

Crioconservación de *Laelia speciosa* en peligro de extinción Cryopreservation of *Laelia speciosa* in danger of extinction

C. Medina-Mendoza ^{a,*}, J. L. Rodríguez-de-la-O ^b, Y. Mendoza-Tolentino ^c

^a Programa Educativo de Procesos Alimentarios, Universidad Tecnológica del Valle del Mezquital, 42300, Ixmiquilpan, Hidalgo, México.

^b Departamento de Fitotecnia, Academia de Genética, Universidad Autónoma Chapingo, 56230, Chapingo, Estado de México, México.

^c Programa Educativo de Energías Renovables, Universidad Tecnológica del Valle del Mezquital, 42300, Ixmiquilpan, Hidalgo, México.

Resumen

Dentro de la diversidad que México posee, se encuentran las orquídeas, de las cuales el 44 por ciento son endémicas. Los bancos de germoplasma son una alternativa para el rescate y preservación de innumerables recursos. El objetivo del trabajo fue crioconservar a *Laelia speciosa* empleando las técnicas de encapsulación-deshidratación y vitrificación. La micropropagación fue en medio Murashige y Skoog con extracto de malta (500 mg·L⁻¹). La encapsulación se realizó con protocormos con alginato de sodio, 0.75 M de cloruro de calcio, pre-tratamiento de 0.75 M durante 24 horas y expuestas a gel de sílice por 5 horas, obteniendo de 80 a 100 por ciento de sobrevivencia y regeneración. Para el protocolo de vitrificación los protocormos se pre-cultivaron en 0.3 M de sacarosa durante 3 días, 20 min en tratamiento de carga y deshidratación con PVS2 por 60 min obteniendo 100 por ciento de sobrevivencia y regeneración. Por lo cual, se establecieron los protocolos para conservar a *Laelia speciosa* a largo plazo.

Palabras Clave: encapsulación, deshidratación, vitrificación, regeneración, *in vitro*.

Abstract

Among the diversity that Mexico possesses are orchids, 44 percent of which are endemic. Germplasm banks are alternative for the rescue and preservation of innumerable resources. The objective of this work was to cryopreserve *Laelia speciosa* using encapsulation-dehydration and vitrification techniques. Micropropagation was in Murashige and Skoog medium with malt extract (500 mg·L⁻¹). Encapsulation consisted of protocorms with sodium alginate, 0.75 M calcium chloride, 0.75 M pretreatment for 24 hours and exposed to silica gel for 5 hours, obtaining of 80 to 100 percent survival and regeneration. For the vitrification protocol, the protocorms were pre-cultured in 0.3 M sucrose for 3 days, 20 min in loading treatment and dehydration with PVS2 for 60 min, obtaining 100 percent survival and regeneration. Therefore, protocols for long-term preservation of *Laelia speciosa* were established.

Keywords: encapsulation, dehydration, vitrification, regeneration, *in vitro*.

1. Introducción

México es un país con grandes contrastes geográficos y diversidad de climas que determinan una flora muy amplia. Una parte de esta diversidad son las orquídeas, cuya exotividad, reviste interés económico y son consideradas las ornamentales más codiciadas a nivel mundial (Ávila y Oyama, 2002). La amplia distribución del taxa lo hace más vulnerable por la destrucción de sus hábitats. De las 35,000 especies de la familia, 1,106 se encuentran en México, de las cuales 44 por ciento son endémicas (Téllez, 2005). A nivel mundial existe una gran problemática por la pérdida de recursos fitogenéticos, siendo los bancos de germoplasma una alternativa para el

rescate y preservación de recursos. *Laelia speciosa* es una orquídea epífita que produce flores grandes de 10 a 16 cm de diámetro. Se le considera como una de las más bellas del género y quizá más notable dentro de las orquídeas. En México se conocen más de 1,200 especies de orquídeas (Aguilar, 2006), de las cuales 181 se registran en alguna categoría de riesgo en la Norma Oficial vigente (NOM-059-ECOL-2001); 72 son endémicas, 58 en categoría de amenaza y *L. speciosa* se encuentra Sujeta a Protección Especial (SEMARNAT, 2002).

