

Efectividad de métodos para desinfectar semillas de *Laelia autumnalis* para la conservación en nitrógeno líquido

Effectiveness of methods to disinfect seeds of *Laelia autumnalis* for conservation in liquid nitrogen

Ulices Iván Santos Pérez¹

Martha Elena Pedraza Santos¹

Rafael Salgado Garciglia²

Alejandro Martínez Palacios³

Ana Tztzqui Chávez Bárcenas¹

María Teresa González Arnao⁴

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

² Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

³ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

⁴ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana

Autora para correspondencia: Martha Elena Pedraza Santos, E-mail: marelpesa@yahoo.com.mx

Resumen

Introducción: *Laelia autumnalis* es una orquídea nativa de México amenazada por la pérdida de su hábitat. Para la conservación de esta especie es necesario evaluar la efectividad de métodos de desinfección y secado para aplicar técnicas de crioconservación y cultivo *in vitro*.

Método: En un primer experimento, se consideró la técnica de inmersión directa en nitrógeno líquido para optimizar el almacenamiento a largo plazo. Sin embargo, la germinación asimbiótica fue afectada por el hongo *Alternaria* sp., motivo por el cual se realizó un segundo experimento con dos ensayos para evaluar la viabilidad y germinación asimbiótica de las semillas en función

de los desinfectantes hipoclorito de calcio al 1% e hipoclorito de sodio comercial al 15% y los métodos de secado con aire en la campana de flujo laminar, gel de sílice y bomba de vacío, antes y después de la inmersión en nitrógeno líquido.

Resultados: Los desinfectantes hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio disminuyeron la viabilidad en 49 y 37%, respectivamente, así como los métodos de secado con aire en la campana de flujo laminar y bomba de vacío con 36 y 28%, respectivamente. La pérdida de viabilidad fue menor cuando se desinfectó después de la inmersión en nitrógeno líquido; la germinación se estimuló con hipoclorito de sodio (100%).

Conclusión: Las semillas de *L. autumnalis* deben desinfectarse con hipoclorito de sodio y secarse con aire de la campana de flujo laminar después de la crioconservación por inmersión directa en nitrógeno líquido para evitar daños en los tejidos.

Palabras clave: crioconservación; almacenamiento de semillas; desinfectación y secado

Abstract

Introduction: *Laelia autumnalis* is an endemic orchid species from Mexico which is threatened by its habitat loss. In order to preserve this species disinfection and adequate drying methods are necessary developed of cryopreservation and *in vitro* culture technics.

Method: For a good long-term storage optimization the direct immersion technic in liquid nitrogen was considered in the first experiment (E1), however, asymbiotic germination was affected by the fungi *Alternaria* sp.; because of that, a second experiment was carried out with two assays in order to evaluate the seed viability and asymbiotic germination based on 1% (w/v) of calcium hypochlorite (CaCl_2O_2) and 15% (v/v) of commercial sodium hypochlorite (NaClO) as disinfection methods and using the air of laminar air-flow (A), silica gel (G) and vacuum pump (V) as drying methods before (E2) and after (E3) liquid nitrogen immersion (LN).

Results: Viability was reduced in 49% and 37% by CaCl_2O_2 and NaClO, respectively, while A and V drying methods were caused the highest viability loss (36 and 28%), respectively. The loss of viability in E3 was lower than E2 and it was observed a stimulation by NaClO in germination (100%).

Conclusion: These seeds must be disinfected with NaClO and dried using the air of laminar air-flow after cryopreservation by direct immersion in order to avoid plant tissues damage.

Keywords: cryopreservation; seed storage; disinfection and drying

Recibido en: 18/02/2019

Aceptado en: 01/08/2019

Introducción

Las poblaciones silvestres de *Laelia autumnalis*, una orquídea nativa de México, han estado sujetas al cambio en el uso del suelo y a la extracción masiva e ilegal de individuos reproductivos para satisfacer la demanda de los mercados. De seguir con esta actividad, esta especie pronto formará parte de la lista de especies amenazadas (Hernández-Muñoz *et al.*, 2013). Las inflorescencias de esta orquídea contienen flores púrpura vistosas, de diversas tonalidades, formas, tamaños y aromas, que se usan en festividades tradicionales por distintos pueblos indígenas desde la época prehispánica (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017). Para preservar el germoplasma de especies en peligro de extinción y amenazadas, es necesario establecer estrategias basadas en el desarrollo y optimización de protocolos para conservación y propagación *in vitro* (Popova *et al.*, 2016) acompañados de ensayos para reintroducir plantas en sitios de restauración (Bustam *et al.*, 2015).

Los bancos de semillas son una opción efectiva y viable para la conservación *ex situ* de plantas como las orquídeas (Merritt *et al.*, 2014), ya que la tolerancia de sus semillas a la desecación parece común y generalizada, lo que incrementa el potencial de almacenamiento entre -20 y 5 °C (Ossenbach *et al.*, 2007). Sin embargo, las semillas de algunas especies de orquídeas tienen poca vida de almacenamiento (Hay *et al.*, 2010), porque son pequeñas (± 0.04 mm) y carecen de endospermo, que es sustituido por embriones globulares (indiferenciados) dentro de testas relativamente transparentes con pocas células que contienen algunas reservas de lípidos (Hosomi *et al.*, 2012; Piri *et al.*, 2013).

Para semillas con poca vida de almacenamiento, se han obtenido métodos más efectivos y económicos para la conservación a largo plazo a través de la crioconservación. Como sucedió en las orquídeas *Cymbidium macrorhizon* y *Bletilla formosana* donde se utilizaron vitrificación y desecación para obtener porcentajes de viabilidad altos (82 y 86.80%, respectivamente) después

de su almacenamiento en nitrógeno líquido (Hirano *et al.*, 2011; Rung-Yi *et al.*, 2013). Después de la conservación a largo plazo y durante la germinación asimbiótica, los embriones pueden presentar más daños, ya que las semillas de orquídeas tienen que ser desinfectadas para evitar la contaminación durante el cultivo *in vitro* (Billard *et al.*, 2014); tomando en cuenta que esta etapa es un factor crítico del protocolo de crioconservación debe ser estrictamente controlada (Pence y Sandoval, 2002).

La superficie de la testa seminal al igual que otros tejidos vegetales albergan fácilmente bacterias, hongos y esporas, lo que dificulta su preparación y crecimiento mediante micropropagación aséptica (Stubblefield *et al.*, 2015), debido al éxito limitado en los protocolos de cultivo de tejidos se deben hacer pruebas con los compuestos o agentes desinfectantes como el hipoclorito de calcio y sodio, el cloruro de mercurio, los antibióticos y fungicidas para eliminar a los microorganismos sin afectar a los tejidos (Mng'omba *et al.*, 2012; Yildiz *et al.*, 2012). Aunque, estos desinfectantes pueden afectar la viabilidad como sucedió en semillas de *E. adenocaula*, donde la viabilidad aumentó 48.2% cuando utilizó Tween 80 en comparación con el 24.1% que se obtiene al desinfectar con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (Aguilar-Morales *et al.*, 2016). Por el contrario, existen reportes en donde el uso de desinfectantes aumenta el porcentaje de viabilidad y germinación como en las semillas de *Paphiopedilum* donde la tinción de embriones con sales de Cloruro de 2,3,5-Trifenil-Tetrazolio (TTC) fue 44.1% y germinación del 58.1% después del pretratamiento con NaClO al 0.5% durante 60 min, ya que al aumentar la dosis 1.0 o 1.5% y el tiempo de exposición 60 y 20 min, respectivamente estos disminuyeron, la viabilidad fue del 21.7 y 25.3% y la germinación fue de 11.7 y 12.8%, respectivamente (Fu *et al.*, 2016).

