

## CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Germinación de las semillas de *Oncidium stenotis*

El estado fisiológico del material vegetal es importante para la germinación y para el éxito de la crioconservación. Las muestras a analizar, generalmente, se obtienen de plantas madre con un desarrollo adecuado, asegurándose así que sus células tengan una actividad normal (Engelmann, 1997; Escobar *et al.*, 1997). En el caso de las orquídeas se debe recolectar cápsulas con un nivel de madurez fisiológica adecuado con el fin de garantizar un alto porcentaje de viabilidad de las semillas que se utilizarán para la formación de protocormos, los cuales posteriormente serán crioconservados (McKendrick, 2000).

Según Höhne (1995), el grado de maduración apropiado de las cápsulas de orquídeas para su selección es 4/5 partes del tiempo normal de maduración de las mismas. Este tiempo varía según la especie, sin embargo, las semillas pueden ser colectadas a partir de cápsulas maduras que están listas para ser abiertas y que se encuentran llenas de semillas viables. Un indicativo de madurez es la presencia de tegumento duro cuando no se deforman al ejercer presión y el cambio de color de verde claro a verde oscuro, amarillo o café. Otro indicativo de madurez es el color de las semillas, las cuales deben ser de color café, para poder ser removidas fácilmente de la placenta y estar listas para ser cosechadas (Böhm, 1996). En el presente trabajo, de las 12 cápsulas recolectadas en el orquidiario ORQUISAN de la provincia de los Tsáchilas, 10 presentaron indicios de madurez fisiológica de acuerdo a su coloración y consistencia con un alto porcentaje de germinación en medio nutritivo.

Es importante considerar que para germinar semillas de orquídea *in vitro* es necesario realizar una buena desinfección de las cápsulas maduras. La gran mayoría de trabajos utilizan procesos agresivos de desinfección (Potisek *et al.*,

1998; Serna, 1999) que empiezan con el lavado fuerte de la superficie externa de las cápsulas con detergentes comerciales para posteriormente sumergirlas en altas concentraciones de cloro comercial por tiempos prolongados de más de 10 minutos, alcohol en concentraciones superiores al 70% y varios flameos directos dentro de una cámara de flujo laminar. Estos protocolos obtienen porcentajes de contaminación menores al 20%, algo similar al porcentaje de contaminación de aproximadamente 18.18% que se obtuvo en el presente trabajo siguiendo el protocolo de McKendrick (2000). Este porcentaje es bajo tomando en cuenta la cantidad de semillas que contienen las cápsulas y el número de semillas que se pueden sembrar en cientos de frascos con medios nutritivos (Ruíz, Laguna, Iglesias, Damon, Marín, Azpíroz y Moreno, 2008; Ávila y Salgado, 2000).

Las semillas de algunos géneros de orquídeas son capaces de germinar *in vitro* (Knudson, 1922), sin embargo, cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar (Pierik, 1990). Existen varios factores complejos que influyen en la germinación y el crecimiento de las orquídeas. La temperatura, el fotoperiodo y la humedad, son ejemplos de las condiciones que influyen en la germinación. La composición del medio de cultivo también es un factor fundamental para el proceso de germinación, hormonas, agua, minerales, carbono y vitaminas son los componentes indispensables en los medios de germinación (Pierik, 1990).

Análisis realizados para determinar el porcentaje de germinación en los tratamientos del medio líquido, nos sugiere que concentraciones de  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA,  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  y combinaciones de ANA y  $\text{GA}_3$  a concentraciones entre  $0.1\text{-}0.5 \text{ mgL}^{-1}$  son los mejores tratamientos debido a los altos porcentajes de germinación que presentaron los ensayos.

En los tratamientos del medio sólido se observó que cuando no hay interacciones entre los reguladores de crecimiento (ANA, BAP y AIA) se

favorece la germinación entre un 83,33% a un 100% aproximadamente. La mayoría de las interacciones de estos reguladores a distintas concentraciones presentan bajos porcentajes de germinación, con lo cual comprobamos que no hay una relación de estos reguladores con las concentraciones empleadas en esta investigación.

En estos ensayos los tratamientos control que no contenían reguladores de crecimiento evidenciaron una germinación del 60% para el medio líquido y del 58,33% para el medio sólido. Pierik (1990) manifiesta que no son necesarios los reguladores de crecimiento en el proceso de germinación de semillas de orquídea y que inclusive su presencia puede producir efectos no deseados, como los bajos porcentajes de germinación que se presentaron en esta investigación con el uso de altas concentraciones ( $0.5 - 1 \text{ mgL}^{-1}$ ) de ANA. Trabajos realizados en germinación de semillas de orquídea en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, demuestran que la composición del medio de cultivo y la especie son los factores que más influyen en la germinación de las semillas (Potisek *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2008; Hurtado y Merino, 1987).

