

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del Problema

En el Ecuador se han registrado 148 familias y 744 géneros de plantas vasculares que incluyen especies endémicas, representando el 58,3% de todas las familias y el 35% de todos los géneros nativos del país. El Ecuador posee 22 géneros endémicos, de los cuales 8 pertenecen a la familia Orquidaceae (Valencia, Pitman, León-Yáñez & Jorgensen, 2000).

La familia orquidaceae junto a otras 8 familias posee el más alto endemismo en el país junto a los helechos y representan casi el 70% de todas las especies endémicas del país (Fig. 1.1) (Valencia *et al.*, 2000).

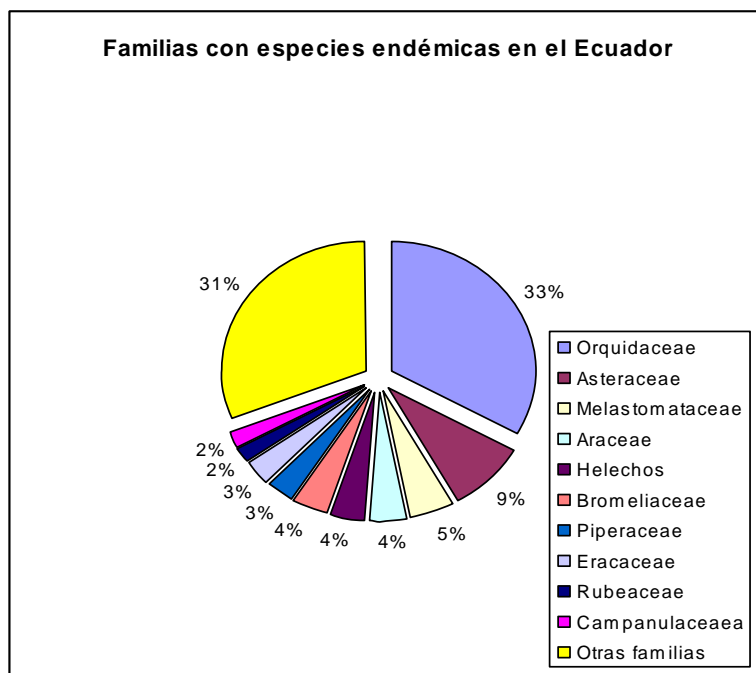


Figura 1.1 Porcentaje de distribución de las familias con especies vegetales endémicas en el Ecuador (Valencia *et al.*, 2000).

El Ecuador posee probablemente la mayor diversidad de orquídeas a nivel mundial, debido principalmente a que nuestro país cuenta con una

extensa variedad de microclimas que circunscriben especies en áreas muy restringidas, con características peculiares y muy específicas (Meisel & Woodward, 2005).

En el Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador en donde se incluyen a las orquídeas, la evaluación del estado de conservación de cada especie representa una hipótesis basada en información disponible hasta el momento en relación a su distribución, abundancia y estado poblacional. Continuamente se registra nueva información, pero la mayoría de especies descritas requerirán de actualización, por tal motivo no se puede predecir que especies cambiarán dramáticamente y cuales permanecerán en igual estado. Razón por la cual la conservación de especies vegetales en el Ecuador es muy incierta y relativa (Valencia *et al.*, 2000).

Actualmente en el Ecuador, la familia Orchidaceae se encuentra amenazada y con numerosas especies en peligro de extinción, principalmente debido a dos factores: a) la depredación selectiva de especies por parte de colectores comerciales, la cual es influenciada por la exportación y la comercialización que deriva en extinciones a nivel local; y b) la destrucción masiva de hábitats, producto de la invasión intensiva de tierras debido a la extracción de madera, el pastoreo, quema, tala de bosques, proyectos hidroeléctricos, extracción minera y a la agricultura migratoria, que deforestan unas 300000 hectáreas por año, exterminando flora y fauna nativa inclusive en áreas protegidas.

Estos factores han producido una pérdida catastrófica de germoplasma y de un patrimonio de incalculable valor científico, ya que muchas especies son aún desconocidas para la botánica (Linington & Pritchard, 2001).

## 1.2 Justificación del Problema

Las orquídeas constituyen una de las familias de plantas de mayor demanda entre las ornamentales. La explotación irracional a la que han sido sometidas unido a las exigencias medio ambientales para su reproducción y desarrollo natural, han contribuido a que muchas especies se encuentren amenazadas o en peligro de extinción. El uso de técnicas de cultivo *in vitro* es una alternativa viable para su conservación, desarrollo y fortalecimiento de las iniciativas de conservación *ex situ* (Rodríguez *et al.*, 2005; Linington & Pritchard, 2001).

El 82,5% de las especies de la familia Orquidaceae en el Ecuador se encuentran amenazadas, 35 se encuentran en peligro crítico, 132 en peligro, 920 son vulnerables, 123 están casi amenazadas, 33 tienen preocupación menor y de 62 no se tienen datos suficientes. Lamentablemente el 86,9% de las especies están fuera del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) debido a la falta de exploración por el difícil acceso o a la falta de condiciones apropiadas para la investigación. Lo que contrasta con las reservas y bosques privados que tienen una mayor investigación y registro de las orquídeas del país (Valencia, 2000).

Teniendo en cuenta la importancia que desde el punto de vista ecológico, económico y social revisten las orquídeas, se debe plantear una conservación efectiva y eficiente tanto *in situ* como *ex situ*. La conservación *ex situ* aseguraría la variabilidad genética de las especies en el tiempo en bancos de germoplasma. La conservación *in situ*, permitiría la evolución y la coevolución natural de las especies en sus hábitats naturales. La integración de los sistemas de conservación en los planes de desarrollo sustentable y en las estrategias globales de preservación, permitirán garantizar la conservación de la biodiversidad y su aprovechamiento sostenible al otorgar nuevas alternativas para el desarrollo (Rodríguez *et al.*, 2005).

Por las razones mencionadas anteriormente es necesario establecer alternativas para la conservación de orquídeas desarrollando y fortaleciendo las iniciativas de conservación *ex situ*. El uso de la técnica de encapsulación-deshidratación para la crioconservación en nitrógeno líquido representa un método fácil, seguro y de baja relación costo-beneficio, que puede ser aplicado en preservar gran parte o toda la diversidad genética intra e ínterespecífica por largos períodos de tiempo sin intervención alguna (Linnington & Pritchard 2001).

Debido a los diferentes requisitos que solicita el Ministerio del Ambiente del Ecuador para trabajar con especies vegetales en peligro de extinción sumado a la difícil localización de estas especies tanto en áreas protegidas como en áreas no protegidas, es necesario estandarizar y optimizar técnicas de conservación en especies silvestres que no se encuentren en la lista de especímenes en peligro de extinción como el caso de la orquídea *Oncidium stenotis*, para que con los resultados obtenidos junto con las técnicas que se desarrollen se creen sistemas globales de conservación de orquídeas nativas del Ecuador en peligro de extinción.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Crioconservar protocormos de *Oncidium stenotis* utilizando la técnica de encapsulación-deshidratación.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Aplicar la técnica de encapsulación-deshidratación en protocormos de *Oncidium stenotis*.
- Congelar las cápsulas deshidratadas, que contiene protocormos, directamente en nitrógeno líquido (- 196 °C).