Los métodos de crioconservación permiten el rescate y preservación de especies de interés durante largos periodos, resultando una alternativa para la conservación de especies vegetales como complemento a las colecciones y bancos de

*Autor para la correspondencia: cmedina@utvm.edu.mx

Correo electrónico: cmedina@utvm.edu.mx (Carmen Medina-Mendoza), jrodriguez@chapingo.mx (José Luis Rodríguez-de-la-O), ymendoza@utvm.edu.mx (Yucundo Mendoza-Tolentino).

germoplasma clásicos (Elliott *et al.*, 2017). El proceso consiste en la preparación, mantenimiento y preservación a largo plazo del material vegetal, en condiciones de temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nitrógeno líquido) (Giwa *et al.*, 2017). Es un método rápido, sencillo, no altera la estabilidad genética y reduce sustancialmente el esfuerzo y costos que representa el mantenimiento de colecciones de germoplasma vegetal *in vivo*, así como el rescate de plantas endémicas (Briard *et al.*, 2016; Elliott *et al.*, 2017). Los métodos criogénicos permiten conservar germoplasma vegetal, los más utilizados para ápices y embriones son: encapsulación-deshidratación, vitrificación, gota-vitrificación, encapsulación-vitrificación y crio-lámina (González-Arno y Engelmann, 2013), la sobrevivencia de los explantes está en función de la fisiología (tejido seleccionado), las características de la planta o del tejido vegetal, además de la técnica empleada (Reed, 2008). Trabajos realizados por: Gonzalez y Engelma (2006), Engelmann (2004), Thammasiri (2000), Wood *et al.* (2000), Flachsland *et al.*, (2006), Ishikawa *et al.*, (2004), Hirano *et al.* (2005a y b) y Cui *et al.* (2021), emplean técnicas para la crioconservación de diversas especies incluyendo a las orquídeas, de los cuales se han obtenido resultados satisfactorios. Debido a que *L. speciosa* es una planta que se encuentra Sujeta a Protección Especial de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001, es necesario establecer las estrategias que permitan la preservación de éstas y otras plantas en peligro o que presentan algún tipo de problema para su propagación. Por lo anterior, el objetivo del trabajo fue, establecer las técnicas de crioconservación para preservar a largo plazo a *L. speciosa* orquídea en peligro de extinción en el estado de Hidalgo.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el laboratorio de cultivo de tejidos, del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, en dos fases. La primera etapa consistió en establecer las condiciones de manejo *in vitro* de la orquídea *L. speciosa* y la segunda en adaptar los protocolos para la conservación a largo plazo por medio de encapsulación-deshidratación y vitrificación. Las semillas de las orquídeas fueron cápsulas cerradas, proporcionadas por el Orquidario (Dr. y Gral. Alberto Oviedo Mota) localizado en Morelia Michoacan. El manejo *in vitro* fue basado en la metodología empleada por Sheena (2000), se sembraron las semillas en el medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con mio-inositol 100 mgL^{-1} , piridoxina 0.5 mgL^{-1} , 20 mgL^{-1} de azúcar y 8 mgL^{-1} de agar. Se ajustó el pH a 5.7. Las condiciones de incubación fueron a $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo un fotoperiodo de 16/8 h (día/noche) con una intensidad lumínica de $68\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, provista por lámparas fluorescentes blancas, además de incluir la etapa de aclimatación (Figura 1).

