sobralia* sp., permite que se den estas situaciones.

Lo anterior se corrobora al ver los porcentajes de humedad que alcanzaron las semillas luego de ser deshidratados por 24 horas en estos sistemas. Así por ejemplo, el porcentaje de humedad alcanzado con la solución saturada de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ fue de 6,93% y con LiCl fue de tan solo 3,97%. Es probable que este último porcentaje logrado con LiCl fuera demasiado bajo y que un porcentaje de las semillas murieran por esa razón. En cuanto al tratamiento testigo absoluto, se obtuvo un porcentaje de humedad de 9,09% lo que le permitió a las semillas sobrevivir en cierto porcentaje a las condiciones del nitrógeno líquido. El tratamiento testigo con agua transfirió tanta humedad a las semillas (92,20%) que estas no resistieron el nitrógeno celular por el rompimiento de las células al formarse hielo.

4.8 Crioconservación de *Sobralia* sp. (código 05-13)

El trabajo con una tercera muestra de semillas de *Sobralia* sp, de la misma procedencia, permitió nuevamente validar el protocolo de desinfección con NaOCl al 0,5% y la prueba de viabilidad con TTC al 0,6% con resultaron satisfactorios.

El diseño experimental en este caso tuvo una variación, cual fue la ejecución de tres réplicas completas de los tratamientos. Esto permitió obtener una validez estadística mucho más contundente, pues se puso a prueba el protocolo como tal, seguido para la crioconservación de esta especie. En los análisis anteriores se aplicaron tres repeticiones en los conteos de las semillas, lo cual le daba validez a los resultados de un solo modelo.

De esta forma, el análisis estadístico del modelo factorial 4x2x2 en esta especie demostró que los tres factores principales evaluados (solución de carga, PVS2 y nitrógeno líquido) fueron estadísticamente significativos, así como todas las interacciones dobles. La interacción triple no fue estadísticamente significativa, por lo que en el análisis fue retirada del modelo.

Tomando en cuenta las interacciones dobles, los mejores tratamientos se obtienen cuando se combina la solución de carga por 20 minutos seguido de la aplicación de PVS2 por 40 minutos, y la aplicación de nitrógeno líquido, siempre considerando que esta aseveración está basada en que, para efectos del objetivo de un programa de conservación, debe existir la presencia de nitrógeno líquido. Porcentajes de germinación mayores en ausencia de nitrógeno nuevamente vuelven a demostrar que existe siempre una parte de las semillas, que aunque hayan sido pretratadas con soluciones vitrificadoras, no resisten el congelamiento.

En relación al diseño experimental aplicado a la crioconservación de semillas por medio de deshidratación con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl, se obtuvo que, tanto el factor principal solución deshidratante como el factor nitrógeno líquido, así como su interacción, fueron estadísticamente significativos, siendo el mejor tratamiento, desde el

punto de vista de un modelo de crioconservación, el que incluía la deshidratación con LiCl por 24 horas, dando un porcentaje de germinación de 92,67% (sin factor de corrección), aunque el tratamiento con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ produjo esencialmente el mismo resultado (92,45% de germinación). Los tratamientos testigo (absoluto y con agua) más nitrógeno líquido, nuevamente vuelven a demostrar su efectividad al producir porcentajes de germinación prácticamente nulos, corroborándose que el tamaño de la semilla es un posible factor que contribuye a esta respuesta.

El porcentaje de humedad que alcanzaron las semillas luego de ser deshidratados por 24 horas en estos sistemas corroboran de alguna forma lo anterior, ya que en el caso de la solución saturada de LiCl se obtuvo un porcentaje de germinación promedio de 3,97% y con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ fue muy similar (4,84%). En el caso del tratamiento testigo absoluto, se obtuvo un porcentaje de humedad de 10,89% y en el tratamiento testigo con agua el porcentaje fue de 40,01%, ambos innecesarios en este caso para lograr altos porcentajes de sobrevivencia.

4.9 Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de *Maxillaria* sp.

La obtención de semillas de *Maxillaria* sp., permitió desarrollar una variación en el protocolo de desinfección de cápsulas cerradas. Debido al pequeño tamaño de los frutos de este género, una desinfección utilizando etanol de 95% y calor por medio de flameado, hubiera desinfectado las cápsulas, con el agravante de dañar irremediablemente las semillas en su interior. Por esta razón se recurrió a una fuerte desinfección con NaOCl (al 3% de ingrediente activo) por 15 minutos, lo cual aseguró la eliminación completa de los microorganismos superficiales, sin que la solución penetrara hacia el interior del fruto. Desinfecciones similares pueden ser aplicadas a cápsulas de mayor tamaño, como protocolo alternativo al flameado con etanol.