- Recuperar los protocormos luego de una hora de congelamiento.
- Identificar el medio de cultivo adecuado para el periodo post-congelamiento, que permita la recuperación normal de su desarrollo.
- Identificar sobrevivencia de los protocormos usando técnicas de tinción con tetrazolio.
- Realizar determinaciones analíticas de pérdida de electrolitos, el contenido de los productos de peroxidación lipídica y el contenido de proteínas en las membranas celulares para comprobar daños en las membranas celulares de los protocormos en los períodos de post-congelamiento.

## **1.4 Marco teórico**

### **1.4.1 Características generales de la familia Orquidaceae**

Las orquídeas son consideradas como la familia más grande entre las monocotiledóneas, con más de 900 géneros y alrededor de 30000 especies. Son cosmopolitas ya que tienen representantes en todo el mundo, desde la Siberia hasta la Tierra del Fuego, a excepción de las regiones polares, desiertos extremos y lugares con alturas superiores a los 4500 m.s.n.m. Sin embargo, son más abundantes en regiones tropicales y subtropicales a aproximadamente 20 grados de latitud norte y sur del Ecuador (Dodson & Marmol, 1989).

Se puede separar a las orquídeas en dos grandes grupos de acuerdo a su hábito de crecimiento: epífitas y terrestres. Más de la mitad son epífitas mientras que algunas están adaptadas a vivir sobre rocas y tierra, y otras son saprófitas (Bennett, 1992).

Las orquídeas terrestres tienen tubérculos radicales que se renuevan anualmente a partir de la axila de una escama (hoja) radical, y a partir de éstos

se generan las yemas del año siguiente; más tarde el brote crece dando un tallo aéreo con hojas alternas, sésiles con el limbo de nervadura paralela, que produce una inflorescencia más o menos abundante (Díaz, 2003).

Las orquídeas epífitas, largamente difundidas en los trópicos tienen un tallo con hojas aisladas o reducidas a escamas y muchas raíces aéreas colgantes recubiertas por el velamen que es un tejido esponjoso, blanco cremoso el cual cumple la función de captación y retención de humedad y cuyo ápice verde realiza la fotosíntesis. Este tipo de orquídeas viven fijadas sobre las partes altas de los árboles de los bosques como estrategia para alcanzar el máximo de luz, razón por la cual se las denominan erróneamente parásitas. Las orquídeas trepadoras tienen raíces hipogeas pero tallos aéreos que se adhieren a diversos sustratos gracias a las raíces aéreas (Bennett, 1992).

En las zonas tropicales la mayoría de las orquídeas son epífitas y de flores muy vistosas, mientras que las de zonas templadas son terrestres y de flores poco atractivas. En general la familia Orquidaceae presenta una gran diversidad de flores en color, forma, tamaño y olor con el único fin de atraer a los polinizadores, que en su mayoría son insectos y que en muchos casos son específicos para determinadas especies (Díaz, 2003).

Las flores forman inflorescencias en espiga, racimo o panícula, que se sitúan en la zona terminal del tallo en las orquídeas terrestres y en las axilas en las epífitas. La flor, colocada en la axila de una bráctea, durante el desarrollo rota 180° (resupinación) por lo cual la parte posterior se sitúa en la anterior. La disposición de los pétalos de una flor de orquídea: sépalos - labelo, se observa en la figura 1.2.



Figura 1.2 Estructura de una flor de orquídea: pétalos (P), sépalos (S), labelo (L) (Watson y Dallwitz, 2007).

En la gran mayoría de los géneros, las flores están formadas por tres elementos externos llamados sépalos, dos laterales y uno dorsal y tres elementos internos llamados pétalos que se encuentran separados y a veces punteados o variadamente coloreados. El pétalo inferior está modificado en un labio o "labelo" de tamaño mayor a menudo es trilobulado o de una forma inusual y con crestas carnosas o un espolón basal, y muchas veces con un patrón de colores diferente que los demás. A veces las piezas se encuentran separadas o conadas en la base y son interpretados como seis pétalos en dos verticilos en lugar de tres sépalos y tres pétalos, (Simpson, 2005; Judd *et al.*, 2007).

El fruto es una cápsula con tres o seis hendiduras, que contiene las semillas, las cuales son muy pequeñas y su producción es por millones en cada una. A diferencia de la mayoría de las plantas con flores, las semillas de las orquídeas carecen de tejido nutritivo que sirve para el desarrollo del embrión, el cual se denomina endospermo. Para que ocurra una germinación exitosa, la semilla debe llegar al sustrato en un hábitat adecuado y entrar en contacto con un hongo, relación conocida como micorriza. En ese momento

comienza a desarrollarse entre el hongo y la plántula de la orquídea una relación simbiótica mutualista, en el sentido de que la orquídea recibe los carbohidratos necesarios para su desarrollo y el hongo recibe vitaminas y otras sustancias. Una vez que la plántula está suficientemente grande y es capaz de fotosintetizar y satisfacer sus propios requisitos energéticos, la asociación con el hongo deja de ser necesaria, pero frecuentemente permanece la relación. Esta es la razón por la cual es tan difícil que germinen las semillas sin recurrir al uso de técnicas estériles de cultivo *in vitro*. Con frecuencia el tiempo que transcurre entre la germinación de la semilla y la maduración de la planta es de varios años, pero en algunas especies el ciclo de vida puede transcurrir rápidamente (Hodgson y Anderson, 1991).

La polinización ocurre por medio de insectos o aves, de manera altamente específica. El proceso de transferir polen de la antera de una flor al estigma de otra depende de los polinizadores a los cuales les atrae, la forma y las fragancias de la flor y la recompensa para ellos son el néctar, los aceites esenciales o la combinación de estos factores. Se sabe que las moscas, los escarabajos, las abejas, las avispas, los avispones, las hormigas, las mariposas y los colibríes, entre otros, son polinizadores de las orquídeas (Hodgson y Anderson, 1991).

Luego de la polinización, el polen germina y se forma un tubo polínico que crece por el interior de la columna del pistilo hacia el ovario. Esto estimula el desarrollo de los óvulos, que estarán receptivos para el momento en que el tubo polínico llegue a su proximidad. Posteriormente a la fecundación se inicia el desarrollo del embrión que tendrá como resultado el desarrollo de la semilla, el cual inicia una serie de cambios en las paredes del ovario que tendrá como consecuencia el desarrollo de las cápsulas. Para algunas especies el intervalo de tiempo entre la polinización y la dispersión de las semillas puede ser de sólo unas pocas semanas, pero para otras puede durar meses (Hodgson y Anderson, 1991).



Las orquídeas tienden a la hibridación, no sólo entre especies sino también entre géneros distintos. A pesar de esta complejidad, el gran número de formas que constituyen esta familia, evidencia una extremada uniformidad en cuanto a la organización floral, constituyendo un formidable ejemplo de homogeneidad entre las Angiospermas. En estado salvaje las orquídeas rara vez generan híbridos naturales ya que la integridad de las plantas se mantiene principalmente por barreras naturales como la época de floración, la morfología de las flores, efectos visuales y aromáticos para atraer polinizadores y por la incompatibilidad genética entre las especies. Si estas barreras o mecanismos son superados (como en el cultivo que se da en un invernadero), es posible que se generen híbridos con facilidad (Hodgson y Anderson, 1991).