La segunda fase consistió en establecer los protocolos de crioconservación de acuerdo a las siguientes metodologías:

Protocolo encapsulación-deshidratación. Después de 50 días de siembra, se obtuvieron protocormos de dos hojas de tamaño 0.4-0.6 ml, los cuales fueron utilizados para las pruebas de crioconservación. Los protocormos fueron sometidos a condiciones de pre-tratamiento durante 24 horas en medio basal MS-0.3 M de sacarosa. Para la elaboración de las semillas sintéticas, el material vegetal se depositó en alginato de sodio al 3 por ciento en medio basal MS, utilizando el método de gota: el cual consiste en absorber y dejar caer la gota

en cloruro de calcio 0.1 M, induciendo la polimerización del alginato en presencia de calcio y forman las cápsulas. Se mantuvieron en la solución de calcio alrededor de 15 a 20 min., después de que se formara la última cápsula, adquiriendo una tonalidad translúcida, posteriormente fueron transferidas al medio de cultivo con altas concentraciones de sacarosa (0.5, 0.75, 1.00 y 1.20 M) y agitación durante 24 horas. Las cápsulas se secaron con papel filtro estéril para remover el exceso del medio de pre-tratamiento líquido y se deshidrataron físicamente en contenedores sellados con gel de sílice, entre 3 y 5 horas, con un contenido de humedad entre 20 y 30 por ciento. Finalmente, las cápsulas se depositaron en crioviales de 2 ml y se sumergieron en nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 30 y 60 min. El descongelamiento se llevó a cabo lentamente a temperatura ambiente; se sacaron de los crioviales y se colocaron en cajas petri bajo el aire de la campana de flujo laminar durante 5 min (Figura 2). Las cápsulas se sembraron en medios de cultivo de regeneración y se mantuvieron en oscuridad durante una semana, por último, se pasaron a la sala de incubación. Para determinar el contenido de humedad de las cápsulas al que se congela, se realizaron pruebas con cápsulas vacías, obteniendo el peso a intervalos regulares y posteriormente se procedió a graficar la curva de deshidratación estándar.

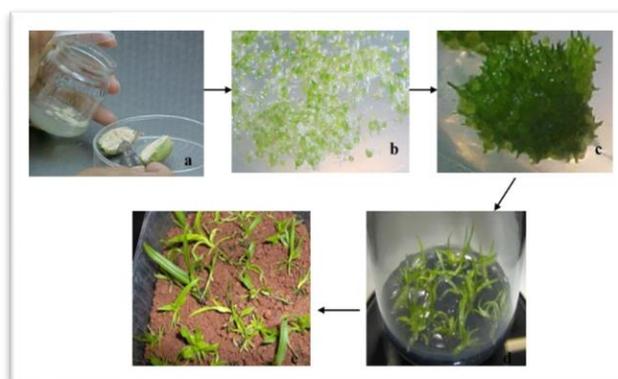


Figura 1: Cultivo *in vitro* de *Laelia speciosa*: a) Siembra de semillas, b) Germinación, c) Multiplicación, d) Desarrollo y e) Aclimatación.

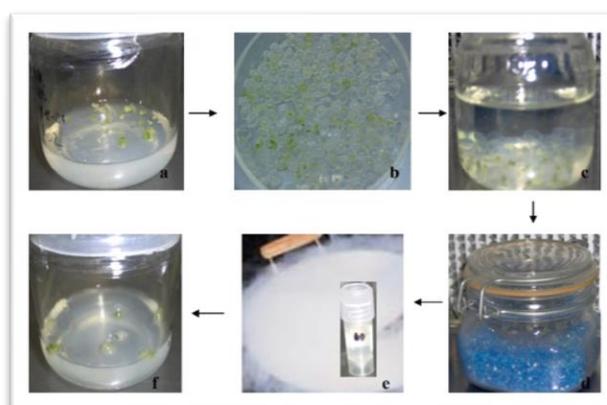


Figura 2: Protocolo Encapsulación-deshidratación. a) Pre-cultivo, b) Encapsulación, c) Pre-tratamiento, d) Recuperación, e) Congelamiento, f) Deshidratación.