La consistencia del medio de cultivo empleado, Knudson C, tanto líquido como sólido es útil para los diferentes ensayos de germinación. En el caso que se requiera aumentar medio de cultivo por la deshidratación del medio, es más fácil agregar medio líquido con la ayuda de una jeringuilla estéril. En el caso del medio sólido no se puede adicionar medio de cultivo cuando se evidencia una deshidratación. En este caso, se debe retirar las semillas o los protocormo y recultivarlos en un nuevo medio, lo cual es muy laborioso si tomamos en cuenta la cantidad de semillas y su tamaño. La presencia o ausencia de agar en el medio de cultivo determina la facilidad de manipulación de las semillas germinadas para su posterior trasplante y la absorción de nutrientes, hormonas y el agua por parte de las semillas del medio de cultivo (Pierik, 1990).

Es importante además de evaluar el medio de cultivo para la germinación de semillas de orquídea, evaluar el tiempo en que se presentan los indicios de germinación y las primeras semillas germinadas. Es necesario tener en cuenta el tiempo global de germinación para sincronizar todos los procesos posteriores a la crioconservación, debido a la dormancia morfológica y al complicado proceso de activación de las semillas (Azcón-Bieto, 2001).

La germinación y el desarrollo de protocormos tiene lugar mucho más rápido *in vitro* que *in vivo*, ya que ésta se realiza en un ambiente controlado (Pierik, 1990). En esta investigación se evidencia que la adición de reguladores de crecimiento tanto en el medio líquido como en el medio sólido no tiene influencia en el tiempo en que aparecen los indicios de la germinación y las primeras semillas germinadas sino en el porcentaje de germinación de las semillas.

#### **4.2 Recultivo de protocormos**

Existen varios métodos para determinar la supervivencia y viabilidad de los diferentes explantes que son crioconservados, como por ejemplo: la tinción con TTC, microscopía de fluorescencia, microscopía electrónica, calorimetría. Estas técnicas pretenden determinar la viabilidad y supervivencia de los protocormos comprobando las zonas del tejido que han muerto y las que han sobrevivido. Sin embargo, la evaluación de la viabilidad puede llevarse a cabo en forma visual, realizando el recultivo en medios nutritivos, la cual es la herramienta más certera con la que se cuenta para evaluar la supervivencia y viabilidad del material (Roca *et al.*, 1991).

Al evaluar la metodología de encapsulación, deshidratación, congelamiento y recuperación para la crioconservación de protocormos observamos que en el proceso de encapsulación se obtuvo un 90% de plántulas viables, por lo que posiblemente el estrés producido en este proceso

no influye en la supervivencia de los protocormos. El proceso de encapsulación y osmoprotección disminuyó en un 50% las plántulas regeneradas, posiblemente las altas concentraciones de sacarosa a las que son sometidas las cápsulas, influyó en la viabilidad de los protocormos. La concentración y el tiempo de inmersión son dos aspectos a tomar muy en cuenta ya que en algunos casos las altas concentraciones de sacarosa pueden ser tóxicas y producir una baja recuperación.

En la deshidratación se debe eliminar la mayor cantidad de agua de las células de los protocormos para evitar la formación de cristales intracelulares que causen daños en las membranas plasmáticas. Luego de deshidratar las muestras se obtuvo un 60% de plántulas normales, lo que indica que este proceso tiene influencia en la viabilidad de los protocormos. Se debe formar un estado vitrio que permita que el agua de las células pueda formar una estructura amorfa que no cause daño en las membranas (Engelmann, 2006). La eliminación del agua por deshidratación con lleva a la acumulación de solutos en los espacios intra y extra celulares, lo cual puede ser tóxico y afectar la viabilidad de los protocormos (Flachsland, 2002).

En la evaluación del proceso de congelamiento se obtuvo un 60% de plántulas regeneradas, en comparación con el 81% reportada por Flachsland en el 2000 en trabajos con *Oncidium bifolium*. Se puede determinar que el proceso de congelamiento es importante en la recuperación y desarrollo de los protocormos, debido a que la solidificación del agua genera una alta concentración de sólidos solubles lo que provoca una disminución en la cantidad de agua libre intra y extracelular. El proceso de congelación, la formación y el crecimiento de los cristales de hielo producen modificaciones en la célula como la saturación y precipitación de componentes celulares, modificaciones del pH que pueden afectar los complejos coloidales, cambios marcados en la presión osmótica los que pueden romper las membranas

semipermeables, afectando gravemente la supervivencia de los protocormos (Toledo, 2000).