#### **1.4.2 Descripción Botánica del Género *Oncidium***

El género *Oncidium* fue descrito por primera vez por Olof Swartz en 1800 por la reclasificación de *Epidendrum altissimum* Jacq. El nombre *oncidium* se debe a la pequeña callosidad que presenta en la base del labio que aparenta ser una hinchazón que en griego significa *Onkos* (Atwood y Mora, 1999).

*Oncidium* es el género también llamado de la “dama danzante” ya que cualquier pequeña brisa mueve sus flores como en una danza frenética. Contiene alrededor de 750 especies de orquídeas de la subfamilia Epidendroideae. Este es un género difícil y complejo en el que muchas especies están reclasificadas, lo que a la larga seguramente conducirá a dividirlo en otros grupos (Atwood y Mora, 1999).

Son principalmente epífitas, algunas terrestres. Las inflorescencias de estas plantas son ramificadas y con flores múltiples. Las especies de *Oncidium* son bastante variadas y las flores muchas veces son muy parecidas. La

mayoría posee pseudobulbos carnosos, con hojas alargadas y delgadas, de 10 a 50 cm de largo, según las especies. Algunas tienen hojas en forma de lápiz, mientras que otro grupo, presentan abanicos enanos de hojas duras y trímeras (Stacy, 1975).

Las flores son comúnmente amarillas, rosadas, blancas y marrones. El tamaño de las flores varía desde 1 cm hasta 10 cm de longitud aproximadamente. Una de las características del género *Oncidium* es el color amarillo con manchas cafés, con varias formas y tamaños, además de las numerosas variaciones en el arreglo de estos colores. De igual forma, existe una gran variación en el número de flores por inflorescencia, en el tamaño de las plantas, y en el hábitat natural de las especies y consecuentemente en las condiciones de cultivo requeridas. El número de flores varía según la especie con varas largas y aunque la flor sea pequeña tienen una floración espectacular de numerosas flores abiertas a un tiempo que se mantiene desde varias semanas a 2 meses. Los pétalos y el sépalo dorsal son más grandes que los sépalos laterales; el labelo siempre va lobulado (Dalström, 2001).

El género *Oncidium* es originario de la América tropical (desde Puerto Rico hasta la Florida) de dimensiones muy variables según la especie. Se desarrollan desde el nivel del mar a las zonas montañosas y en todos los niveles intermedios (Atwood y Mora, 1999).

La distribución de este género en América se extiende desde los EE.UU. hasta Argentina como se puede observar en la Tabla 1.1 (Atwood y Mora, 1999).

Tabla 1.1 Distribución del Género *Oncidium stenotis* en el continente Americano (Atwood y Mora, 1999).

<b>País</b>	<b>Número de especies</b>
Ecuador	130
Perú	55
Panamá	45
México	37
Costa Rica	28
Colombia	27
Brasil	24
Nicaragua	21
Guatemala	19
Honduras	14
Venezuela y El Salvador	12
Bolivia y EEUU	10
Paraguay	8
Belice	4
Surinam, Uruguay, Guyana y República Dominicana	1

Son plantas adaptables que se pueden cultivar fácilmente, la mayoría requieren abundante luz para florecer adecuadamente. Las temperaturas deben ser de intermedias a cálidas, entre 12 °C y 15 °C por la noche y entre 25°C y 30°C durante el día, toleran temperaturas más altas si se mantiene la humedad y una buena circulación de aire (Dodson, 2003).

### 1.4.3 Conservación de Recursos Fitogenéticos

La conservación de los Recursos Fitogenéticos es una disciplina dedicada a la preservación, rescate, manutención, estudio y utilización del patrimonio que representa la biodiversidad. En la conservación se utilizan estrategias a corto, mediano y largo plazo, que pueden realizarse a nivel *in situ* y *ex situ*. Estas dos modalidades son complementarias y permiten garantizar la conservación del patrimonio genético de las especies y sus poblaciones. Las estrategias a seguir deben planificarse de tal modo que se integre con los planes de desarrollo sustentable y de utilización sostenible de los recursos naturales. Esta integración sería la única garantía que permita mantener el objetivo de conservar la biodiversidad a través del tiempo (Squeo, Arancio y Gutiérrez, 2001).

La conservación de una especie debe considerar la genética y dinámica de sus poblaciones, sus aspectos ecológicos, reproductivos, tamaño de las poblaciones y su fisiología. Por ningún motivo, se debe aplicar algún método que implique selección, ni positiva ni negativa. La selección provoca serios efectos que derivan en erosión genética y se modifican los patrones de la estructura genética de las especies. La selección se aplica cuando se procede a la utilización de las especies, jamás cuando el objetivo es sólo la conservación (Falk, 1990; Weir, 1990; Crossa y Vencovsky, 1994; Vilela-Morales *et al.*, 1995).

La erosión genética es la pérdida de genes, que es provocada por selección natural y/o humana (voluntaria e involuntaria, directa e indirecta) y constituye una grave amenaza a las especies y a sus poblaciones. Esta diversidad genética es la sumatoria de todas las combinaciones de genes resultantes de la evolución en las especies. Comprenden desde las especies silvestres con algún uso, actual o potencial, hasta genes clonados (Hidalgo, 1991).

El Ecuador según el libro Rojo, posee 25 especies del género *Oncidium* que se encuentran amenazadas (Valencia, 2000) las cuales se detallan en la tabla 1.2.

Tabla 1.2 Especies de *Oncidium* que se encuentran dentro del libro rojo en el Ecuador (Valencia, 2000).

Especie	Código UICN
<i>O. aequinoctiale</i> Stacy	DD
<i>O. aloisii</i> Schltr	DD
<i>O. alticola</i> Stacy	EN
<i>O. andigenum</i> Linden y Rchb.f.	VU
<i>O. azuayensis</i> Kraenzl	CR
<i>O. chimborazoëense</i> Stacy	CR
<i>O. dayanum</i> (Rchb.f.) Stacy	NT
<i>O. echinops</i> Cogler	EN
<i>O. erosilabium</i> Stacy	DD
<i>O. erucatum</i> Königer	VU
<i>O. estrade</i> Dodson	EN
<i>O. harlingii</i> Stacy	VU
<i>O. hirtzii</i> Dodson	VU
<i>O. kennedyi</i> Stacy	VU
<i>O. lancifolium</i> Lind. Ex Benth	VU
<i>O. luerorum</i> Dodson	SD
<i>O. palaciossi</i> Dodson	SD
<i>O. phalaenopsis</i> Lindl y Rchb.f.	VU
<i>O. riopalenqueanum</i> Dodson	VU
<i>O. rupestre</i> Lindl	EN
<i>O. semele</i> Linden	DD
<i>O. tarquiense</i> Stacy	VU
<i>O. toachicum</i> Dodson	VU
<i>O. trinasutum</i> Kraenzl	VU
<i>O. tungurahense</i> Stacy	VU

Código de UICN: Datos insuficientes (DD), En peligro (EN), Vulnerable (VU), En peligro crítico (CR), Sin datos (SD).