Protocolo vitrificación. Al igual que el método de encapsulación, se emplearon protocormos de 50 días después de la siembra. Se precultivaron en un medio sólido con altas

concentraciones de sacarosa (0.3-0.6 M) durante 24 y 48 h (Lurswijidjaru y Thammasiri, 2004; Rajasegari et al., 2015).

El tratamiento de carga (TC) consistió en poner los protocormos en una solución de 2 M de glicerol y 0.4 M de sacarosa durante 20 min. La deshidratación se realizó mediante la exposición a una solución de vitrificación para plantas de 5 min hasta 1 hora. La solución vitrificadora empleada fue PVS2 (30 por ciento de glicerol, 15 por ciento de dimetilsulfóxido (DMSO), 15 por ciento de etilenglicol y 0.4 M de sacarosa). Los protocormos fueron depositados en crioviales conteniendo 600 μ L de la solución PVS2, donde estuvieron expuestos durante 30 y 60 min., transcurrido ese tiempo se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido (NL) durante 30 y 60 min. Posteriormente, las muestras se sumergieron en un baño de agua a 40 °C, durante 5 min. La remoción de la solución vitrificadora se hizo utilizando un medio líquido suplementado con 1.2 M de sacarosa progresivamente para diluir la solución vitrificadora. Por último, se recuperaron los explantes en medio de cultivo de regeneración y se mantuvieron la primera semana en oscuridad, después se pasaron a condiciones de incubación (Figura 3).

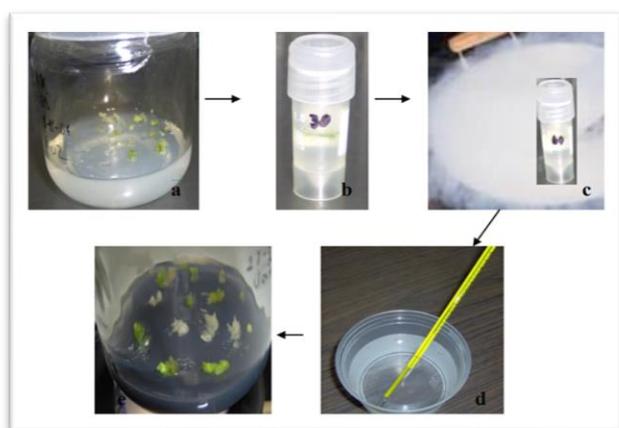


Figura 3: Protocolo de Vitrificación; a) Pre-cultivo, b) Deshidratación con PVS2, c) Congelamiento, d) Recuperación, e) Descongelamiento.

Análisis estadístico. Las variables evaluadas en las pruebas de crioconservación se registraron dos semanas después de la siembra en medios de regeneración, esto es, una semana en oscuridad y una semana en sala de incubación, evaluándose las variables de supervivencia (S) y Regeneración (R). El análisis estadístico se realizó mediante un modelo probabilístico binomial, en donde se compararon cuatro tratamientos en tres etapas de desarrollo, para el caso de encapsulación-deshidratación y dos tratamientos para el caso de vitrificación; se analizaron las proporciones y se compararon utilizando el estadístico con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

Resultados y discusión

En la Figura 4 se observa la curva de deshidratación de cápsulas sometidas a pretratamiento de 0.75 M y 1 M de sacarosa, las cuales presentaron mejores resultados durante el proceso de deshidratación. De la curva de deshidratación se observa que a mayor concentración de sacarosa el peso es menor, esto se debe a que el efecto del azúcar se ve reflejado como la eliminación de mayor contenido de agua de las

cápsulas, aspecto favorable para el congelamiento de éstas y disminución en el riesgo de daño en los tejidos.