Los datos sobre la viabilidad de las semillas de orquídeas nativas de México después de años o décadas de almacenamiento son relativamente escasos, a pesar de que, determinar la viabilidad de las semillas y establecer el método de desinfección, son actividades fundamentales para desarrollar el método de conservación a largo plazo para la especie de interés en banco de germoplasma. Esta falta de información puede ocasionar que las semillas se almacenen a temperatura y humedad inadecuadas lo que provocaría pérdida de viabilidad (Aguirre-Bolaños *et al.*, 2017). Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación, fue evaluar el tipo de desinfectante y método secado en la viabilidad y germinación de semillas de *Laelia autumnalis* antes o después de la inmersión en nitrógeno líquido (-196 °C).

Método

Inmersión directa de semillas sin desinfectar (E1). Este experimento consistió en un ensayo preliminar en el cual se usaron los frutos maduros (cápsulas) de tres plantas de *L. autumnalis* pertenecientes al Banco de Germoplasma del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI). La semilla polvo (con humedad del 3%) se almacenó 30 d en recipientes de cristal de 14 mL de capacidad con tapa de corcho a temperatura ambiente (24 ± 1 °C). En el primer experimento se colocaron 40 mg de semilla polvo en dos crioviales de polipropileno de 2 mL de capacidad (Sarstedt®), 20 mg por criovial. Los crioviales se almacenaron durante 24 h en nitrógeno líquido (NL) aplicando la técnica de inmersión directa (ID). Transcurrido el tiempo de inmersión los crioviales se expusieron a la corriente de aire de la campana de flujo laminar durante 2 min. Con base en los resultados de este ensayo, se planteó la necesidad de desinfectar y secar las semillas antes o después de la inmersión en NL.

Desinfestación de semillas antes de la inmersión en nitrógeno líquido (E2). Se tomaron ocho muestras de semillas de 20 mg, cada muestra se colocó en sobres de papel filtro estéril de 1 cm²; cuatro sobres se desinfestaron con hipoclorito de sodio comercial (NaClO) al 15% (v/v 6% de i. a.) y cuatro con hipoclorito de calcio (CaCl₂O₂) al 1% (p/v) durante 15 min. Todos los sobres se enjuagaron en tres ocasiones con agua estéril, en condiciones asépticas. Seis muestras (tres por cada tipo de desinfectante) se secaron con los métodos siguientes: a) aire de la campana de flujo laminar sobre papel filtro en caja de petrí durante 20 min; b) en contenedor de cristal herméticamente cerrado con 50 g de gel de sílice durante 20 min y c) en matraz kitasato conectado a bomba de vacío en donde se realizó vacío durante 10 min. Después del secado, las semillas de cada sobre se colocaron en crioviales de polipropileno de 2 mL de capacidad (Sarstedt®) y se sumergieron en NL durante 24 h; junto con una muestra de semillas de cada tipo de desinfectante sin secar (Fig. 1). En total se evaluaron ocho tratamientos, que resultaron de la combinación de dos productos (hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio), tres métodos de secado (campana de flujo laminar, gel de sílice y bomba de vacío); además, se consideraron dos

tratamientos de semillas desinfestadas (con NaClO y CaCl₂O₂) sin secado. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (Fig. 1).

Desinfestación de semillas después de la inmersión en nitrógeno líquido (E3). Se colocaron dos muestras de 20 mg de semillas en crioviales de plástico con capacidad para 2 mL y se sumergieron en NL durante 24 h. Después, una muestra se desinfestó con NaClO al 15% y otra en CaCl₂O₂ 1% durante 15 min, posteriormente se lavaron tres veces con agua esterilizada en la campana de flujo laminar. En este ensayo el diseño experimental fue completamente al azar (Fig. 1).

En los tres ensayos, la unidad experimental fue de 0.3 mL de una suspensión de 5 mg de semilla polvo en 1 mL de agua para la variable viabilidad; y de un área de 1 cm² de caja petrí con 15 mg de semilla cultivadas en medio MS, para la variable germinación *in vitro*. Cada tratamiento se repitió tres veces.

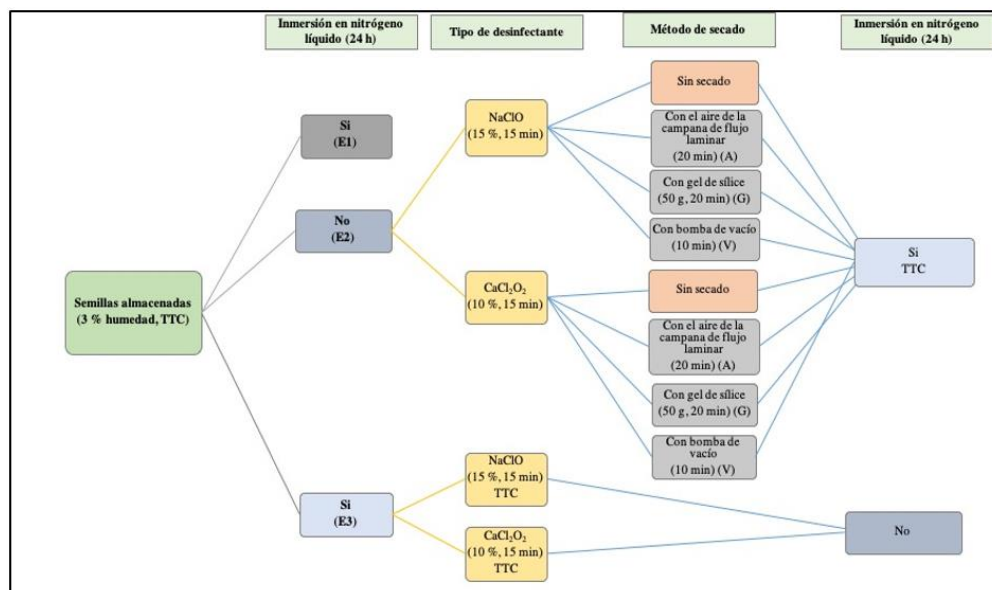


Fig. 1. Ruta criogénica en la técnica de inmersión directa para semillas maduras de *Laelia autumnalis*.

Sin desinfectar (E1), desinfestadas antes (E2) y después (E3) de la inmersión en nitrógeno líquido.

TTC = Prueba de viabilidad con sales de Cloruro de 2, 3, 5–Trifenil-Tetrazolio (TTC) al 1%.

Variables evaluadas

Viabilidad de semillas. De las muestras de 20 mg de cada tratamiento de los tres experimentos se tomaron 5 mg de semillas, se colocaron en tubos Eppendorf® de plástico de 2 mL de capacidad y se adicionó 1 mL de solución de sacarosa a 1% para mejorar la permeabilidad de la testa. Después de 24 h, la sacarosa se sustituyó por 1 mL de solución de sales de Cloruro de 2,3,5-Trifenil-Tetrazolio (TTC) al 1% (Lauzer *et al.*, 1994). Los tubos se mantuvieron a 40 °C durante 24 h. Para determinar la viabilidad de las semillas, de cada tratamiento se tomaron 0.3 mL de la mezcla de semillas y se colocaron en portaobjetos, de cada portaobjetos se seleccionaron tres áreas de 1 cm² y se tomaron imágenes digitales en microscopio estereoscopio marca Leica® modelo S6D con analizador de imágenes conectado a cámara Leica® EC3. En cada imagen digital se registró el número de semillas totales, teñidas de rojo carmín intenso (viables con tejido vivo y vigoroso), teñidas de rojo o rosa (potencialmente viables, tejido en deterioro) debido a la reducción del tetrazolio por la actividad respiratoria de las células (ISTA, 2015) y no teñidas o blancas (semillas no viables, tejido muerto). Con la suma de semillas de cada tipo se obtuvo el número total de semillas, que se usó como denominador para obtener los porcentajes de semillas viables, potencialmente viables y no viables de la siguiente forma: semillas viables (%) = (número de semillas viables/número total de semillas en 1 cm²) X 100. En cada variable (semillas viables, potencialmente viables y no viables) se utilizó el mismo procedimiento.