Lo mencionado sugiere que se debe potenciar el desarrollo del conocimiento multidisciplinario de las especies silvestres, basado en la genética, biología de la conservación, la biogeografía, economía, sociología y antropología, entre otras, para determinar los métodos más adecuados para aplicar, según las especies y la dinámica de las comunidades y ecosistemas; así como para la selección de las especies, ecosistemas y/o sitios a conservar, sus prioridades, su extensión y muy importante, su manutención en el tiempo (Cubillos, 1998).

#### **1.4.3.1 Conservación *in situ***

El convenio sobre la Diversidad Biológica (Convenio Ambiental Internacional que el Ecuador suscribió en 1992 y lo ratificó en 1993), define que la conservación *in situ* “es la conservación, mantención y recuperación de poblaciones viables en sistemas dinámicos y evolutivos del hábitat original o, en el caso de especies cultivadas, en el entorno en que hayan desarrollado sus características” (Frankel y Soulé, 1992).

Este método de conservación es la forma más apropiada de conservar una entidad biológica dentro de su ecosistema. En la conservación *in situ* se conservan las relaciones simbióticas entre organismos y se permite la continuación de los procesos evolutivos de las plantas. Este método es adecuado en las especies silvestres debido a que su hábitat es un ecosistema natural en los que no interviene la acción humana. La conservación *in situ* de las especies silvestres implica la adecuada protección y gestión de los ecosistemas en los que habitan (Gómez-Campo, 1997).

La conservación *in situ* de orquídeas en el Ecuador se ha realizado dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas y en reservas privadas como la Reserva Orquideológica El Pahuma, al noroccidente de Quito. Sin embargo,

estas actividades demandan grandes costos laborales de mantenimiento y las orquídeas se ven expuestas a factores adversos como agentes bióticos (plagas, enfermedades), abióticos (condiciones climáticas adversas) y destrucción indiscriminada de su hábitat. A estas adversidades se suma los problemas para la germinación natural de las semillas que poseen las orquídeas, como su tamaño y sus pocas reservas de alimento (McKendrick, 2000; Engelmann, 2004).

#### **1.4.3.2 Conservación *ex situ***

La conservación *ex situ* se define como “la conservación de muestras genéticamente representativas de las especies o cultivos, que se mantienen viables a través del tiempo, fuera de su hábitat natural o lugares de cultivo, en ambientes controlados y con el apoyo de tecnologías adecuadas” y son reconocidas por su papel importante en la conservación de los recursos genéticos del planeta (Frankel y Soulé, 1992). La imposibilidad de declarar y manejar convenientemente como áreas protegidas, todas las superficies de conservación recomendables, junto a los riesgos que persisten en los espacios protegidos a pesar de las medidas y métodos *in situ*, convierten a las técnicas *ex situ* en una importante alternativa que además de complementaria, ofrece la oportunidad de conservar grandes proporciones de la diversidad biológica, en espacios y volúmenes reducidos y permite asegurar una rápida accesibilidad al recurso conservado (Vovides, 1995).

Los sistemas de conservación *ex situ* surgen como una medida complementaria a los mecanismos de conservación *in situ*, orientados principalmente a resguardar el material genético de las especies de importancia ecológica, genética (mejoramiento), industrial, farmacéutica, maderera, entre las principales, permitiendo la conservación de especies vulnerables a procesos de erosión genética. Las técnicas *ex situ* aplicables a los recursos fitogenéticos consisten básicamente en conservar colecciones de especies y

variedades en bancos de germoplasma, bancos de semillas, de polen, de tejidos, colecciones de campo y jardines botánicos (Frankel y Soulé, 1992).

En vista de los problemas ocasionados por la explotación de las orquídeas en el Ecuador es necesario establecer alternativas para su preservación desarrollando y fortaleciendo las iniciativas de conservación *ex situ*. La conservación en bancos de semillas representa un método fácil, seguro y de baja relación costo-beneficio, que puede ser aplicada a un amplio rango de especies de una forma fácil y universal. Se puede conservar gran parte o toda la diversidad genética intra e ínterespecífica por largos períodos de tiempo sin intervención alguna (Linington y Pritchard, 2001).

Sin embargo, la metodología de conservación *ex situ* presenta desventajas que limitan su eficacia, por ejemplo las colecciones de los jardines botánicos demandan grandes costos laborales de mantenimiento y las especies se ven expuestas a factores adversos como agentes bióticos y abióticos. Las colecciones *in vitro* establecidas para algunas especies de propagación vegetativa también son laboriosas y existe siempre el riesgo de perder el material debido a contaminación por hongos y bacterias, errores humanos o variación somaclonal (McKendrick, 2000).

#### **1.4.4 Técnicas de cultivo *in vitro* en la conservación**

El descubrimiento de la totipotencia de las células vegetales y la posibilidad de desarrollar plantas normales y completas a partir de diferentes explantes, ha derivado en diferentes estrategias para la conservación de germoplasma utilizando el cultivo de tejidos. Los primeros estudios sobre el manteniendo *in vitro* de plantas fueron realizado en mandioca y papa (Scocchic y Rey, 2003).



El mantenimiento de los recursos fitogenéticos mediante los métodos de cultivo *in vitro* se logra generando cambios en el ambiente de cultivo que permita desacelerar el crecimiento de las células y los tejidos, con esto se pretende aumentar el periodo de transferencia del cultivo. Este método cubre un amplio espectro de técnicas que implican el cultivo bajo condiciones de asepsia, de órganos o fragmentos de órganos (meristemas, semillas, embriones somáticos, embriones cigóticos, hojas, tallos, raíces, yemas, polen, anteras, callos o protoplastos), en un medio de cultivo artificial definido, bajo condiciones ambientales controladas (Engelmann, 1997).

Esta técnica ha sido utilizada para mantener colecciones en crecimiento mínimo, para lo cual se necesita: reducir la temperatura, reducir las condiciones de luminosidad, modificar el medio de cultivo, adicionar inhibidores osmóticos o retardantes de crecimiento, deshidratadores de tejidos o modificar la fase gaseosa del recipiente de cultivo (Roca, Arias y Chávez, 1991).

La modificación de uno o más de los factores mencionados ha venido siendo utilizada para la conservación de numerosa especies, por ejemplo: conservación de microestacas de *Manihot esculenta*; vástagos de especies de *Fragaria*, *Ipomoea*, *Rubus*, *Musa*, *Saccharum*, *Coffea*, *Dioscorea* y microtubérculos de *Solanum*. Se debe mencionar que todas estas técnicas se realizan a mediano plazo, mediante reducción del metabolismo celular y con ello se reduce el crecimiento y el número de subcultivos durante meses hasta un año, sin afectar la viabilidad de los cultivos (Roca *et al.*, 1991).

Mroginski en 1991, llevó a cabo trabajos de conservación de germoplasma de paraíso gigante (*Melia azedarach*), utilizando como explantes meristemas de clones selectos. Los explantes fueron mantenidos durante 12 meses a tasas de crecimiento reducidas (medios de cultivo subóptimos o empobrecidos y en condiciones de oscuridad), y luego fueron regenerados con

el éxito al pasar a campo. Se optimizó además metodologías de conservación *in vitro* a largo plazo, como la técnica de encapsulación-deshidratación para crioconservar meristemas de paraíso gigante a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C), con lo cual se consiguió llegar a un estado de “suspensión animada” (Mroginski, Roca y Kartha, 1991).