La deshidratación de la semilla tiene como finalidad reducir el contenido de humedad, minimizando la posibilidad de contaminación por hongos y evitar daños (ruptura celular) por la entrada y salida de agua en el embrión durante el período de almacenamiento (Ossenbach et al., 2006). De acuerdo con la gráfica, a las 6 horas con 0.75 M de sacarosa se obtiene un 25 por ciento de humedad, ideal para congelar; para el caso de 1 M de sacarosa, entre las 5 y 6 h se obtuvo el 21 y 25 por ciento de humedad. Estos datos, dan un margen de tiempo en el cual se ponen las cápsulas en gel de sílice y alcanzan la humedad requerida. Este porcentaje corresponde a la cantidad de agua no congelable en una célula vegetal y el contenido de agua en el interior de las cápsulas, esto garantiza la mayor supervivencia después del congelamiento en nitrógeno líquido (González-Arno y Engelman, 2006), es importante mencionar que este valor puede variar según la especie y el tejido vegetal utilizado.

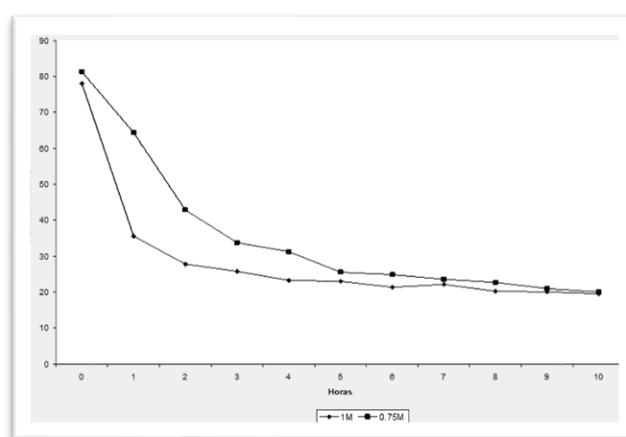


Figura 4: Curva de deshidratación estándar de cápsulas 1.00M y 0.75 M.

Sobrevivencia y regeneración mediante encapsulación-deshidratación. Se compararon los porcentajes de supervivencia de los tratamientos (Tabla 1), en donde la fase de pre-tratamiento con 0.75 M de sacarosa obtuvo el más alto valor de supervivencia (100 por ciento). En la fase de deshidratación con 1 M de sacarosa el valor más alto de supervivencia fue de 100 por ciento al igual que en el tratamiento con nitrógeno líquido, por lo tanto, con 0.75 M de sacarosa se obtuvo la mayor supervivencia, debido a que al someter las cápsulas a esta concentración proporciona buena protección de protocormos, evitando daños al tejido.

Tabla 1: Supervivencia mediante encapsulación-deshidratación de protocormos de *L. speciosa*.

| Tratamientos | Pre-cultivo | Deshidratación | *NL |
|--------------------|-------------|----------------|--------|
| 1. 0.5 M sacarosa | 0.50 b* | 1.0 b | 0.80 a |
| 2. 0.75 M sacarosa | 1.00 c | 1.0 b | 1.00 c |
| 3. 1.0 M sacarosa | 0.40 a | 0.4 a | 0.90 b |
| 4. 1.2 M sacarosa | 0.50 b | 1.0 b | 0.90 b |

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con un α de 0.05

* NL. Nitrógeno Líquido

La regeneración de las cápsulas fue más complicada en ambas técnicas de crioconservación. En la deshidratación, se observó que utilizando 0.5 M, 0.75 M y 1.2 M de sacarosa se

obtuvo el 100 por ciento de regeneración. Para la deshidratación utilizar 0.75 M de sacarosa fue la condición que presentó mayor porcentaje de regeneración (Tabla 2). Flachsland (2006) emplea protocormos cultivados *in vitro* de *Oncidium bifolium* para crioconservar, obteniendo el 11.3 por ciento para la producción de plantas y 49 por ciento de regeneración con protocormos de orquídea tailandesa, *Cleisostoma arietinum* (Rchb.f) (Figura 5). La sacarosa es un reductor osmótico de las células para conferir deshidratación y tolerancia al congelamiento, debido al cambio de molaridades de la sacarosa en las cápsulas por desecación, dando como resultado una transición vítrea durante el enfriamiento en nitrógeno líquido (Rejón *et al.*, 2010).

