

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Modalidad Tesina

Tema: “Micropropagación y crioconservación de
germoplasma de *Cohniella cepula* y *C. jonesiana*
(Orchidaceae)”

Estudiante: Srta. Gimenez, Carla Anahi

Directora: Dra. Dolce, Natalia Raquel

2019

1. DENOMINACIÓN

Micropropagación y crioconservación de germoplasma de *Cohniella cepula* y *C. jonesiana* (Orchidaceae).

2. ANTECEDENTES

El género *Cohniella* Pfitzer pertenece a la familia Orchidaceae, una de las familias botánicas más numerosas y diversas a la que pertenecen entre el 8 y 10% de todas las plantas con flores; con un número estimado de 880 géneros y más de 25.000 especies (Givnish et al., 2015). En Argentina, esta familia está representada por alrededor de 74 géneros y 280 especies (Johnson, 1992; Correa, 1996), con una distribución que va desde Tierra del Fuego hasta Misiones y Jujuy. Entre los géneros citados para el país se encuentra *Cohniella*, el cual cuenta con dos especies nativas con gran potencial ornamental que habitan en las provincias del noreste: *Cohniella cepula* Hoffmans y *C. jonesiana* Rchb.f. (Carnevali et al., 2010).

Se considera que la gran mayoría de las especies de orquídeas presentan serias amenazas de conservación debidas, principalmente, a dos presiones directas o indirectas ocasionadas por el hombre: la destrucción o alteración de sus medios naturales y la extracción o recolección indiscriminada de plantas de sus ambientes naturales (Withner, 1977; Johnson, 2001). Esta realidad puede observarse claramente en las especies del género *Cohniella* que habitan en Argentina, las cuales si bien eran usualmente encontradas en sus hábitats naturales, actualmente están casi desaparecidas (Insaurrealde y Radins, 2007). En consecuencia, es imperioso desarrollar medidas para la conservación de estos “pandas del mundo vegetal” (Wood, 1989); lo cual requiere una compleja integración de estrategias de conservación de los hábitats naturales (conservación *in situ*), el desarrollo y aplicación de metodologías de propagación y conservación *ex situ*, así como una mejor comprensión del comercio y las prácticas hortícolas de las orquídeas (Popova et al., 2016).

En este contexto, las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se presentan como una herramienta importante para la multiplicación y conservación de germoplasma vegetal (Engelmann, 1991; Bunn et al., 2007). El término cultivo *in vitro* de tejidos vegetales cubre un amplio espectro de técnicas que implican el cultivo, bajo condiciones de asepsia, de órganos o fragmentos de órganos (semillas, embriones, hojas, tallos, yemas, raíces, anteras, óvulos), callos, células aisladas y protoplastos en un medio nutritivo artificial definido, bajo condiciones ambientales controladas (Mroginski y Roca, 1991; Iriondo y Pita, 1998). El uso de estas técnicas permite la propagación de material vegetal con altas tasas de multiplicación, a la vez que posibilitan la obtención de plantas libres de virus, la producción de plantas haploides, el rescate de embriones inmaduros o híbridos, la transformación genética para la producción de plantas modificadas, la hibridación somática mediante fusión de protoplastos y la producción de semillas sintéticas (Iriondo y Pita, 1998). Con respecto a la conservación de germoplasma vegetal, los métodos empleados son diferentes dependiendo de la

duración del almacenamiento requerida. Para el almacenamiento a largo plazo, se procuran temperaturas inferiores a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ para alcanzar condiciones de ausencia de agua en estado líquido, baja energía cinética molecular y una difusión extremadamente lenta, logrando así que las reacciones químicas se encuentren prácticamente paralizadas (Pritchard, 1995). Bajo estas condiciones, se logra la detención de la mayoría de los procesos metabólicos y con ello el bloqueo de los mecanismos fisiológicos responsables del envejecimiento, postulándose longevidades extremadamente largas (Iriondo Alegría, 2001). Las técnicas de criopreservación utilizan normalmente nitrógeno líquido (NL), lo que asegura una temperatura constante de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, de esta manera, la prolongación indefinida del período de conservación (Bonner, 1990; Pritchard, 1995).