Sin embargo, el cultivo *in vitro* tiene desventajas como el costo de la mano de obra y la manutención del material vegetal en los medios de cultivo. En algunas especies de propagación vegetativa es laboriosa y puede existir el riesgo de perder el material debido a contaminación por hongos y bacterias, errores humanos o variación somaclonal, la cual es muy perjudicial debido a la pérdida de variabilidad genética (McKendrick, 2000).

En cambio la técnica de crioconservación para el almacenamiento a largo plazo de germoplasma ofrece ventajas frente a las técnicas tradicionales, ya que permite conservar a largo plazo, con bajos costos de mantenimiento y fácil manipulación de las muestras (Engelmann y Takagi, 2000).

#### **1.4.4.1 Técnica de Crioconservación**

La crioconservación es una modalidad de conservación *in vitro* que cuenta con varias técnicas que han dado excelentes resultados. Las metodologías clásicas utilizan congeladores programables y que se fundamentan en la inducción a la deshidratación protectora de las células por medio de la reducción gradual de la temperatura. Lamentablemente estas tecnologías se limitan a cultivos de células, debido a la dificultad de aplicarla a unidades celulares mayores como ápices, embriones, entre otros. Otra metodología utilizada es la vitrificación que es más sencilla y no utiliza los costosos equipos de congelación controlada (Engelmann, 1997). Hoy en día existen técnicas que utilizan sustancias crioprotectoras que permiten el

almacenamiento de estructuras organizadas como meristemas, ápices, semillas, embriones, para asegurar la estabilidad genética y viabilidad de los materiales (Day y McLellen, 1995). La crioconservación consta de los siguientes pasos:

- Selección del material.- El tipo de explante seleccionado depende del objetivo de conservación y está estrechamente relacionado con el tipo de propagación de la especie (Scocchic y Rey, 2003).

- Deshidratación.- Este paso es necesario para eliminar el agua presente en el tejido vegetal, minimizando así posibles daños por congelación. La deshidratación del tejido puede realizarse en una cámara a 0 °C herméticamente cerrada utilizando sustancias higroscópicas como sílica gel o glicerol (5 - 20%) o sometiendo al explante a una corriente de aire en un flujo laminar de aire estéril. Este punto debe ser manejado cuidadosamente, pues una deshidratación excesiva de las células puede exponerlas a una alta concentración interna de solutos (Scocchic y Rey, 2003).

- Aclimatación.- La aclimatación puede realizarse en forma rápida o lenta. La aclimatación rápida consiste en colocar el explante directamente en nitrógeno líquido, con o sin la adición exógena de crioprotectores. La aclimatación lenta se realiza bajando gradualmente la temperatura (0.1-3 °C/min.), generalmente se congela lentamente, a una velocidad adecuada, hasta alcanzar una temperatura próxima a los -40 °C. Luego se lleva directamente a la temperatura del nitrógeno líquido (Scocchic y Rey, 2003).

A fin de aclimatar el explante para enfrentar las bajas temperaturas, se utilizan sustancias crioprotectoras como azúcares (sacarosa, glucosa),

alcoholes (glicerol, etilenglicol, manitol y sorbitol), dimetilsulfóxido (DMSO) y polivinilpirrolidona (PVP). También pueden utilizarse soluciones de vitrificación, que son una combinación de varios crioprotectores tales como el PVS2. Tanto los crioprotectores como las soluciones de vitrificación actúan fundamentalmente como agentes anticongelantes, aumentando la viscosidad del tejido vegetal y reduciendo la permeabilidad de las células (Scocchic y Rey, 2003).

- Almacenamiento.- De acuerdo al material vegetal que se utilice, se tiene: a) **Sistemas secos.**- Se utiliza en aquellos tejidos vegetales endógenamente resistentes y tolerantes a las bajas temperaturas y a la deshidratación, por lo cual necesitan de una menor preparación para el almacenamiento y comprenden aquellas especies que habitan zonas frías y/o templadas; y b) **Sistemas hidratados.**- Son usados en los tejidos vegetales no tolerantes a las bajas temperaturas y a la deshidratación, por lo cual se requiere de una protección exógena. Esta protección puede lograrse a través del uso de crioprotectores o bien por la utilización de soluciones de vitrificación que son más susceptibles a las bajas temperaturas y están representados por todas aquellas especies que habitan zonas tropicales y subtropicales, las cuales no están adaptadas para soportar temperaturas inferiores a 0°C (Scocchic y Rey, 2003).

- Descongelamiento y rehidratación.- Cuando se desea recuperar el explante mantenido en nitrógeno líquido se realiza un descongelamiento rápido en baño maría (1-2 min. a 30-40 °C) o en forma lenta, sometiendo al explante a la temperatura del laboratorio o a una corriente de aire estéril en una cámara de flujo laminar (Scocchic y Rey, 2003).

#### 1.4.5 Técnicas de almacenamiento del material a preservar

En la última década han surgido numerosas técnicas que combinan el uso de crioprotectores y de soluciones de vitrificación con técnicas de deshidratación y encapsulación, las cuales básicamente pueden resumirse en las siguientes:

- Encapsulación-deshidratación.- Se basa en la metodología aplicada a las semillas sintéticas, en la cual un explante es recubierto por una matriz de alginato de sodio y polimerizado en una solución de cloruro de calcio, formando un gel de alginato de calcio alrededor del explante, que luego serán tratados con crioprotectores. En especies tolerantes al frío la exposición de las plantas madres a bajas temperaturas durante varias semanas, previo a la criopreservación, incrementa la supervivencia. La deshidratación puede llevarse a cabo sometiendo a las cápsulas de alginato a una corriente de aire en el flujo laminar o exponiéndolas en cámaras herméticamente cerradas con sílica gel. Las cápsulas, así deshidratadas, pueden sumergirse directamente en nitrógeno líquido o bien pueden ser llevadas a un descenso lento de temperatura (Roca *et al.*, 1991).

- Vitrificación.- Involucra el pretratamiento de las muestras con soluciones de vitrificación, como el PVS2, o soluciones compuestas por etilenglicol, sorbitol y albúmina sérica bovina. Luego de la exposición a las soluciones de vitrificación, las muestras pueden ser sumergidas directamente en nitrógeno líquido o a través de un descenso lento de la temperatura. Las soluciones crioprotectoras recomendadas en los protocolos de vitrificación son generalmente tóxicas para las células. El tiempo de exposición a la solución debe estar relacionado con el tamaño del explante y la misma debe ser removida rápidamente luego del descongelado. Se ha trabajado con esta técnica en semillas y protocormos de *Dendrobium candidum* (Roca *et al.*, 1991).

- Encapsulación-vitrificación.- Es una combinación de las técnicas de encapsulación-deshidratación y vitrificación. Las muestras son encapsuladas en alginato de calcio y sometidas a vitrificación durante el enfriamiento. La supervivencia del material vegetal cuando se utiliza esta técnica es un 30% mejor que cuando se usa la de encapsulación-deshidratación. Esto puede explicarse debido a que las cápsulas de alginato de calcio reducen la toxicidad de las soluciones de vitrificación (Roca *et al.*, 1991).