Los tratamientos con reguladores de crecimiento para la recuperación de los protocormos en ausencia de reguladores producen un 60% de plántulas regeneradas. El tratamiento con  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  de AIA produjo un 60% de plántulas regeneradas mientras que el tratamiento que contiene  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  BAP +  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  IBA produjo un 80%, indicando la importancia de los reguladores de crecimiento en los medios de cultivo en la fase de recuperación. En crioconservación de protocormos de orquídeas no se han evaluado las concentraciones de reguladores de crecimiento en la recuperación de protocormos post-congelamiento, sin embargo, trabajos de crioconservación en otras especies como *Citrus sinensis* y paraíso gigante reportan porcentajes de recuperación del 30 y 70% respectivamente (Dolce *et al.*, 2004; Scocchi, 2000). Los diferentes reguladores de crecimiento son necesarios para estimular la recuperación del metabolismo y los procesos biofísicos y bioquímicos en un proceso de crioconservación. El equilibrio hormonal debe primar en los medios de recuperación con el fin de encontrar el medio óptimo para conseguir el mayor porcentaje de sobrevivencia.

Los tratamientos con fotoperiodo directo luego de la recuperación post-congelamiento produjo un 50% de plántulas regeneradas, lo que nos sugiere que la irradiación no incide en la supervivencia de los protocormos.

Al comparar otras técnicas de crioconservación en las que utilizan crioprotectores que tiene más toxicidad que la osmoprotección y la deshidratación (Roca *et al.*, 1991) con la técnica empleada en esta investigación, encapsulación-deshidratación, podemos sugerir que ésta es la que presenta mayores porcentajes de viabilidad en la recuperación en distintos

explantes. La estandarización de este proceso es fundamental para la posterior recuperación de los protocormos crioconservados.

### **4.3 Determinación de la supervivencia de los protocormos**

Con el propósito de establecer la supervivencia de los protocormos se evaluó la tinción con TTC, la pérdida de electrolitos, los productos de la peroxidación lipídica y el contenido de proteínas totales.

Las pruebas de chi-cuadrado junto a la tinción con TTC nos indican que existe una relación entre los tratamientos y la supervivencia de los protocormos en los procesos de deshidratación y congelamiento, lo cual es corroborado con el número de plantas regeneradas. En cambio, en los procesos de encapsulación, osmoprotección y en el tratamiento que evalúa el fotoperiodo sin fase de oscuridad, no existe relación con la supervivencia de los mismos.

El proceso de osmoprotección afecta la regeneración de plántulas, contrastando con el análisis de la supervivencia de los protocormos. Posiblemente las altas concentraciones de sacarosa son tóxicas para algunos procesos metabólicos que inhiben el normal desarrollo de las plántulas, más no la supervivencia. La tinción con TTC es una prueba cualitativa que nos permite visualizar rápidamente la supervivencia de los protocormos, lo que indica la existencia de tejido vivo en el momento de la tinción, mas no indica los daños celulares, bioquímicos o biofísicos que se pueden presentar en los protocormos sometidos a diferentes tratamientos.

En los tratamientos que se evalúa la supervivencia en los medios de cultivo para la recuperación de protocormos se observa que hay una relación entre los diferentes reguladores de crecimiento y su supervivencia. El

tratamiento que contiene  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  de AIA obtuvo un alto porcentaje de protocormos muertos en comparación con el tratamiento que contiene  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP y  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de IBA, donde se obtuvo un mayor número de supervivencia de los protocormos. Por lo que debemos tener en cuenta que la adición de fitohormonas en los medios de recuperación pueden afectar la recuperación del metabolismo celular y su normal desarrollo.

Estos resultados sugieren que los protocormos se ven afectados por las diferentes fases del proceso de crioconservación, los medios de cultivo y el fotoperiodo. La técnica de cultivo de tejidos es una alternativa para la recuperación de protocormos que han sido almacenados en NL, ya que con esta técnica se obtuvo plántulas desarrolladas al recultivarlas en medio de cultivo Knudson C. En consecuencia, la prueba de TTC solo sirve como control del material para observar de una manera rápida el estado de los protocormos en el instante de la tinción y no un indicativo de la recuperación.

Al analizar la pérdida de electrolitos durante los primeros 7 días del ensayo se evidencia una disminución progresiva del porcentaje de estos en los tratamientos evaluados. La disminución hasta el cuarto día después de la crioconservación, sugiere que es posible una recuperación en las membranas plasmáticas (ver Resultados Fig. 3.22). Algunos estudios con células crioconservadas evidencian que el material membranoso se puede separar de la membrana plasmática y formar pequeñas vesículas endocitóticas en el citoplasma (Martínez, 2006). Estas vesículas se mantienen intactas en el estado vítreo durante la congelación en nitrógeno líquido. Existen indicios de que estas vesículas se pueden reincorporar de manera lenta a la membrana plasmática durante la descongelación - rehidratación para reparar sus daños (Engelman, 2000).