Tabla 2: Regeneración en encapsulación-deshidratación de protocormos de *L. speciosa*.

| Tratamientos | Pre-cultivo | Deshidratación | +NL |
|--------------------|-------------|----------------|--------|
| 1. 0.5 M sacarosa | 1.00 b* | 0.33 a | 0.10 a |
| 2. 0.75 M sacarosa | 1.00 b | 0.80 c | 0.40 c |
| 3. 1.0 M sacarosa | 0.60 a | 0.33 a | 0.30 b |
| 4. 1.2 M sacarosa | 1.00 b | 0.50 b | 0.30 b |

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con un α de 0.05.

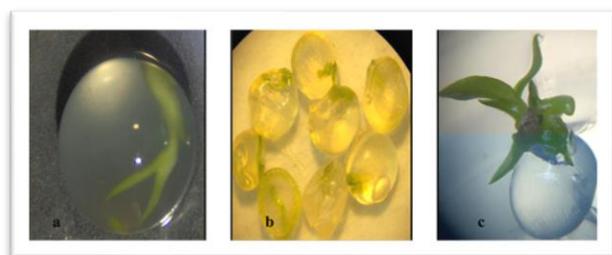


Figura 5: Encapsulamiento-deshidratación.

a) Encapsulamiento de protocormos, b) Deshidratación de capsulas, c) Regeneración de protocormos encapsulados.

Sobrevivencia y regeneración por vitrificación. La técnica de vitrificación permite eliminar la humedad de los tejidos para que al someterlos a congelación no se formen cristales de hielo en las células y evitar daños al tejido. El tratamiento de carga al cual fueron sometidos los tejidos antes de colocarlos en la solución vitrificadora, no tuvo efectos negativos en la sobrevivencia de los tejidos, con una sobrevivencia de 95 y 100 por ciento (Tabla 3).

Tabla 3: Sobrevivencia empleando la técnica de vitrificación en protocormos de *L. speciosa*.

| Tratamientos | TC | PVS2 (30 min) | PVS2 (60 min) | +NL (30 min) | +NL (60 min) |
|-------------------|---------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| 1. 0.3 M sacarosa | 1.00 a* | 0.80 b | 1.00 c | 0.65 b | 0.80 b |
| 2. 0.6 M sacarosa | 0.95 b | 0.80 b | 0.60 a | 1.00 c | 1.00 c |

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con un α de 0.05
TC: Tratamiento de carga, PVS2: Solución vitrificadora de plantas 2, +NL: Sumersión en Nitrógeno Líquido.

Se encontraron diferencias en el tiempo de exposición de los tejidos a la solución vitrificadora, para el caso de esta especie de orquídea, al someterlos más tiempo (60 min) a la solución, presentan mayor porcentaje de sobrevivencia hasta un 100 por ciento con respecto a 30 min. Esto también se ve reflejado al momento de poner los tejidos a +NL, ya que los mejores porcentajes de sobrevivencia se obtuvieron con 60 min de exposición a PVS2, con valores superiores al 70 por ciento. Protocormos de *Doritis pulcherrima* Lindl, crioconservados utilizando PVS2, presentan viabilidad del 86

por ciento después de la preservación (Hirano *et al.*, 2005b). El efecto de la sacarosa se muestra como el mejor para inducir los tejidos al progresivo estrés al cual se someten para la crioconservación (Figura 6).

En los resultados de regeneración, el efecto del tratamiento de carga no fue muy significativo, ya que se muestra similares en ambos casos, entre el 80 y 85 por ciento; los porcentajes de sobrevivencia fueron muy bajos de 30 por ciento al someterlos a la solución vitrificadora durante 30 min, pero este increment con una mayor exposición a la solución vitrificadora (60 min), se obtienen mejores porcentajes de regeneración de 85 por ciento con 0.6 M de sacarosa y en +NL los porcentajes logrados son de 10 y 25 por ciento con 30 y 60 min respectivamente (Tabla 4), estos resultados son similares a los encontrados por Hirano *et al.*, (2005), empleando protocormos de *D. pulcherrima*, utilizando PVS2 con una viabilidad de 62 por ciento después de la preservación.