- Desecación.- Esta técnica requiere la deshidratación del material vegetal, la cual es crucial para el éxito de la crioconservación. Consiste en someter al explante a una corriente de aire en un flujo laminar o en cámaras herméticamente cerradas, que contienen sílica gel, luego de lo cual se realiza un enfriado rápido sumergiendo el material directamente en nitrógeno líquido (Roca *et al.*, 1991).

- Precultivo.- La técnica del precultivo involucra la incorporación de crioprotectores en distintos tiempos antes del congelamiento. Como ejemplos pueden citarse la adición de altas dosis de sacarosa para la crioconservación de meristemas de *Musa spp.*; la utilización de polietilenglicol (PEG) y DMSO en el caso de embriones cigóticos de *Triticum aestivum* y *Phaseolus vulgaris*; la utilización de sacarosa y DMSO o glicerol en semillas, embriones cigóticos, polen y anteras de *Oryza spp.*, y la utilización de ácido abscísico para la conservación de líneas celulares y de callos de *Oryza sativa* (Roca *et al.*, 1991).

- Precultivo-desecación.- En esta técnica las muestras son tratadas con crioprotectores, parcialmente desecadas y luego sometidas a enfriamiento rápido o lento. Generalmente en el precultivo se emplean azúcares como sacarosa o glucosa. La duración del tratamiento es variable, desde horas, como en el caso de la conservación de embriones maduros de *Cocos nucifera*,

donde el cultivo dura de 11 a 20 horas, en el caso de embriones somáticos de *Elaeis guineensis*, el tratamiento dura 7 días (Roca *et al.*, 1991).

- Gotita congelada.- El material es pretratado con DMSO por 2-3 horas, en medio líquido y se forma una microgota, la cual se suspende sobre papel de aluminio y luego se sumerge directamente en nitrógeno líquido. Este procedimiento es una adaptación de la técnica clásica desarrollada para meristemas de mandioca y ha sido aplicada en 150 variedades de *Solanum tuberosum*, con un porcentaje de supervivencia del 40% (Roca *et al.*, 1991).

#### **1.4.5.1 Técnica de Encapsulación-Deshidratación**

La técnica de crioconservación en plantas es relativamente reciente, el primer informe exitoso fue publicado por Sakai en 1960. *In vitro*, se ha reportado trabajos por Quatrano en 1968 en células de lino cultivadas a bajas temperaturas. Los primeros protocolos se desarrollaron a partir de 1980, estos incluían el uso de crioprotectores como pretratamientos, seguidos de un control de la tasa de enfriamiento (Sakai, 1985; Engelmann, 1997).

La metodología basada en la deshidratación por inducción al enfriamiento se ha aplicado en numerosas especies, sobre todo de clima templado, sin embargo, para las plantas de origen tropical, como las orquídeas, los controles de enfriamiento no han producido resultados exitosos (Engelmann 2000).

Investigaciones de la técnica de vitrificación que se basa en la transición de agua de la fase líquida directamente a una fase amorfa, evitando la cristalización, han producido una nueva técnica llamada encapsulación-

deshidratación desarrollada para la criopreservación de brotes (Dereuddre *et al.*, Engelmann 2000).

La técnica de encapsulación-deshidratación se ha aplicado en el caso de orquídeas en semillas y protocormos de *Dactylorhiza fuchsii* por Wood en el 2000 y *Oncidium bifolium* por Flachslan en el 2006.

La germinación *in vitro* de las semillas es el primer paso para la formación de protocormos, la cual se realiza en medios de cultivo que contienen nutrientes, sales minerales, vitaminas y fitohormonas, y en condiciones adecuadas de luz, temperatura y humedad. Es recomendable antes de germinar las semillas realizar tinciones topográficas con colorantes que sirvan como indicativos de su viabilidad. El estado ideal de los protocormos, formados en el proceso de germinación, para la crioconservación es un estado fotosintético (coloración verde), indicativo de un desarrollo normal que desembocará en una planta (McKendrick, 2000).

La valoración de la viabilidad después de un experimento de crioconservación se da en la producción directa de nuevos tejidos a partir de los explantes crioconservados. El crecimiento directo sin la formación del callo exige mantener la estabilidad genética. La mayoría de las plantas recuperadas luego de aplicada la técnica de encapsulación-deshidratación crecen sin la producción de callo (Engelmann 1997; Escobar *et al.*, 1997).

Un protocolo de encapsulación-deshidratación comprende varios pasos. Las condiciones para cada uno de ellos exigen su optimización para lograr una recuperación máxima de los explantes después de la crioconservación:



- Preacondicionamiento.- Consiste en la manipulación de las condiciones de los cultivos de las plantas madres con el fin de acondicionar a los explantes para que resistan los protocolos de crioconservación. Por ejemplo cultivar a las plantas madre a temperaturas bajas en el caso de especies tolerantes al frío, o en un medio con alta concentración de sacarosa (Decruse *et al.*, 1999; Grospietch *et al.*, 1999).

- Precultivo.- Es el cultivo de los explantes durante varias horas o días después de su recolección y antes de la encapsulación, en medios normales o con altas concentraciones de sacarosa y/o glicerol, con el fin de ir adaptando poco a poco al explante al estrés osmótico al que será sometido (Cho *et al.*, 2002).

- Encapsulación.- Es el proceso por el cual se recubre al explante con una solución de alginato de sodio que se polimeriza al hacer “gotear” con una pipeta, en una solución de cloruro de calcio, formándose una esfera que contiene suspendido el material vegetal en su interior. La polimerización finaliza luego de 20 o 30 minutos después de que se coloca la última gota de alginato con el explante, la cual se puede controlar visualmente observando como las cápsulas translúcidas progresivamente se tornan opacas indicando un normal proceso de polimerización (González-Arno y Engelmann, 2006).

Las esferas polimerizadas normalmente miden de 4 o 8 mm de diámetro, pero su tamaño puede variar dependiendo del diámetro de la punta de la pipeta el cual se ajusta al tamaño del explante (González-Arno y Engelmann, 2006).

- Osmoprotección.- Es el tratamiento de los explantes encapsulados en una solución de sacarosa durante varias horas o días antes del desecamiento y crioconservación. Las cápsulas que contienen a los explantes se colocan en

Erlenmeyers con una solución de sacarosa que puede variar su concentración entre 0.50 y 1.25 M. La concentración de sacarosa para la mayoría de los casos ha sido estandarizada en 0.75 M (Engelmann, 2006).

Sin embargo, en algunos casos la osmoprotección de los explantes directamente en una solución con una alta concentración de sacarosa es tóxica y produce una recuperación muy baja, luego de la crioconservación. En tales casos una posible solución es el aumento progresivo en la concentración de sacarosa cada 24 horas reduciendo el efecto tóxico de la tensión osmótica (Flachsland, 2002).

- Deshidratación.- Consiste en la eliminación del agua del tejido vegetal para evitar la formación de cristales intracelulares que causen daños en las membranas plasmáticas. La eliminación del agua se empieza secando las cápsulas superficialmente en papel filtro estéril para quitar cualquier medio líquido restante y luego ser sometidas a una deshidratación física. En el método de desecamiento pueden ser empleado, la deshidratación bajo una corriente de aire en una cámara de flujo laminar o la deshidratación en recipientes sellados con el uso de sílica gel. El desecamiento bajo el flujo laminar puede producir el desecamiento inconstante dependiendo de la proporción de la corriente de aire, temperatura aérea y la humedad relativa. El desecamiento en recipientes herméticos con sílica gel proporciona condiciones iguales en todas las repeticiones que se realice por lo que es el método de deshidratación mas recomendado (González-Arno y Engelmann, 2006).