Los medios de cultivo M&S (1962) y Knudson (1946), al 50% y 100% de sales minerales, demostraron ser eficientes en la obtención de protocormos, aunque no se estableciera un diseño experimental para determinar el mejor de ellos.

En relación con los tratamientos de crioconservación utilizando la técnica de vitrificación, el cultivo de los protocormos en un medio semisólido de precultivo con altas concentraciones de sacarosa, tuvo como objetivo inducir tolerancia a la deshidratación que vendría posteriormente con las soluciones de PVS2. Sakai (2000) se refiere a este aspecto indicando que las células y meristemos aislados son usualmente precultivados por uno o dos días en un medio enriquecido con sacarosa o sorbitol para inducir tolerancia a la deshidratación. En el caso de los protocormos de *Maxillaria* sp. se cultivaron por un espacio de siete días debido al mayor tamaño que estos presentan en comparación con estructuras como células o meristemos. La aplicación de PVS2 por diferentes y la inmersión en nitrógeno líquido completaron el experimento sin resultados satisfactorios.

El precultivo de los protocormos en medios con concentraciones altas de sacarosa y la posterior aplicación de PVS2, no fueron suficientes para que la estructura protocórmica resistiera las ultrabajas temperaturas. Es probable que la estructura esférica de los protocormos y el tamaño en el que se utilizaron, no permitieran que un protocolo de crioconservación como el utilizado fuera exitoso en este caso.

De igual forma, el precultivo de los protocormos en una solución con alta concentración de sacarosa (0,3M) durante 4 horas, previo a la aplicación de PVS2, no fue suficiente para que estas estructuras de *Maxillaria* sp. resistieran el congelamiento.

4.10 Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de *Prostechea ochracea*.

La obtención de semillas de cápsulas cerradas de *Prostechea ochracea* permitió validar la efectividad del protocolo de desinfección de estas estructuras mediante la aplicación de NaOCl a altas concentraciones (3% por 15 minutos).

La germinación de esta especie fue posible obtenerla tanto en los medios M&S (1962) como en los medios Knudson (1946), al 50% y 100% de sales minerales. Aunque no se realizó un diseño experimental para determinar cuantitativamente el mejor medio, sí fue posible hacerlo de forma cualitativa, siendo el medio M&S (1962) completo el más adecuado. Se procedió de esta forma, pues el objetivo era la obtención de protocormos.

Los tratamientos de crioconservación, haciendo uso de la técnica de vitrificación, se ejecutó con la aplicación de PVS2 durante diferentes periodos de exposición, en ninguno de los cuales se obtuvo sobrevivencia luego de la inmersión en nitrógeno líquido. En este caso, al igual que lo expuesto para el caso de los protocormos de *Maxillaria* sp., el tamaño y la estructura esférica de estos explantes constituyen una limitante para la implementación de esta técnica.

La utilización de protocormos en etapas más tempranas, en los que su tamaño es más reducido, podría producir un mejor resultado en términos de recuperación luego de congelar con nitrógeno líquido; sin embargo, la utilización de estructuras más pequeñas, que se obtendrían poco después de la germinación, conlleva a decidir el manejo de semillas sin germinar, cuyo éxito y efectividad ya fueron ampliamente demostradas con las pruebas anteriores.

4.11 Cultivo de semillas y crioconservación de protocormos de *Oncidium* sp.

La aplicación de una combinación más compleja de pretratamientos relacionados con la técnica de vitrificación en protocormos de una especie distinta (*Oncidium* sp.), corroboró que, aspectos relacionados probablemente con el tamaño y la estructura esférica de los protocormos, evita que la técnica sea efectiva y que las células de estas estructuras resistan el congelamiento a -196°C. En esta caso particular, se utilizó el precultivo por 24 horas en medio con alta concentración de sacarosa, seguido de la aplicación de solución de carga (tal y como se hizo con las semillas), seguido de la aplicación e PVS2. En ninguna de las combinaciones evaluadas y en las que se aplicó nitrógeno líquido, se obtuvo sobrevivencia.