El análisis de los productos de la peroxidación lipídica indica diferencias significativas en el contenido de malondialdehído. El tratamiento control sin



crioconservación tiene una variación durante los 6 primeros días del experimento. En el tratamiento con crioconservación pero sin reguladores de crecimiento se observa valores altos en el día 5 y 7, mientras que en el tratamiento con crioconservación pero con reguladores de crecimiento hay un aumento a partir del día 6 (ver Resultados Fig. 3.23). Es necesario tener en cuenta que los daños biofísicos en las membranas plasmáticas no son la única causa de pérdida de viabilidad celular sino también los cambios bioquímicos. Las membranas celulares que son sensibles a la deshidratación, posiblemente son atacadas por los radicales libres, lo cual provocan su peroxidación lipídica, con la consiguiente liberación de malondialdehído y otros aldehídos. Así, los valores elevados que se han encontrado después de la crioconservación, son posibles debido al propio mecanismo de tolerancia que deben alcanzar las membranas celulares durante la deshidratación a la que son sometidas las células de los protocormos (Martínez, 2006).

Existen trabajos que confirman la relación entre la reducción del metabolismo y la supervivencia en la crioconservación. Hoekstra plantea que debe existir un control coordinado de la energía metabólica durante la tolerancia a la desecación, para evitar las condiciones de estrés oxidativo y/o acumulación de los productos secundarios hasta concentraciones tóxicas (Hoekstra y Golovina, 1999; Matínes, 2006).

El comportamiento de los valores de los productos de la peroxidación lipídica (ver Resultados Fig. 3.23) al siguiente día de la crioconservación sin variaciones aparentes, podría deberse al mecanismo de disminución del metabolismo celular y la reestructuración del material crioconservado. El pico observado al segundo día podría corresponder con la activación del metabolismo celular que provoca el aumento de las concentraciones de las especies reactivas del oxígeno y una extensa peroxidación lipídica en las membranas no recuperadas.

La disminución de los niveles de malondialdehído que presentan los diferentes tratamientos en los diferentes días del ensayo pudo causar la activación de los mecanismos de defensa antioxidantes y asimiladores de radicales libres. Estos sistemas antioxidantes se pueden activar de manera directa por el estrés oxidativo y como consecuencia disminuir los niveles de las especies reactivas del oxígeno (Gaspar *et al.*, 2002).

En la evaluación de los niveles de proteínas totales se observó en la fracción microsomal que en los protocormos crioconservados durante los 3 primeros días posteriores a la descongelación presentan los niveles de proteína más elevados. Al cuarto día se igualan los niveles en todos los tratamientos (ver Resultados Fig. 3.24). Las diferencias significativas de los valores de las proteínas en el transcurso del tiempo en los diferentes tratamientos, pueden estar asociados a una variedad de genes que se inducen por estrés de las bajas temperaturas y la deshidratación en diferentes especies vegetales (Svensson, 1997). Según Shinozaki, entre las funciones principales de los genes inducidos está la de proteger las membranas celulares del estrés, mediante la producción de importantes proteínas metabólicas (Shinozaki, Yamaguchi- Shinozaki, Seki, 2003).

El incremento de proteínas en el tratamiento que no contiene reguladores de crecimiento a partir del tercer día de la crioconservación de los protocormos al igual que al tercer día en el tratamiento control, posiblemente esta asociado con la reparación que ocurre en la membrana plasmática, según la pérdida de electrolitos. Por el incremento el tráfico de las vesículas a través del sistema de endomembranas (Oliver *et al.*, 2001).

La disminución de las proteínas a partir del segundo día en el tratamiento con reguladores de crecimiento, puede relacionarse con que el aumento del malondialdehído y otros aldehídos derivados que se consideran citotóxicos y genotóxicos (Esterbauer, Zollner, Schauer, 1988). Algunas de las

proteínas inducidas durante el proceso de congelación-descongelación pueden desempeñar también una función importante en la disminución de los niveles endógenos de malondialdehído y aldehídos.

Las técnicas analíticas utilizadas en este estudio junto con la tinción con TTC, constituyen una fuente esencial de información. Ellas evidencian las posibles causas de los daños de las membranas celulares, y permiten sugerir también las reparaciones que existen en las membranas para que algunos daños sean mínimos, y de esta forma lograr el éxito de la crioconservación y la supervivencia de los protocormos. En este sentido, la metodología propuesta también podría construir un paradigma para estudios avanzados y establecer mecanismos de tolerancia en las células durante la deshidratación y congelación.