- Crioconservación.- Las cápsulas son colocadas en criotubos de polipropileno, los cuales son sumergidos en el nitrógeno líquido en tanques de almacenamiento. En ciertos explantes se recomienda utilizar para el control de la tasa de enfriamiento, un sistema de inmersión programable seguido de una

inmersión directa en nitrógeno líquido para obtener un crecimiento superior después de la crioconservación (Engelmann, 2006).

- Recuperación.- Con la técnica de encapsulación-deshidratación, la recuperación se lleva normalmente a la temperatura del laboratorio para que no exista ningún riesgo de recristalización en los explantes. Para la recuperación lenta, las cápsulas son sacadas de los criotubos y son colocadas en cajas Petri abiertas dentro de una cámara de flujo laminar por aproximadamente 5 min. o son transferidas directamente hacia el medio de recuperación. En ambos casos la recuperación se inicia colocando a los criotubos en baño de María por dos o tres min. a 40°C y en algunos casos las cápsulas son rehidratadas con el medio de cultivo líquido por 5 –10 min. (Chang *et al.*, 2000; Gupta y Reed, 2005).

- Recultivo.- El recultivo generalmente se lo realiza en medios de cultivo semisólidos, a los que se transfiere los explantes en condiciones normales. La composición del medio de recuperación puede modificarse para eliminar los compuestos fenólicos producidos por las células muertas agregando carbón activado al medio o para estimular la proliferación de explantes modificando la concentración de los reguladores de crecimiento. En algunos casos es necesario extraer los explantes de las cápsulas para colocarlos directamente en los medios de recuperación para asegurar su recrecimiento. Las condiciones medioambientales también son importantes para el recrecimiento. Es beneficioso realizar la recuperación luego de la descongelación en oscuridad para un período corto (alrededor de una semana) para las estructuras organizadas como los meristemas y protocormos con el fin de prevenir o disminuir la foto oxidación perjudicial para las muestras crioconservadas. Otra recomendación para evitar la peroxidación oxidativa, que es un indicativo de estrés, es eliminar la concentración de amonio de los medios de cultivo en las primeras semanas de recuperación (Benson, 1990).

#### **1.4.6 Prueba de viabilidad y sobrevivencia**

Las pruebas de viabilidad y sobrevivencia nos permiten comprobar las zonas del tejido que han muerto y cuáles han sobrevivido al frío. La evaluación de la viabilidad puede llevarse a cabo en forma visual, realizando el re-cultivo y determinando la capacidad de regeneración utilizando Cloruro de 2,3,5–Trifenil-Tetrazolio que colorea el tejido que ha sobrevivido a la crioconservación o midiendo la conductividad eléctrica, que permite estimar el daño producido en las membranas celulares (Vieitez, 1952).

La tinción con Cloruro de 2,3,5–Trifenil-Tetrazolio (TTC) es una técnica que se encuentra dentro del grupo de las pruebas bioquímicas, cuya característica es entregar un indicativo colorimétrico de la actividad metabólica de diferentes explantes luego de su rehidratación, con lo cual se puede estimar su viabilidad (Vieitez, 1952).

En general las soluciones neutras de tetrazolium incoloras son reducidas en presencia de ciertos sistemas enzimáticos contenidos en las células vivas, tomando una coloración rojiza debido a la producción de un compuesto reducido (Fig. 1.3) que es una sal de tetrazolium insoluble, denominado formazán (Vieitez, 1952). Este compuesto permite teñir los constituyentes específicos de diferentes explantes gracias al TTC, e indicar la presencia de enzimas funcionales como peroxidasa, esterasa y deshidrogenasa (Dumas *et al.*, 1984; Iborra *et al.*, 1992).

El uso de sales de tetrazolium provee de métodos alternativos indirectos para medir actividad respiratoria asociada a una cadena de transporte de

electrones. Dichas sales fueron conocidas inicialmente por su efecto de teñir bacterias. Hoy en día su utilización se extiende a pruebas de viabilidad de semillas, presencia y enumeración de bacterias, pruebas de motilidad bacteriana en agar semisólido y detección de sistemas enzimáticos de deshidrogenasas (Vieitez, 1952).

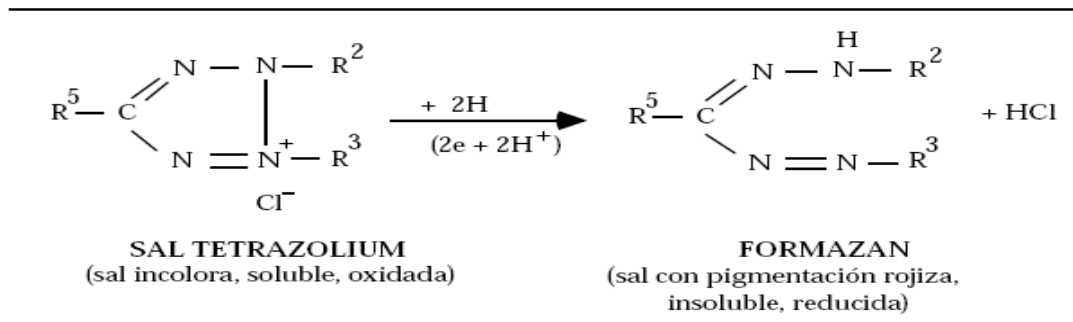


Figura 1.3 Reducción de una sal de Tetrazolium en Formazan (Vieitez, 1952).

El tetrazolio es reducido a formazán por las enzimas deshidrogenasas de los tejidos vivos (Sarvella, 1964). Por lo que se asume que la reducción *in vitro* del TTC como prueba válida para la actividad de la succínico deshidrogenasa en el Ciclo de Krebs, con lo cual se puede discriminar entre aquellos explantes que tienen metabolismo oxidativo, y que presentan viabilidad potencial de aquellos que no lo poseen los cuales son considerados como no viables (Hauser y Morrison, 1964). Los explantes viables aparecen primero de color rosado que gradualmente se va haciendo más intenso para finalizar con la coloración roja (Vieitez, 1952).

Se puede extraer el formazán usando alcoholes (metanol, etanol o propanol) o mezclas de solventes orgánicos (tetracloroetileno-acetona, 2:3) (Burton *et al.*, 1986). La concentración de formazán extraída puede ser determinada por espectrofotometría. El uso de estas sales nos permite estimar la actividad respiratoria ligada a cadenas de transporte de electrones que

operan bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Es importante además, señalar que la reducción de sales tetrazolium es afectada por el pH, a pH bajos (pH < 5) se inhibe la reducción del TTC, por consiguiente, es importante considerar el pH de las muestra, cuando utilizamos la reducción de sales de tetrazolium como un indicador de la actividad respiratoria (Iborra *et al.*, 1992).

#### **1.4.7 Determinaciones analíticas del daño en las membranas celulares**

El desarrollo de una metodología de crioconservación implica una serie de acontecimientos que provocan diferentes reacciones en las células (estrés), las cuales pueden desembocar en alteraciones del material crioconservado sobre todo a nivel de las membranas celulares (Dumet y Benson, 2000).