Estas pruebas incluyeron algunos tratamientos testigo en los que los protocormos no se sumergieron en nitrógeno líquido, e incluso en estos casos la sobrevivencia, aunque se dio en cierto porcentaje, fue muy baja. Así por ejemplo, cuando se aplicó PVS2 por 40 minutos, la sobrevivencia fue de 27,27% y cuando se aplicó por 60 minutos, se redujo a tan solo 12,5%. Esto demuestra que la manipulación de estas estructuras y la aplicación de agentes de crioprotección como medios con altas concentraciones de sacarosa,

solución de carga y PVS2, lejos de causar una protección de estas estructuras, les causa un perjuicio que se ve potenciado con la aplicación final del nitrógeno líquido.

En relación con el experimento exploratorio en el que protocormos de *Oncidium* sp fueron expuestos por tres o siete días a deshidratarse con soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se obtuvo que, deben establecerse mecanismos de deshidratación que aseguren la sobrevivencia de estas estructuras antes de iniciar cualquier iniciativa de crioconservación. Con estos resultados incipientes (Cuadro 34) se demostró que la deshidratación con soluciones saturadas podría provocar daños en los protocormos que le causan la muerte, antes de aplicar nitrógeno líquido y que también, esta sobrevivencia depende de los medios de cultivo de recuperación. Así, medios más complejos o adaptados a la especie en particular son fundamentales para la recuperación de material deshidratado y crioconservado; por ejemplo, los protocormos deshidratados por tres días con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no sobrevivieron al cultivarse en un medio M&S (1962) básico mientras que todos sobrevivieron en un medio más complejo que incluía reguladores de crecimiento y otros suplementos nutritivos. Lo mismo sucedió con los protocormos deshidratados con LiCl . Otro aspecto que se desprende de este experimento es que la deshidratación por siete días pareciera ser excesiva, puesto que la sobrevivencia decayó marcadamente al utilizar ese periodo de tiempo.

4.12 Cultivo de protocormos de *Brassia verrucosa*

En cuanto al experimento que tuvo como finalidad determinar la reducción de humedad que provocan las soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl en los protocormos de *Brassia verrucosa*, se obtuvo, mediante el análisis estadístico aplicado (ANOVA de dos vías, con un 95% de confianza), que el factor Tiempo no es estadísticamente significativo, mientras que la solución deshidratante sí lo es. El mayor porcentaje de reducción de humedad sobre los protocormos de esta especie se obtuvo con la solución saturada de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, seguido de la solución saturada de LiCl . El tratamiento testigo logró reducir la humedad en menor medida que los otros agentes de deshidratación y finalmente el tratamiento testigo con agua fue el que provocó la menor deshidratación. Esto demuestra nuevamente el funcionamiento de los sistemas de deshidratación empleados y de la función de las soluciones saturadas. De igual forma, es importante recalcar que al ser el tiempo un factor no significativo, esto implica que tal respuesta (deshidratación), en este caso, no dependió de este factor y que la mayor pérdida de humedad se dio en las primeras 24 horas, implicando al mismo tiempo que no vale la pena colocarlos por más de ese periodo en los sistemas mencionados.

4.13 Crioconservación de ápices de *Trichocentrum cebolleta*

Debido a las limitaciones que conllevó el uso de protocormos para establecer un modelo de crioconservación por medio de la técnica de vitrificación y deshidratación son soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , se recurrió al uso de ápices meristemáticos que poseen la ventaja de ser estructuras más pequeñas y que suponen una mayor facilidad para que los agentes de crioprotección logren su

cometido. A pesar de esta ventaja, la extracción de ápices meristemáticos constituyó una tarea técnicamente demandante y los explantes obtenidos fueron susceptibles a daños mecánicos y deshidratación.

La técnica de extracción de ápices fue establecida exitosamente para esta especie en particular, obteniéndose sobrevivencia y desarrollo de los mismos, en un medio base M&S (1962) con reguladores de crecimiento (combinación de la auxina ANA con la citocinina BA a concentración de 0,5 mg/l). Esto permitió avanzar hasta la fase de exploración de un sistema de crioconservación utilizando solución de carga y PVS2, precedido por un precultivo de 16 horas en medio con alta concentración de sacarosa para inducir a los explantes a adquirir una mayor tolerancia a los agentes crioprotectores como el PVS2.