Germinación *in vitro*. El resto de las semillas (15 mg) de todos los tratamientos de los tres ensayos se suspendieron por separado en crioviales con 1 mL de agua esterilizada y posteriormente se colocaron en cajas de petrí con 20 mL de medio de cultivo Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina y 6 g L⁻¹ de agar. Las cajas fueron colocadas en el cuarto de incubación a temperatura de 24 °C ± 1 y con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad con intensidad lumínica de 40 µM m⁻² s⁻¹. A los 8 días después de la siembra (dds), de los 15 mg de semillas en la caja petrí de cada tratamiento se seleccionaron tres áreas de 1 cm² y mediante observación en el microscopio estereoscópico se cuantificó el número de semillas germinadas. El porcentaje de

germinación para todas las muestras se obtuvo de manera similar a lo descrito para porcentaje de viabilidad de las semillas.

Análisis estadístico. A los datos obtenidos en porcentajes de las variables respuesta de los experimentos E2 y E3 se les aplicaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov para confirmar la distribución normal y las de Bartlett y Levene para confirmar la homogeneidad de varianzas de las variables y los tratamientos. En E2 se llevó a cabo un anova factorial ($\alpha = 0.05$) para evaluar el efecto del tratamiento desinfectante ($n = 2$) en interacción con el tratamiento de secado ($n = 4$) previo a la inmersión en NL, en el porcentaje de semillas viables y germinadas, en total se probaron ocho tratamientos con tres repeticiones; además se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias entre tratamientos. En E2 también se realizó análisis de regresión ($P \leq 0.05$) entre el porcentaje de semillas potencialmente viables con el porcentaje de semillas germinadas *in vitro*, de las muestras desinfectadas con CaCl_2O_2 y secadas antes de la inmersión en nitrógeno líquido. En E3 se calcularon las pruebas t de Student para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de semillas viables y no viables y la germinación *in vitro* por efecto del tipo de desinfectante después de la inmersión en NL. Estos análisis se efectuaron con el programa SAS (Statistical Analysis System) versión 9.0 (Statistical Analysis System, 2002).

Resultados y Discusión

Inmersión directa de semillas sin desinfectar (E1). En los resultados del ensayo preliminar la obtención de imágenes de las semillas de *L. autumnalis* con 3% de humedad, almacenadas por 30 d sin tratar (muestra inicial), tratadas con TTC permitió la separación de las semillas en tres categorías: viables con embriones teñidos de rojo intenso carmín (88%), potencialmente viables con embriones de color rosa en proceso de deterioro (8%) y no viables con embriones blancos (4%) (Fig. 2). La presencia de semillas de baja viabilidad (embriones rosas) es común en los frutos de orquídeas, por esto es importante determinar la calidad fisiológica antes y después de la conservación (Hosomi *et al.*, 2012).

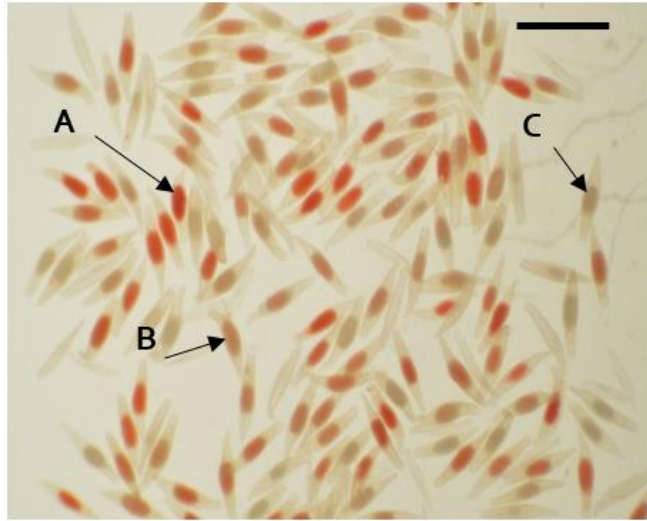


Fig. 2. Semillas de *Laelia autumnalis* teñidas por efecto de las sales de TTC. Semillas viables (A), semillas potencialmente viables (B) y semillas no viables (C) después de la inmersión en NL.

El porcentaje de semillas viables obtenido (88%) indica que *L. autumnalis* tiene capacidad de reproducción. Estos datos son similares a los obtenidos para *L. autumnalis* en otros reportes donde se han registrado porcentajes de germinación del 80 y 100% con fotoperiodos de 24 h luz y 16/8 h (luz/oscuridad) respectivamente (Vergara-Galicia *et al.*, 2010); en otras orquídeas como *Dendrobium officinale* se han reportado valores de germinación superiores (98.47 y 99.05%) al asociar la germinación *in vitro* con las cepas del hongo micorrízico JC-02 y JC-05 (Tan *et al.*, 2014).

Después de la inmersión en NL de semillas de *L. autumnalis* sin desinfección, se observó que, las estructuras de resistencia les permiten a los hongos tolerar bajas temperaturas (de Araújo *et al.*, 2015), ya que, las semillas presentaron formación de micelio de color blanco algodonoso que inició entre los 2 y 10 días después de la siembra (dds) con cambio a tonalidad ocre. A los 15 dds el micelio invadió por completo las cajas petrí y evitó la germinación. Aunque se sabe que los microorganismos se encuentran presentes en todos los órganos de las orquídeas en raíces, cápsulas, semillas y también en plántulas cultivadas *in vitro* (Ávila-Díaz *et al.*, 2013), la exposición rápida al nitrógeno líquido y el recalentamiento pueden inducir agrietamiento de la

testa produciendo daño en las semillas, lo que probablemente permite la eclosión de microorganismos y la contaminación (Khanna *et al.*, 2014).

En éste estudio, el hongo contaminante se identificó como *Alternaria* sp, ya que registró colonias con crecimiento radial de color oscuro así como conidióforos, la mayoría simples, cortos o alargados, generalmente una cadena ramificada de conidios; conidios café oscuro, normalmente con las células transversales y longitudinales septadas; de diversas formas, ovoclavadas, elípticas u ovoides, con frecuencia acropétalas en largas cadenas; características que coinciden con las descritas por Barnett y Hunter (1998) para este género (Fig. 3).