Los cambios bioquímicos que sufren las membranas celulares conllevan la pérdida de viabilidad celular debido a la presencia de radicales libres (medidores de estrés oxidativo) en las diferentes etapas de la crioconservación. La síntesis de proteínas es otro indicativo importante del daño y de la reparación celular causada por el estrés oxidativo (Benson, 2000). La lisis celular por recristalización intra e intercelular se puede analizar cuantificando el porcentaje de la pérdida de electrolitos (Martínez, Lorenzo, Ojeda, Quiñones, Mora, Sánchez, Iglesias, Martínez y Castillo, 2006).

En el caso de orquídeas, no se ha encontrado antecedentes de estudios relativos a la determinación de algunos cambios bioquímicos y biofísicos que provoca la crioconservación en las membranas celulares de protocormos crioconservados.

##### **1.4.7.1 Peroxidación Lipídica**

La peroxidación lipídica es un indicativo de daño celular, por lo que se lo utiliza en diferentes ocasiones como indicador del estrés oxidativo y bioindicador de contaminación ambiental. Tras la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las membranas biológicas se generan productos como el malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetalqueno (4-HNE), como productos finales de la reacción. Gracias a su determinación se puede cuantificar la peroxidación lipídica y por ende el estrés oxidativo en los diferentes organismos (Di Giulio, 1991).

Los ácidos grasos poliinsaturados son fundamentales para la célula, ya que forman parte de los fosfolípidos, constituyentes fundamentales de la bicapa lipídica de las membranas celulares y participan en un alto porcentaje en la fluidez de ésta. La función de estos lípidos es la de mantener la integridad de la célula. Los PUFA se localizan en las membranas celulares, las membranas plasmáticas del retículo endoplasmático y las mitocondrias (Muriel, 1997).

Estos lípidos son biomoléculas susceptibles al estrés oxidativo y su degradación es el efecto más sobresaliente de los radicales libres sobre las células, debido a que la pérdida de los PUFA de la membrana junto con la formación de los puentes disulfuro de las cadenas de las proteínas y la posterior ruptura de éstas, provoca una reacción destructiva de las membranas que lleva a la pérdida de la permeabilidad y su posterior muerte celular. La susceptibilidad de las membranas biológicas a la peroxidación depende del grado de insaturación y la posición de los dobles enlaces en la membrana y de la presencia o no de iones de hierro, debido a que éstos catalizan las reacciones de oxidación, además de activar el oxígeno en la formación de los EROs (Muriel, 1997).

#### **1.4.7.2 Contenido de Proteínas**

La habilidad para sobrevivir a bajas temperaturas de las especies vegetales adaptadas a regiones templadas del planeta, varían durante el transcurso del año. Las plantas capaces de aclimatarse al frío perciben las bajas temperaturas sobre cero durante el avance del invierno y disparan procesos bioquímicos específicos que resultan en la tolerancia, hasta las temperaturas de congelamiento (Thomashow, 1999).

La aclimatación al frío está asociada a la expresión de genes, síntesis de proteínas y varios cambios fisiológicos inducidos por el estrés de las bajas temperaturas y la deshidratación en diferentes especies vegetales. Los mecanismos que contribuyen a la tolerancia incluyen la prevención de la desnaturalización de proteínas inducida por bajas temperaturas, la prevención de la precipitación de moléculas y la atenuación de las consecuencias de la formación de hielo intercelular (Guy, 1990).

Estudios indican que en las plantas los sistemas de membranas de la célula son los primeros sitios dañados por el congelamiento (Levitt, 1980; Steponkus, 1984). Entre estos daños se incluyen la lisis celular inducida por expansión, las transiciones de los lípidos de membrana (de laminares a fase hexagonal II) y las lesiones por fracturas. Los mecanismos involucrados en la estabilización de las membranas celulares en respuesta al frío son múltiples. Los más importantes serían los cambios en la composición de lípidos, aunque también se ha observado la acumulación de solutos compatibles (moléculas que pueden acumularse en la célula sin modificar el metabolismo central) en células de plantas sometidas tanto a estrés por frío como por sequía. La acumulación de sacarosa y otros azúcares, que típicamente ocurre en plantas tolerantes durante la aclimatación, parece contribuir a la estabilización de las membranas. Estas moléculas demostraron proteger *in vitro* a las membranas durante el congelamiento (Strauss y Hauser, 1986; Anchooguy *et al.*, 1987). En muchas especies de gramíneas de clima templado se ha observado la acumulación de fructanos, polímeros de fructosa, cuando las plantas son expuestas a bajas temperaturas sobre cero. El incremento en el contenido de estos polímeros



parece estar relacionado al proceso de aclimatación a las bajas temperaturas (Pontis, 1989; Tognetti *et al.*, 1989; *et al.*, 1993; Puebla *et al.*, 1999).

El metabolismo de los fructanos en gramíneas ha sido estudiado en su mayor parte en cereales de importancia agronómica y se lo ha señalado como uno de los mecanismos de tolerancia a bajas temperaturas. En la Argentina existen especies nativas que están adaptadas a ambientes de climas rigurosos y son tolerantes a condiciones severas de estrés abióticos. *Bromus pictus*, por ejemplo, es una especie distribuida en las estepas áridas de la meseta patagónica, donde las bajas temperaturas imperan en la mayoría de los días del año (la temperatura media en julio es de 1,9 °C) y las precipitaciones promedio sólo llegan a los 168 mm anuales. Esta especie contiene elevados niveles de fructanos en sus tejidos y una creciente actividad de fructosil-transferasas, enzimas responsables de la síntesis de estos azúcares, cuando las plantas son tratadas con bajas temperaturas. Los genes que codifican estas enzimas fueron aislados recientemente y, a través de la transformación de tejidos heterólogos con los mismos, fue posible estudiar la función de estos azúcares en la tolerancia a frío (Puebla *et al.*, 1999).

#### **1.4.7.3 Pérdida de Electrolitos**

La pérdida de electrolitos se debe principalmente a la lisis celular que puede tener lugar en las células de los protocormos crioconservados, debido a la aparición de pequeños cristales de hielo en el interior de las células que no se encuentren adecuadamente deshidratadas, durante la descongelación estas pueden aumentar de volumen y provocar la lisis celular con la pérdida de la semipermeabilidad de la membrana plasmática. Además el aumento de la concentración de compuestos tóxicos intracelulares, cambios de pH y la irregularidad de la actividad enzimática también favorecerán la lisis celular (Martínez *et al.*, 2006).

Algunos estudios con células de trigo crioconservadas evidencian que el material membranoso se puede separar de la membrana plasmática y formar pequeñas vesículas endocitóticas en el citoplasma. Estas vesículas se mantienen intactas en el estado vítreo durante la congelación con nitrógeno líquido y existen indicios de que se pueden reincorporar de manera lenta a la membrana plasmática durante la descongelación-rehidratación para reparar sus daños. El tráfico de vesículas en plantas es posible mediante mecanismo de transporte vesicular en las endomembranas (Fujikawa *et al*, 2000).

## **1.5 Hipótesis**

Para el proceso de crioconservación de protocormos de *Oncidium stenotis* los tratamientos evaluados en la fase de germinación y recultivo no tendrán diferencias significativas.