Una vez que se estableció el diseño experimental, el análisis de este arrojó que los factores solución de carga y el PVS2 no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$) y que solamente el factor Nitrógeno Líquido resultó serlo. Esto conlleva a que los resultados obtenidos no tengan un significado de peso para tomar decisiones en cuanto a un sistema de crioconservación de estas estructuras ya que, precisamente esos constituyen los factores de mayor interés, especialmente el PVS2. Solamente el factor nitrógeno líquido resultó ser estadísticamente significativo, lo cual era de esperar por cuanto la diferencia entre utilizarlo y no utilizarlo es marcada en los resultados. El número de ápices utilizados en cada tratamiento y el hecho de no haber realizado réplicas, representan una limitante para poder analizar este diseño.

A pesar de lo anterior, es importante recalcar que los resultados de sobrevivencia en los tratamientos en los que se utilizó solución de carga y PVS2 por 15 y 20 minutos más nitrógeno líquido, así como el tratamiento que utilizó solamente PVS2 por 20 minutos más nitrógeno líquido, constituyen los primeros resultados en los que, explantes diferentes a semillas, sobreviven a tratamientos que incluyen congelamiento a -196°C . Esto representa una posibilidad para iniciar estudios en el establecimiento de un sistema de crioconservación utilizando explantes de tipo vegetativo.

5. Conclusiones

- La obtención de semillas estériles de orquídea, a partir de cápsulas cerradas, se logró estableciendo un protocolo en el cual se realizó un lavado inicial con agua y detergente antibacterial, seguido de una inmersión de la cápsula en etanol al 95% por alrededor de 5 minutos y su posterior flameado por una o dos ocasiones. Este protocolo se aplica para cápsulas medianas y grandes.
- La desinfección de cápsulas pequeñas se logró por medio de un protocolo de desinfección que incluyó un lavado inicial con agua y detergente, seguido de una inmersión en NaOCl al 3% i.a. por alrededor de 10-15 minutos, seguido de tres lavados con agua destilada estéril.
- Para la desinfección de semillas provenientes de cápsulas abiertas, se estableció un protocolo en el que las semillas se sumergieron en una solución de NaOCl al 0,5% i.a., más Tween 20, por espacio de 8-10 minutos, seguido de la aplicación de agua estéril sobre un papel filtro donde se recuperaron las semillas.
- El método para determinación de viabilidad de semillas establecido por Stempenkus y Lampheor (1967), en el que se aplica Cloruro de Trifenil Tetrazolio (TTC) al 0,6% junto con compuestos amortiguadores de pH, resultó ser efectivo para las especies de orquídeas utilizadas (*Guarianthe skinneri*, *Sobralia* sp., *Warscewiczella discolor*, *Lycaste tricolor*, *Epidendrum* sp.) y se perfila como un método que puede utilizarse en términos generales para las especies de la familia Orchidaceae.
- La prueba de TTC es una herramienta que da un panorama general del estado de la viabilidad de la semilla, más no es infalible y no brinda la respuesta final a todo lo que representa el análisis. La precisión de los resultados depende de la capacidad del analista que los interpreta, donde se pueden cometer errores de interpretación. Adicionalmente la prueba de TTC revela los porcentajes de germinación basándose solamente en las condiciones internas de la semilla, pero no revela el comportamiento combinado de la calidad de las semillas y de las condiciones en las que se pongan a germinar.
- La metodología de crionconservación aplicando la técnica de vitrificación por medio de la utilización de PVS2 se vislumbra como una herramienta efectiva para conservación de semillas de especies de orquídeas mesoamericanas. Esta metodología puede combinarse con la aplicación de una solución de carga previo a la aplicación de PVS2, que en algunos casos, favorece la respuesta de sobrevivencia, expresada como porcentaje de sobrevivencia.
- El esquema general del protocolo de crionconservación para semillas de orquídeas mesoamericanas, utilizando la técnica de vitrificación, incluye la aplicación inicial de solución de carga por 20 minutos, seguido de la inmersión en PVS2 (por 40 o 60 minutos, dependiendo de la especie) para luego introducir en nitrógeno líquido. El descongelamiento se logra por medio de Baño María a 40°C por 60-90 segundos, seguido de al menos tres lavados con solución de lavado, cada uno con una duración

de 3-5 minutos. La solución de carga puede omitirse en algunas especies y en otras puede favorecer la sobrevivencia.