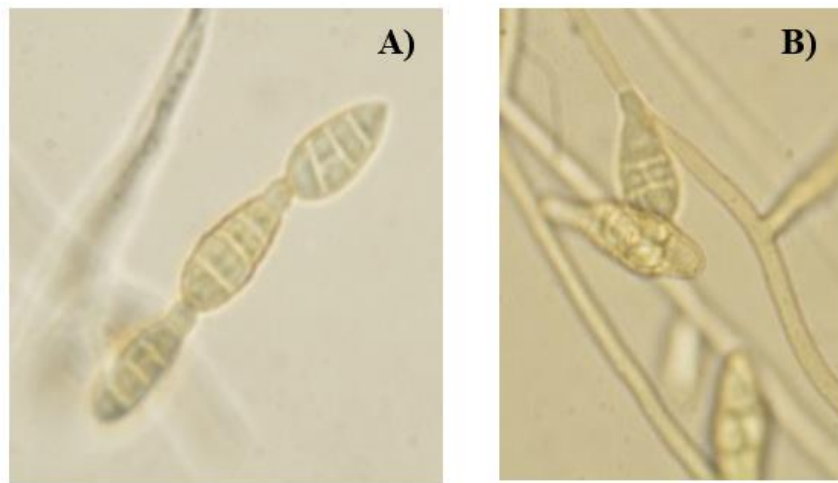


Fig. 3. Estructuras del hongo *Alternaria* sp., identificado como agente contaminante en cultivo *in vitro* de semillas de *L. autumnalis* después de la inmersión directa en nitrógeno líquido.

A) Cadena de conidios, y **B)** Conidio con las células transversales y longitudinales septadas.

La presencia del hongo *Alternaria* también se ha confirmado mediante evidencia molecular en semillas de *Laelia speciosa* desde la germinación hasta los primeros estadios de desarrollo *in vitro*, sin embargo, no formó pelotones característicos de hongos micorrízicos por lo que se reporta que actúa como patógeno de orquídeas (Ávila-Díaz *et al.*, 2013). En semillas de *Jatropha curcas* después de la crioconservación se reportó la presencia de hongos del género *Aspergillus* en forma predominante durante los períodos de almacenamiento a 30, 60 y 90 días (Goldfarb *et*

al., 2010), y se confirmó la tolerancia de este hongo a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C).

Desinfestación de semillas antes de la inmersión en nitrógeno líquido (E2).

Semillas viables. Los factores tipo de desinfectante y método de secado influyeron de manera independiente y en interacción en la viabilidad de las semillas (Cuadro 1). La desinfestación con NaClO redujo la viabilidad en comparación con CaCl₂O₂ (Fig. 4), esto concuerda con otros reportes donde se asoció la disminución de la viabilidad de 70 a 18% en semillas de *Paphiopedilum wardii* Sumerh con hipoclorito de sodio a 1.0% durante 90 min, que podría deberse al daño de la semilla causado por el periodo de los tratamientos (Zeng *et al.*, 2012); mientras que el incremento del 5 al 10% en la concentración de CaCl₂O₂ provocó disminución de la viabilidad de 73 a 14% en semillas de *Phalaenopsis* spp. (Mweetwa *et al.*, 2008). El NaClO erosiona parcialmente la cubierta seminal y mejora la permeabilidad al oxígeno; también es posible que el NaClO alcance algunas células del embrión y afecte las propiedades de la membrana celular, por lo tanto, tenga efectos perjudiciales sobre las actividades metabólicas de las células tratadas con NaClO (Kaneko y Morohashi, 2003).

Cuadro 1. Análisis de varianza de porcentaje de semillas viables de *Laelia autumnalis* en los factores tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	F	Pr>F
Desinfectante (D)	1	2433.71	2433.71	111.71	<.0001
Método de secado (S)	3	7311.86	2437.28	111.88	<.0001
D*S	3	816.50	272.16	12.49	0.0002

GL= Grados de Libertad, SC= Suma de Cuadrados, CM= Cuadrado Medio, F= Valor de F, Pr= Probabilidad.

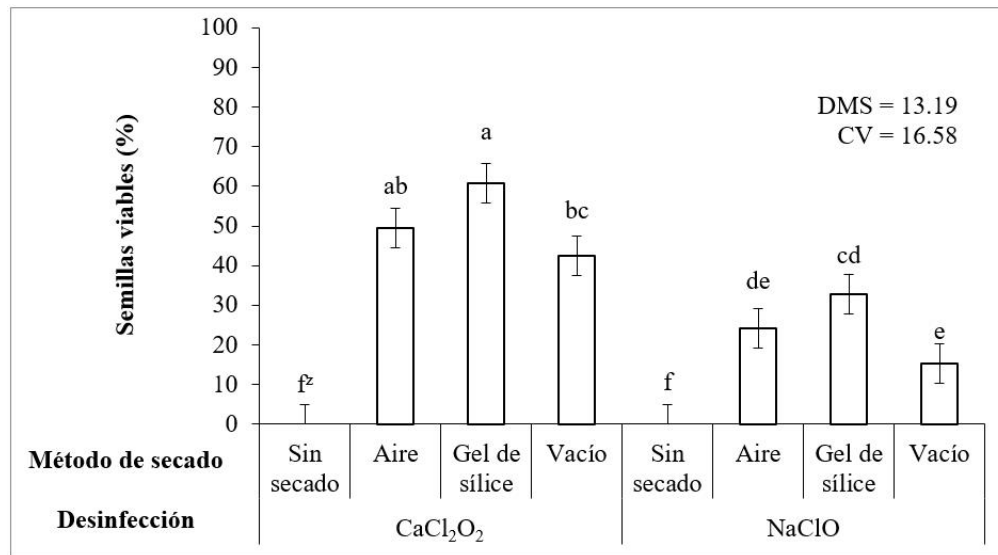


Fig. 4. Viabilidad de semillas de *Laelia autumnnalis* en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Las semillas fueron teñidas con las sales de TTC (E2).

DMS = Diferencia Mínima Significativa. **CV** = Coeficiente de Variación. ^zMedias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar.

En la presente investigación fue evidente la muerte de los embriones de las semillas sin secar, ya que es posible que el agua promoviera la formación intracelular de cristales de hielo durante la inmersión en NL (Fig. 4). La viabilidad fue estadísticamente superior ($P > F = 0.001$; G.L. = 7; $P \leq 0.05$) en semillas secadas con gel de sílice en contraste con aquellas secadas al aire de la campana de flujo laminar y con bomba de vacío. El tratamiento de desinfección con CaCl₂O₂ y secado con gel de sílice registró el porcentaje mayor (60.84) de semillas viables, estadísticamente igual al tratamiento con CaCl₂O₂ y secado con aire de la campana de flujo laminar (Fig. 4). En *Bletilla formosana* las semillas con contenido de agua del 48.9% presentaron una viabilidad y germinación de 1.8 y 2.3% después de la inmersión en NL; mientras que las semillas de la misma especie sometidas a deshidratación por 24 h o a gel de sílice por 1 h antes de la inmersión en NL mostraron incrementos en la viabilidad 44.9 y 86.8% (Rung-Yi *et al.*, 2013). En general las semillas de muchas orquídeas son tolerantes a la desecación (Merritt *et al.*, 2014), aunque la inmersión en productos como el CaCl₂O₂ y NaClO puede ocasionar blanqueamiento del

revestimiento de las semillas e hinchazón de los embriones, además de la degradación de la lignina en la testa de las semillas (Bae *et al.*, 2014; Barsberg *et al.*, 2013).

Se ha documentado que las técnicas de desinfestación y tratamientos previos al cultivo *in vitro* pueden reducir la contaminación, aunque generan impactos negativos en las plántulas desarrolladas (Teixeira da Silva *et al.*, 2016). En *Cattleya*, también se reporta la presencia de semillas que se tornan de color rosa después de la tinción con tetrazolio, la técnica se modificó para 10 mg de semillas, se incubaron en solución de sacarosa al 10% (p/v) por 24 h a 25 °C, y se lavaron con agua destilada para adicionar solución de TTC al 1% por 24 h a 40 °C; la germinación *in vitro* corroboró que éstas eran viables (Hosomi *et al.*, 2012).