Tabla 4: Regeneración empleando vitrificación de protocormos de *L. speciosa*.

| Tratamientos | TC | PVS2 (30min) | PVS2 (60min) | +NL (30 min) | +NL (60 min) |
|-------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1. 0.3 M sacarosa | 0.85*a | 0.30 b | 0.10 c | 0.10 b | 0.10 b |
| 2. 0.6 M sacarosa | 0.80 a | 0.30 b | 0.85 a | 0.10 a | 0.25 a |

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con un α de 0.05.
TC (Tratamiento de carga), PVS2 (Solución vitrificadora de plantas 2).

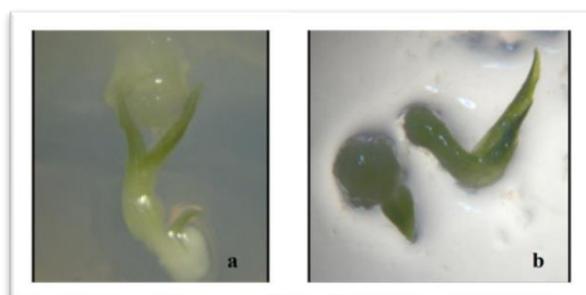


Figura 6: Vitrificación de protocormos de la orquídea *L. speciosa*. a y b: Protocormos después de someterlos a crioconservación.

El éxito de un protocolo de crioconservación está en función del porcentaje de supervivencia y desarrollo de brotes sin anomalías. Se ha observado que los protocormos sin precultivo no sobreviven a la crioconservación y mueren (Yin y Hong, 2009). Sin embargo, cuando se emplea pretratamiento con sacarosa antes de la exposición al nitrógeno líquido, induce tolerancia osmótica a la solución PVS (Rahmah *et al.*, 2015). Por lo tanto, es importante el precultivo de sacarosa permitiendo aumentar la tolerancia tanto a la deshidratación y congelación en nitrógeno líquido (Khoddamzadeh *et al.*, 2011). Los antes mencionado se puede corroborar con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en donde los porcentajes de regeneración son bajos y es necesario adaptar aun condiciones para que los tejidos regenerados sean mayores.

Conclusiones

Se establecieron los protocolos de encapsulación-deshidratación y vitrificación para la crioconservación de la orquídea *Laelia speciosa*, especie en peligro de extinción en el estado de Hidalgo. Por lo tanto, estas tecnologías son una estrategia viable para la conservación de germoplasma de

plantas, teniendo múltiples aplicaciones tanto científicas como industriales, además de permitir el manejo de recursos naturales de forma sustentable. El reto consiste en establecer los protocolos adecuados para implementar las técnicas pertinentes a cada especie, debido a la gran diversidad con la que México cuenta y de las cuales muchas se encuentran en peligro de extinción o presentan problemas para su propagación.

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Autónoma Chapingo, particularmente al departamento de Fitotecnia y al personal técnico del laboratorio de cultivo de tejidos por permitirnos realizar el proyecto de investigación.