- La aplicación del factor de corrección en los porcentajes de germinación, en donde se elimina del porcentaje de germinación el porcentaje de semillas no viables, demuestra que la prueba de viabilidad tan solo es un referente inicial de la viabilidad de la semilla, puesto que al aplicar dicho factor, se dieron casos de porcentajes de germinación superiores al 100%.
- Las semillas de una misma especie, pero de procedencia o condiciones de cultivo distintas, podrían presentar respuesta diferenciales a un mismo protocolo de crioconservación.
- El medio semisólido M&S (1962) al 100% de sales suplementado con Vitaminas M&S, 3% de sacarosa y ajustado a un pH de 5,5 representa un medio apto para obtener germinación en las especies *Epidendrum* sp., *Guarianthe skinneri*, *Lycaste tricolor*, *Sobralia* sp., *Protechea ochraecea*, *Maxillaria* sp. y *Oncidium* sp.
- El protocolo de crioconservación de semillas de orquídeas utilizando soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl , consiste en exponer a estas estructuras en un sistema cerrado con una atmósfera controlada de baja humedad provocado por dichas soluciones, por un periodo cercano a las 24 horas, luego de lo cual son congeladas en nitrógeno líquido. El descongelamiento rápido se logra por medio de Baño María a 40°C por 60 segundos y posteriormente se inoculan en medio de germinación.
- Las soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl representan una excelente alternativa de deshidratación de semillas de orquídeas mesoamericanas, previo a la inmersión en nitrógeno líquido, ya que incluyen una metodología fácil de seguir, accesible, rápida de ejecutar y de bajo costo.
- Los porcentajes de sobrevivencia de semillas de orquídeas mesoamericanas, luego de la crioconservación, utilizando la metodología de deshidratación con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl fueron, en términos generales, mayores que los porcentajes de sobrevivencia obtenidos con el método de vitrificación. Aunque ambas metodologías resultaron efectivas para la crioconservación de semillas, el uso de soluciones saturadas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LiCl representan una serie de ventajas técnicas sobre el método de vitrificación.
- La técnica de vitrificación y crioconservación utilizados en protocormos de 1-2 mm de diámetro, no resultaron efectivas para las especies *Maxillaria* sp. y *Protechea ochraecea*. Los pretratamientos con medios y soluciones de precultivo con altas concentraciones de sacarosa, el uso de solución de carga y PVS2 no fueron suficientes para proteger a estos explantes de las condiciones del nitrógeno líquido.
- Los protocormos de 1-2 mm de diámetro no constituyen explantes aptos para establecer una metodología de crioconservación. El tamaño y su estructura esférica limitan el efecto de los agentes crioprotectores, evitando su sobrevivencia luego de la aplicación de nitrógeno líquido.

- Los ápices meristemáticos obtenidos de plantas *in vitro*, como explantes para establecer una metodología de crioconservación, poseen la ventaja sobre los protocormos de ser estructuras más pequeñas y que suponen una mayor facilidad para que los agentes de crioprotección logren su cometido. A pesar de esta ventaja, la extracción de ápices meristemáticos constituyó una tarea técnicamente demandante y los explantes obtenidos fueron susceptibles a daños mecánicos y deshidratación.

- A pesar de que los resultados de crioconservación de ápices de *Trichocentrum cebolleta*, utilizando la técnica de vitrificación, no fueron estadísticamente significativos, sí se dio sobrevivencia en algunos de los casos en los que se utilizó PVS2 solo o combinado con la aplicación de previa de una solución de carga, representando esto una posibilidad de establecer efectivamente una metodología de crioconservación para explantes vegetativos de orquídeas mesoamericanas.

6. Recomendaciones

- Validar los protocolos de crioconservación establecidos con más especies mesoamericanas, de las cuales se disponga de una buena cantidad de semillas para poder establecer los diseños experimentales con al menos tres réplicas.

- Realizar ensayos con protocormos que posean algunos días de formación, para evitar la limitante del tamaño y la relación superficie-volumen que poseen los protocormos más desarrollados. Esto permitirá que los agentes crioprotectores logren abarcar toda la estructura y se aumenten las probabilidades de sobrevivencia, luego de la inmersión en nitrógeno líquido.

- Realizar más ensayos de crioconservación por medio de la técnica de vitrificación, con ápices meristemáticos y meristemas apicales que contengan un mayor número de muestras y réplicas para poder validar estadísticamente los resultados.

- Aplicar siempre un tratamiento de desinfección superficial a las semillas, independientemente si se han obtenido de cápsulas abiertas o cerradas. Esto para que, cada vez que se aplique un tratamiento de crioconservación, las semillas estén en un mismo estado de hidratación. Asimismo, debe realizarse una prueba de viabilidad a cada una de las muestras de semilla que se desinfectan para conocer su estado inicial.

- Continuar aplicando en nuevas especies los protocolos desarrollados, con el objetivo de contar con información que pueda ser sujeta de publicaciones.