Semillas potencialmente viables. La desinfestación con NaClO y secado con gel de sílice y con CaCl₂O₂ y secado con bomba de vacío, presentaron los porcentajes mayores de semillas en proceso de deterioro (29.23 y 23.52, respectivamente) (Fig. 5). La presencia de semillas potencialmente viables se registró también en las semillas sin tratar (muestra inicial). Esto confirma que la viabilidad de las semillas es afectada por otros factores además de los descritos en este estudio, como maduración de la cápsula ya que parte del extremo floral se extiende hasta el pedúnculo, por lo que, en el momento de la cosecha las semillas pueden haber alcanzado diferentes niveles de madurez y afectar la respuesta en la prueba de TTC (Hosomi *et al.*, 2012).

Semillas no viables. Con excepción de los tratamientos sin secado, en donde murieron todos los embriones, la cantidad de semillas no viables fue mayor (64 y 63%, respectivamente) al combinar la desinfestación con NaClO y secado con bomba de vacío y corriente de aire (Fig. 6). Estos dos métodos de secado son más rápidos que el secado por gel de sílice, pero son más agresivos y reducen la viabilidad de las semillas de *Laelia autumnalis*. El NaClO también ocasionó la pérdida de viabilidad en semillas de las orquídeas epifitas *Bifrenaria nodora*, *Cattleya bicolor*, *Cattleya inetmedia*, *Encyclia pygmaea*, *Epidendrum fulgens*, *Oncidium pumilum* y *Pleurothallis gumacea* y su efecto estuvo relacionado con la concentración y tiempo de exposición (Álvarez-Pardo *et al.*, 2006); además, es posible que el triple enjuague que se aplicó a las muestras desinfestadas, no eliminó completamente todos los componentes de la solución de NaClO que mantuvo efecto residual en las semillas (Silva *et al.*, 2015).

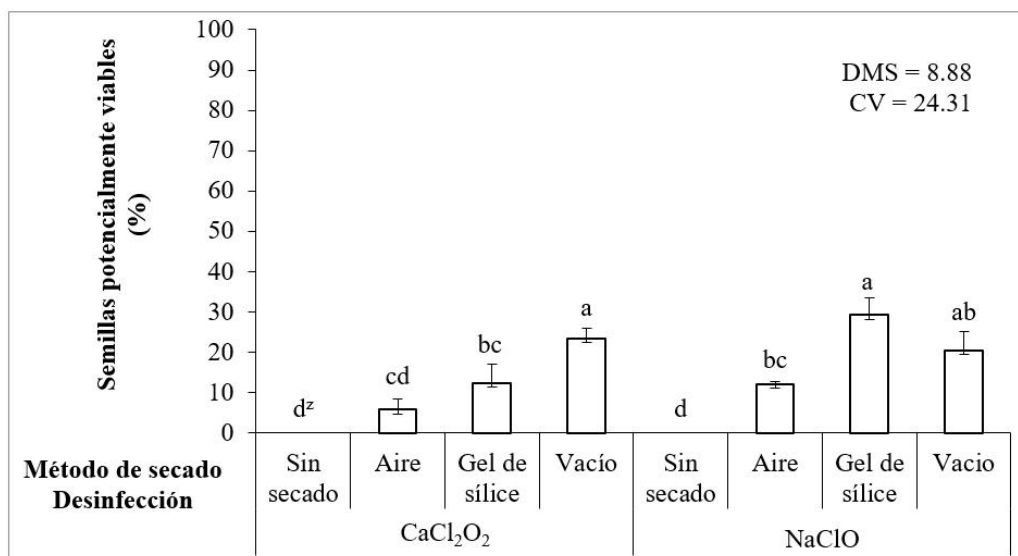


Fig. 5. Semillas de *Laelia autumnalis* potencialmente viables en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Las semillas fueron teñidas con las sales de TTC (E2).

DMS = Diferencia Mínima Significativa. **CV** = Coeficiente de Variación. ^zMedias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar.

La asociación entre el CaCl₂O₂ y secado con gel de sílice produjo la menor pérdida de viabilidad (26%) por lo que puede ser considerado como el método más adecuado para la desinfección de semillas antes de la crioconservación (Fig. 6).

Germinación in vitro. El tipo de desinfectante y método de secado afectaron de manera independiente y en interacción la germinación *in vitro* de semillas expuestas en NL por 24 h (Cuadro 2). Esto indica que hay correspondencia entre las pruebas de viabilidad y germinación de las semillas. Datos similares, se encontraron en la orquídea *Dactylorhiza fuchsii* que registró porcentajes de germinación de 89.7 y de viabilidad de 84.8 (Colville *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Análisis de varianza de porcentaje de germinación de semillas de *Laelia autumnalis* en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	F	Pr>F
------------------------	----	----	----	---	------

Desinfectante (D)	1	6979.58	6979.58	1441.98	<.0001
Método de secado (S)	3	18958.37	6319.45	1305.59	<.0001
D*S	3	2341.92	780.64	161.28	<.0001

GL= Grados de Libertad, SC= Suma de Cuadrados, CM= Cuadrado Medio, F= Valor de F, Pr= Probabilidad.

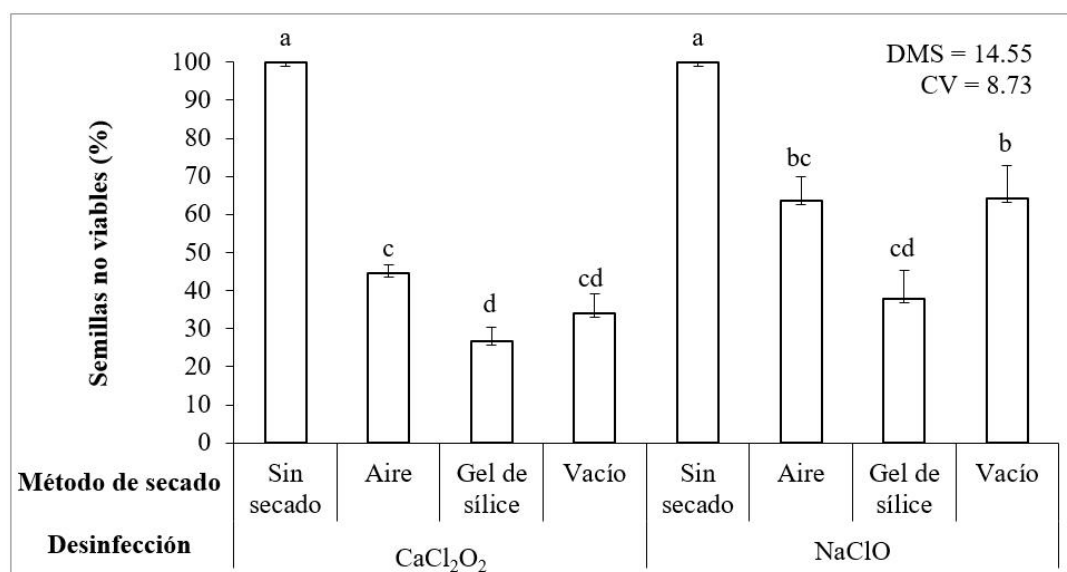


Fig. 6. Semillas no viables de *Laelia autumnalis* en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Las semillas fueron teñidas con las sales de TTC (E2).