Referencias

- Aguilar, J. D. (2006). Obtención y multiplicación *in vitro* de la orquídea *Laelia anceps* Lindl. Tesis Izúcar de Matamoros Puebla. 230 p.
- Ávila, D. I., Oyama, K. (2002). Manejo sustentable de *Laelia speciosa* (Orchidaceae). Biodiversitas. Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 7 (43) 38.
- Briard, J. G., Poisson, J. S., Turner, T. R., Capicciotti, Ch. J., Acker, J. P., Ben, R. N., (2016). Small molecule ice recrystallization inhibitors mitigate red blood cell lysis during freezing, transient warming and thawing. Scientific Reports, 6, 23619.
- Cui, Z.-K., Li, Sh.-Y., Liao, K., Wang, Z.-J., Guo, Y.-L., Tang, L.-Sh., Tang Sh.-B., Ma, J. H., Chen, J.-S., (2021). Characteristics of neural growth and cryopreservation of the dorsal root ganglion using three-dimensional collagen hydrogel culture versus conventional culture. Neural Regeneration Research, 16, 1856–1864.
- Elliott, G. D., Wang, S., Fuller, B. J. (2017). Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. Cryobiology, 76, 74–91.
- Engelman, F. (2004). Plant cryopreservation: Progress and Prospects. In vitro Cellular and Development Biology-Plant, 40 (5) 427-433.
- Flachsland, E., Terada, G., Scocchi, A., Rey, H., Mroginski, L., Engelmann, F. (2006). Cryopreservation of seeds and in vitro-cultured protocorms of *Oncidium bifolium* Sims. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. Cryo Letters, 27 (4) 235-42.
- Giwa, S. et al. (2017). The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. Natural Biotechnology, 35 (6) 530–542.
- González, A. M. T., Engelmann, F. (2006). Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study of sugarcane. Cryoletters, 27 (3) 155-168.
- González, A. M. T., Engelmann F. (2013). Consideraciones teóricas y prácticas para la crioconservación de germoplasma vegetal. Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. 3764.
- Hirano, T., Godo T., Mii, M., Ishikawa, K. (2005a). Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. Plant Cell Reports, 23 (8) 534-539.
- Hirano, T., Ishikawa, K., Mii, M. (2005b). Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis graminifolia* var. *suzukiana* by vitrification. Cryo Letters, 26 (3) 139-146.
- Ishikawa, K., Harata, K., Mii, M., Sakai, A., Yoshimatsu K., Shimomura, K. (2004). Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification, Journal. Plant Cell Reports, 754-757.
- Khoddamzadeh, A. A., Sinniah, U. R., Lynch, P., Kadir, M. A., Kadzimin, S. B., Mahmood, M. (2011). Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) christenson by encapsulation-dehydration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 107 (3) 471-481.
- Lursuwijidjarus, W. and K. Thammasiri. (2004). Cryopreservation of shoot tips of *Dendrobium water oumae* by encapsulation/dehydration. Science Asia, 30, 293-299.
- Ossenbach, C, Arce J., 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
- Rahmah, S., Mubbarakh, S. A., Ping, K. S., Subramaniam, S. (2015). Effects of droplet-vitrification cryopreservation base on physiological and antioxidant enzyme activities of *Brassidium Shooting Star* Orchid. The Scientific World Journal, 2015, 1-10.
- Rajasegar, A., Poobathy, R., Rathinam, X., Oyunbileg, Y., Subramaniam, S. (2015). Cryopreservation of PLBs of *Brassidium fly away* using encapsulation-dehydration technique. Mongolian Journal of Biological Sciences, 13 (1-2) 19-23.
- Reed, B. M. (2008). Plant cryopreservation: a practical guide. Springer Science, pp. 513.
- Rejón, J. D., Suárez, C. G., Alché, J. D., Castro, A. J., Rodríguez, G. M. I. (2010). Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea Europaea* L.). Polen, 20, 60-72.
- SEMARNAT. (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. 2002. Protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestre-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación.
- Sheena, M. (2000). Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation, 17 p.
- Téllez, V. (2005). La orquídea, flor cumbre de la evolución. Revista de Instituto del Politécnico Nacional, No. 38.
- Thammasiri, K. (2000). Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification. Cryo Letters, 21 (4) 237-244.
- Wood, C.B, Pritchard, H.W., Miller, A. P. (2000). Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content. Cryo Letters, 21 (2) 125-136.
- Yin, M. and Hong. S. (2009). Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 98 (2) 179-185.