7. Agradecimientos

Un agradecimiento muy especial a los estudiantes Jazmín Meza Torres y Gerald Ruiz Sánchez quienes estuvieron nombrados oficialmente como asistentes del proyecto durante los dos años de ejecución.

A la estudiante Nicole Duarte quien trabajó durante algunos meses como asistente *ad honorem*

Al señor Johssef Coto quien también laboró en algunas ocasiones en actividades técnicas del proyecto.

Al señor M.Sc. Jorge Warner, Director del Jardín Botánico Lankester, por su apoyo, participación y guía durante el proyecto

8. Referencias

Abdelnour, A. 1999. Crioconservación de plantas, estado actual de la investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 23 (2):205-214

Abdelnour, A. y Muñoz, A. 1997. Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro* de germoplasma de orquídeas en vías de extinción. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación y Extensión. 35p.

Alvarado, C. 2000. Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* por cultivo de ápices. Práctica de Especialidad. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 81 p

Craviotto, R., Perearnau, A. y Gallo, C. 2011. Novedades de la prueba de viabilidad por Tetrazolio en soja. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. En. <http://inta.gob.ar/documentos/prueba-de-viabilidad-por-tetrazolio-en-soja/>. Consultado el 15 de marzo de 2013.

Dychdala, G.R. 1977. Disinfection, Sterilisation and Preservation. In: Block ss (ed). Philadelphia, United States of America. Lea and Sebigier. pp 167-195.

Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En: Engelmann, F. y Takagi, H. (ed). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Roma, Italia. International Plant Genetic resources Institute. pp 8-20.

Hirano, T., T. Godo, M. Mii and K. Ishikawa. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Rep.*, 23:534-539.

Johari, N.; Keng, C; Rathinam, X.; Sinniah, U y Subramaniam, S. 2009. Cryopreservation of *Brassia rex* orchid shoots using PVS2 technique. *Research Journal of Botany*. 4(3):74-88.

- Kiu Hwa, T.; Rathinam, X.; Lai Ken, C. y Subramaniam, S. 2009. An assessment of early factor influencing the PVS2 vitrification method using protocorm-like bodies of *Dendrobium Sonia* 28. American –Euroasian Journal of Sustainable Agriculture. 3(3): 280-289.
- Kuan, C. y González, L. 1993. Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas. San José, Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje. pp 1-16, 47-53, 75-76.
- Lauzer, D; St-Arnaud, M. y Barabé, D. 1994. Tetrazolium staining and *in vitro* germination of mature seeds of *Cyperidium acaule* (Orchidaceae). Lindleyana. 9(3): 197-204.
- McKendrick, S. 2000. Manual para la germinación in vitro de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. En: [http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).doc](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).doc). Consultado el 23 de abril de 2010.
- Mora-Retana, D. y García, J. 1992. Lista actualizada de las orquídeas de Costa Rica (Orchidaceae). En: Brenesia. (37). Ed. Por Departamento de Historia Nacional, Museo Nacional de Costa Rica. pp 79-124.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15:473-497.
- Ossenbach, C., Arce, J. y Warner, J. 2007. Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma. Tierra Tropical. 3 (1): 47-59.
- Safrinah, R; Xavier, R.; Uma Rani, S y Sreeramanan, S. 2009. Optimisation of cryopreservation technique Golden Nugget Orchid usin PVS2 vitrification. International Journal of Agricultural Research. 4(7): 218-227.
- Sakai, A. 2000. Development of cryopreservation techniques. En: Engelmann, F. y Takagi, H. (ed). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Roma, Italia. International Plant Genetic resources Institute. pp 1-7
- Schafer-Menhur, A. 1995. Refinement of cryopreservation techniques for potato. IPGRI Project Report. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, 47p.
- Seaton, P. y Ramsay, M. 2005. Growing orchids from seed. United Kingdom. Royal Botanic Garden, Kew. 83p.
- Thammasiri, K. y Soamkul, L. 2007. Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl. seeds by vitrification. Science Asia (33): 223-227.
- Thammasiri, K., 2005. Conservation and sustainable development of orchids in Thailand. Proceedings of the 17th World Orchid Conference on Sustaining Orchids for the Future, (WOCOSOF'05), Malaysia, pp: 211-220.

- Villalobos, V; Engelmann, F. 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 11:375-382.
- Yin, M. y Hong, S. 2009. Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocrom-like bodies by encapsulation-vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 98(2) 179-185.