DMS = Diferencia Mínima Significativa. **CV** = Coeficiente de Variación. ²Medias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar.

La germinación *in vitro* se redujo 34.1% en promedio al desinfectar las semillas con NaClO, comparadas con las desinfectadas con CaCl₂O₂. Los métodos de secado también influyeron en la germinación, las semillas secadas con aire de la campana de flujo laminar germinaron en promedio 8 y 30% más que las secadas en gel de sílice y bomba de vacío. El tratamiento de desinfección con CaCl₂O₂ y el secado en aire de la campana de flujo laminar, promovió la germinación de las semillas (94.48%); la sustitución de NaClO con este mismo método de secado redujo en 47.8% la germinación (Fig. 7).

Aunque los embriones de las semillas potencialmente viables presentaron tinción en la prueba de TTC (color rosa), se infiere que sólo algunas pudieron germinar, ya que el porcentaje de germinación estuvo correlacionado de manera negativa ($R^2 = -0.88$, $P \leq 0.05$) con la presencia de semillas potencialmente viables (Fig. 8). Estos resultados contrastan con los obtenidos con *Cattleya walkeriana* y *C. tigrina* en donde fue necesario considerar las semillas viables (color rojo) y potencialmente viables (color rosa) para calcular con mayor precisión el porcentaje de germinación (Hosomi *et al.*, 2011).

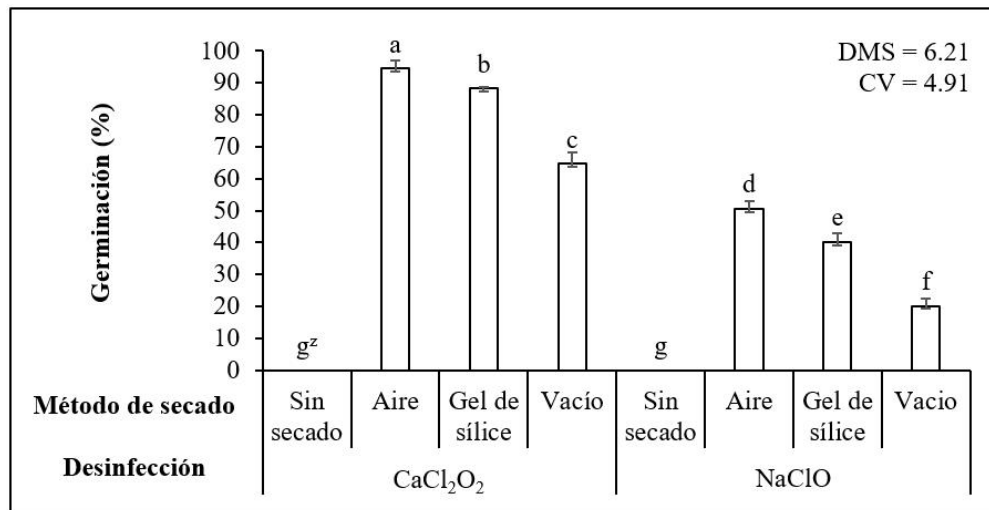


Fig. 7. Germinación *in vitro* de semillas de *Laelia autumnalis* en función del tipo de desinfectante y método de secado antes de la inmersión en nitrógeno líquido (E2). **DMS** = Diferencia Mínima Significativa. **CV** = Coeficiente de Variación. ^zMedias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las líneas sobre cada barra indican la desviación estándar.

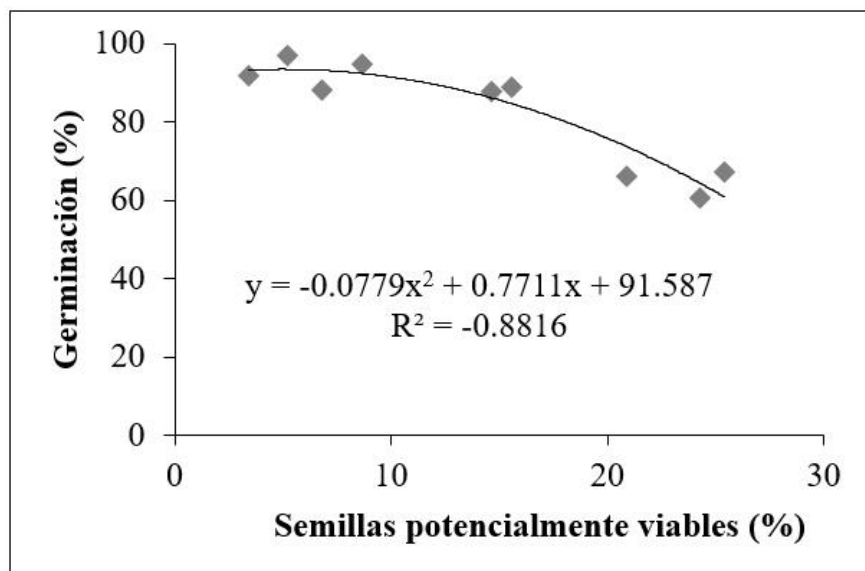


Fig. 8. Modelo de regresión para estimar la relación entre el porcentaje de semillas potencialmente viables y el porcentaje de germinación *in vitro* (E2) de semillas de *L. autumnalis* en nueve muestras desinfectadas con CaCl_2O_2 antes de la inmersión en nitrógeno líquido.

Desinfestación de semillas después de la inmersión en nitrógeno líquido (E3)

Viabilidad de semillas. La desinfestación de las semillas después de la inmersión en NL no afectó la viabilidad, ya que el número de semillas viables por efecto de los desinfectantes CaCl_2O_2 y NaClO fue superior a 90% y estadísticamente similar entre éstos (Fig. 9A). Por lo cual, se considera que los resultados obtenidos con este método (E3) son superiores a los obtenidos en el experimento 2 (E2) porque evita humedecer y secar la semilla antes de la inmersión en nitrógeno líquido; es probable que el tipo de desinfectante y método de secado previos a la inmersión en NL causen algún daño a los tejidos de la testa y el embrión lo que disminuye la viabilidad y germinación de las semillas de *L. autumnalis*. La testa de las orquídeas está formada principalmente por lignina, proteínas y celulosa (Barsberg *et al.*, 2013), funciona como protección para el embrión al retener la humedad, por lo que, aumenta la durabilidad y viabilidad de las semillas (Aybeke, 2014).

En el tratamiento con CaCl_2O_2 no se observaron semillas sin teñir o no viables (Fig. 9B), lo que sugiere que el CaCl_2O_2 afectó la composición química o física de la testa de las semillas, permitió la penetración del TTC y mejoró la tinción de los embriones. Algunas sustancias que se utilizan como desinfectantes, pueden producir blanqueamiento en las semillas y generar sesgos en las pruebas de viabilidad (Lemay *et al.*, 2015); situación que se ha reportado en semillas de otras orquídeas como *Paphiopedilum* donde el NaOCl provocó el blanqueamiento de la testa (Fu *et al.*, 2016), además, algunos desinfectantes como el NaOCl provoca la escarificación de algunas semillas como se reportó para la orquídea *Dactylorhiza fuchsii* (Custódio *et al.*, 2016).

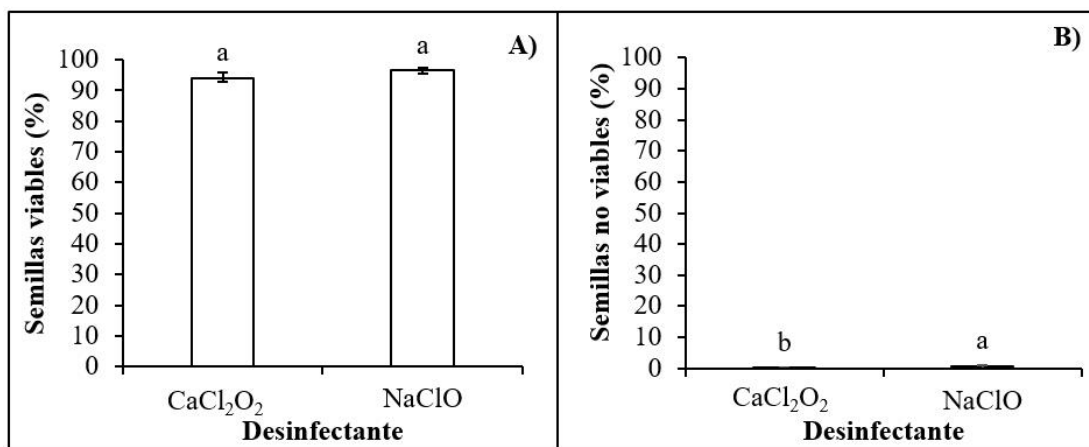


Fig. 9. Efecto del tipo de desinfectante en la viabilidad de las semillas de *L.*

autumnalis desinfectadas después de la inmersión en NL.

A) Semillas viables, B) Semillas no viables (E3).

Germinación in vitro de semillas. De forma similar a lo observado en el porcentaje de semillas viables (Fig. 10), la desinfectación de semillas con NaClO y CaCl_2O_2 después del proceso de crioconservación en NL, no afectó la germinación *in vitro* (Fig. 10). Contrario a nuestros resultados, en otras orquídeas como *Calanthe discolor* Lindl. se han reportado estímulos en la germinación de 88.2% por efecto del NaClO (25%) comparado con el testigo sin desinfectar (Bae *et al.*, 2015). Sin embargo, algunos reportes indican disminución en los porcentajes de germinación para semillas de *Oncidium longicornu* y *O. bifolium* con concentraciones de NaClO mayores al 0.5% (Billard *et al.*, 2014).

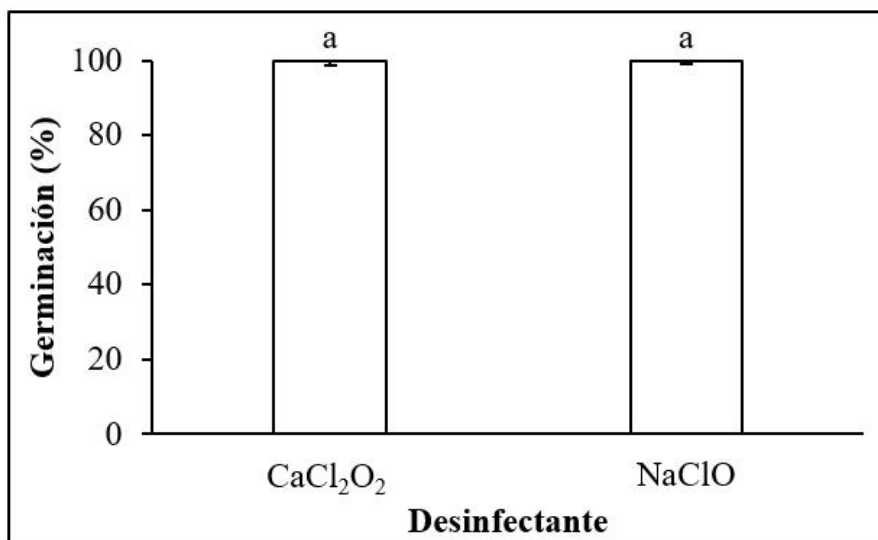


Fig. 10. Efecto del tipo de desinfectante sobre la germinación de semillas de *Laelia autumnalis* después de la inmersión en nitrógeno líquido (E3).

Las semillas de *Phaius tankervilleae* desinfectadas con NaClO (1% cloro disponible) adicionado con Tween-20 al 0.05% durante 10 min, previo a la exposición de la solución vitrificadora (PVS2) de 0 - 120 min no sobrevivieron, debido probablemente a la adición de humedad durante la desinfección (Hirano *et al.*, 2009). Para las semillas de *L. autumnalis* estudiadas en esta investigación ocurrió algo similar cuando éstas fueron desinfectadas antes de la inmersión en NL, por tal motivo para la crioconservación exitosa se recomienda desinfectar las semillas maduras después de la inmersión a NL.

Conclusiones

El tipo de desinfectante y método de secado afectan la viabilidad y germinación *in vitro* de semillas de *Laelia autumnalis*. Los resultados indican que las semillas deben desinfectarse con CaCl₂O₂ y secarse con aire de la campana de flujo laminar después de la crioconservación por inmersión directa para evitar daños en los tejidos.

Referencias

- Aguirre-Bolaños, M., Benítez-Flores, J. C., González-Valle, M. R., Hernández-Portilla, L. B., Quintanar-Zúñiga, R. E. y Flores-Ortiz, C. M. (2017). Efecto del almacenamiento prolongado sobre la viabilidad y perfil de ácidos grasos en semillas de *Encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 40(2): 151.
- Aguilar-Morales, M. A., Laguna-Cerda, A., Vences-Contreras, C. and Lee-Espinosa, H. E. (2016). Análisis de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) para su conservación *ex situ*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(7): 1741-1747.
- Álvarez-Pardo, V. M., Ferreira, A. G. and Nunes, V. F. (2006). Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Horticultura Brasileira*. 24(2): 217-220.
- Ávila-Díaz, I., Garibay-Orijel, R., Magaña-Lemus R. E. and Oyama, K. (2013). Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. *Botanical Sciences*. 91(4): 523-529.
- Aybeke, M. (2014). Morphological and histochemical investigations on *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P. Delforge (Orchidaceae) seeds. *Plant systematics and evolution*. 300(1): 91-97.
- Bae, H. K., Oh, K. H. and Kim, S. Y. (2015). *In vitro* seed germination and seedling growth of *Calanthe discolor* Lindl. *Plant Breeding and Seed Science*. 71(1): 109-119.
- Bae, K. H., Oh, K. H. and Kim, S. Y. (2014). Sodium hypochlorite treatment and light-emitting diode (LED) irradiation effect on *in vitro* germination of *Oreorchis patens* (Lindl.) Lindl. *Journal of Plant Biotechnology*. 41(1): 44-49.
- Barnett, H. L. and Hunter B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th ed. Burgess Publishing Company Minneapolis, Minesota USA. 227 p.
- Barsberg, S., Rasmussen, H. N. and Kodahl, N. (2013). Composition of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) seeds analyzed by attenuated total reflectance IR spectroscopy: In search of understanding longevity in the ground. *American Journal of Botany*. 100(10): 2066-2073.
- Billard, C. E., Dalzotto, C. A. y Lallana, V. H. (2014). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica*. 38: 145-157.

- Bustam, B. M., Dixon, K. and Bunn, E. (2015). A cryopreservation protocol for *ex situ* conservation of terrestrial orchids using asymbiotic primary and secondary (adventitious) protocorms. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 52(2): 185-195.
- Colville, L., Marks, T. R., Pritchard, H. W., Custódio, C. C. and Machado-Neto, N. B. (2016). Development of a reliable GC-MS method for fatty acid profiling using direct transesterification of minimal quantities of microscopic orchid seeds. *Seed Science Research*. 26(1): 84-91.
- Custódio, C. C., Marks, T. R., Pritchard, H. W., Hosomi, S. T. and Machado-Neto, N. B. (2016). Improved tetrazolium viability testing in orchid seeds with a thick carapace (*Dactylorhiza fuchsii*) or dark seed coat (*Vanda curvifolia*). *Seed Science and Technology*. 44(1): 177-188.
- de Araújo D. R., Almeida, F. D. A. C., Gomes, J. P., Neto, A. F. y Alves, N. M. C. (2015). Incidencia de hongos y producción de aflatoxina en semillas de maní crioconservadas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 16(1): 136-147.
- Goldfarb, M., Duarte, M. E. M. and Mata, M. E. R. C. (2010). Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. *Revista Biotemas* 23(1): 27-33.
- Hay, F. R., Merritt, D. J., Soanes, J. A. and Dixon, K. W. (2010). Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 164(1): 26–41.
- Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., López P. A., De La Cruz-Torres, E., Martínez-Palacios, A., Fernández-Pavía, S. P. y Chávez-Bárceñas A. T. (2017). Estimulación de la germinación y desarrollo *in vitro* de *Laelia autumnalis* con rayos gamma. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 40(3): 271-283.
- Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., Morales-García, J. L., Guillén-Andrade, H., López, P. A. and Téllez-Velasco, M. A. A. (2013). Phenotypic characterization of Mexican orchid *Laelia autumnalis*. *Acta Horticulturae*. 977: 245-252.
- Hirano, T., Yukawa, T., Miyoshi, K. and Mii, M. (2011). Wide applicability of cryopreservation with vitrification method of seeds of some *Cymbidium* species. *Plant Biotechnology*. 28(1): 99–102.

- Hirano, T., Godo, T., Miyoshi, K., Ishikawa, K., Ishikawa, M., and Mii, M. (2009). Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. *Plant Biotechnology Reports*. 3(1): 103-109.
- Hosomi, S. T., Custódio, C. C., Seaton, P. T., Marks T. R. and Machado-Neto, N. B. (2012). Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 48(1):127-136.
- Hosomi, S. T., Santos, R. B., Custódio, C. C., Seaton, P. T., Marks, T. R. and Machado-Neto, N. B. (2011). Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Science and Technology*. 39(1): 178-189.
- ISTA (2015). International rules for seed testing: International Seed Testing Association (ISTA). *Seed Science and Technology*. 27: 50-52.
- Fu, Y., Jiang N., Wu K. L., Zhang, J. X., Teixeira Da Silva, J. A., Duan, J., Liu, H. T. and Zeng, S. J. (2016). Stimulatory effects of sodium hypochlorite and ultrasonic treatments on tetrazolium staining and seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum* SCBG Red Jewel. *Seed Science and Technology*. 44(1): 77-90.
- Kaneko, Y. and Morohashi, Y. (2003). The effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amylase activity in mung bean cotyledons. *Plant Science*. 164(2): 287-292.
- Khanna, S., Jenkins, H., Bucalo, K., Determann, R. O., Cruse-Sanders, J. M. and Pullman, G. S. (2014). Effects of seed cryopreservation, stratification and scarification on germination for five rare species of pitcher plants. *CryoLetters*. 35(1): 29-39.
- Lauzer, D., St.-Arnaud, M. and Barabe, D. (1994). Tetrazolium staining and *in vitro* germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 9, 197-204.
- Lemay, M. A., De Vriendt, L., Pellerin, S. and Poulin, M. (2015). *Ex situ* germination as a method for seed viability assessment in a peatland orchid, *Platanthera blephariglottis*. *American Journal of Botany*. 102(3): 390-395.
- Merritt, D. J., Hay, F. R., Swarts, N. D., Sommerville, K. D. and Dixon, K. W. (2014). *Ex situ* conservation and cryopreservation of orchid germplasm. *International Journal of Plant Sciences*. 175(1): 46-58.

- Mng'omba, S. A., Sileshi, G., du Toit, E. S. and Akinnifesi, F. K. (2012). Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures. InTech Open Access Publisher. Fungicides for Plant and Animal Diseases. 13(1): 245-254.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. 15(3): 473-497.
- Mweetwa, A. M., Welbaum, G. E. and Tay, D. (2008). Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on *in vitro* germinability of *Phalaenopsis* seeds. *Scientia Horticulturae*. 117(3): 257-262.
- Ossenbach C., Arce J. y Warner, J. (2007). Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas. *Tierra Tropical*. 3(1): 47-59.
- Pence, V. C. and Sandoval, J. A. (2002). Controlling Contamination during *in vitro* collecting. En *In Vitro Collecting Techniques for Germplasm Conservation*; Pence, V. C.; Sandoval, J. A.; Villalobos, V. M. and Engelmann F. (Eds). International Plant Genetic Resources Institute: Rome, Italy. 30–40 p.
- Piri, H., Pathak, P. and Bhanwra, R. K. (2013). Asymbiotic germination of immature embryos of a medicinally important epiphytic orchid *Acampe papillosa* (Lindl.) Lindl. *African Journal of Biotechnology*. 12(2): 162-167.
- Popova, E., Kim, H. H., Saxena, P. K., Engelmann, F. and Pritchard, H. W. (2016). Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. *Biotechnology advances*. 34(4):380-403.
- Rung-Yi W., Shao-Yu, C., Ting-Fang, H. and Yu-Sen, C. (2013). Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation. *Scientia Horticulturae*. 157: 108-112.
- SAS Institute Business Systems Analyst Salaries. (2002). SAS version 9.0. SAS Institute, North Carolina. 4424 p.
- Silva, L. C., Paiva, R., Vargas, D. P., Silva, D. P. C. D., Barbosa, S. And Herrera, R. C. (2015). Decontaminant solution on *in vitro* growth of *Byrsonima intermedia* seedlings. *Ciência Rural*. 45(4): 674-679.
- Stubblefield, J. M., Newsome, A. L. and Cahoon, A. B. (2015). Surface decontamination of plant tissue explants with chlorine dioxide gas. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 51(2): 214-219.

- Tan, X. M., Wang, C. L., Chen, X. M., Zhou, Y. Q., Wang, Y. Q., Luo, A. X., Liu, Z. H. and Guo, S. X. (2014). *In vitro* seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.). *Scientia Horticulturae*. 165: 62-68.
- Teixeira da Silva J. A. T., Winarto, B., Dobránszki, J., Cardoso, J. C. and Zeng, S. (2016). Tissue disinfection for preparation of *Dendrobium in vitro* culture. *Folia Horticulturae*. 28(1): 57-75.
- Vergara-Galicia, J., Aguirre-Crespo, F., Castillo-España, P., Arroyo-Mora, A., López-Escamilla, A. L., Villalobos-Molina, R. and Estrada-Soto, S. (2010). Micropropagation and vasorelaxant activity of *Laelia autumnalis* (Orchidaceae). *Natural product research*. 24(2): 106-114.
- Yildiz, M., Fatih Ozcan, S., T. Kahramanogullari C. and Tuna, E. (2012). The effect of sodium hypochlorite solutions on the viability and *in vitro* regeneration capacity of the Tissue. *The Natural Products Journal*. 2(4): 328-331.
- Zeng, S., Wu, K., da Silva, J. A. T., Zhang, J., Chen, Z., Xia N. and Duan, J. (2012). Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. *Scientia Horticulturae*. 138:198-209.