No obstante, la criopreservación presenta una serie de problemas derivados, principalmente, de la humedad inicial de la muestra y de las alteraciones que sufre el material en los procesos de enfriamiento/calentamiento. Ambos factores deben ser detalladamente evaluados antes de decidir si es adecuada la utilización de la criopreservación para un determinado tipo de material biológico (Pita Villamil y Pérez Ruiz, 1997). Numerosas especies (principalmente de origen tropical) son difíciles de criopreservar utilizando los procedimientos actuales. Por ello, es necesaria la optimización de dichas metodologías (modificando la composición y el tiempo de exposición al medio de pre-cultivo, el tipo y la duración de la incubación con sustancias crioprotectoras y/o soluciones de vitrificación) o el desarrollo de nuevas técnicas de criopreservación (Kaczmarczyk et al., 2011). Asimismo, al momento de encarar los estudios de criopreservación es importante disponer de explantes adecuados, tales como ápices y estructuras embriogénicas, que constituyen explantes de tamaño reducido, organizados y potencialmente estables desde el punto de vista genético.

En lo que respecta al uso de estas técnicas para la propagación y conservación de orquídeas, han sido establecidos protocolos para numerosas especies, mediante el uso de diversos explantes. Sin embargo, aún no se reportan antecedentes bibliográficos referidos al uso de estas metodologías para el género *Cohniella*.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Generar los conocimientos necesarios para el establecimiento de sistemas eficientes de micropropagación y criopreservación de germoplasma de *Cohniella cepula* y *C. jonesiana*.

Objetivos específicos

- 1) Desarrollar sistemas in vitro que permitan la regeneración de plantas de *Cohniella cepula* y *C. jonesiana* a partir de ápices caulinares de plantas in vitro.
- 2) Establecer procedimientos que permitan la criopreservación de germoplasma de *Cohniella cepula* y *C. jonesiana*, promoviendo el acondicionamiento previo de los explantes para soportar el estrés al que son sometidos durante la exposición a

temperaturas ultrabajas, y estudiando la incidencia de diferentes tratamientos crioprotectores sobre la supervivencia.

4. HIPÓTESIS

Las hipótesis que surgen al plantear los objetivos específicos de este trabajo son:

- 1) Es posible establecer sistemas *in vitro* que permitan la regeneración de plantas de *Cohniella cepula* y *C. jonesiana*, mediante el cultivo de ápices caulinares.
- 2) Es factible desarrollar y/u optimizar los métodos existentes para la criopreservación de germoplasma de *Cohniella cepula* y *C. jonesiana*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1. Material vegetal: Se trabajó con plantas *in vitro* de *Cohniella cepula* Hoffmanns. y *C. jonesiana* Rchb. f., pertenecientes a las colecciones de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la cátedra de Fisiología Vegetal de la FCA-UNNE. Las plantas fueron obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de explantes florales, siguiendo la metodología descrita por Dolce et al. (2016). Las plantas madres usadas como fuente de explantes para el establecimiento *in vitro* fueron obtenidas en ferias y viveros locales y luego mantenidas en un umbráculo perteneciente a la cátedra de Fisiología Vegetal de la FCA-UNNE (Fig. 1A). Los ejemplares fueron identificados en el Herbario CTES.

5.2. Micropropagación: Con el propósito de contar con un explante adecuado para proceder con los estudios de criopreservación de germoplasma de ambas especies, se evaluó la regeneración de plantas a través de ápices caulinares de plantas etioladas mediante la vía organogénica y/o embriogénica.

Para la ejecución de este experimento se usaron ápices caulinares (2 mm de longitud) de plantas etioladas de *C. cepula* y *C. jonesiana* (Fig. 1B y 1C), obtenidas mediante la incubación de los cultivos en un cuarto climatizado a 27 ± 2 °C y oscuridad permanente durante 60 días. Los ápices fueron cultivados individualmente en tubos de vidrio de 11 ml de capacidad conteniendo 3 ml de medio de cultivo semisólido. Se ensayaron 31 medios de cultivo con el propósito de evaluar el efecto del tipo, concentración y combinación de los reguladores de crecimiento vegetal adicionados al medio basal: citocininas [N6-bencilaminopurina (BAP) y cinetina (KIN)] y auxinas [ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (IBA)] (ver tablas 1 y 2). El medio basal utilizado fue MS (Murashige y Skoog, 1962), con 3% de sacarosa y 0,65% de agar. En todos los casos, el pH de los medios fue ajustado a 5,6 con el agregado de KOH o HCl. Previo al cultivo de los ápices, los tubos conteniendo los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a $1,45 \text{ kg.cm}^{-2}$ y 120 °C durante 20 minutos.

La incubación de los ápices se realizó en un cuarto climatizado a 27 ± 2 °C con fotoperíodo de 14 hs e intensidad lumínica de $116 \mu\text{m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Al cabo de 60 días de cultivo, todos los explantes fueron transferidos a MS desprovisto de reguladores de crecimiento vegetal suplementado con carbón activado (250 mg/L), para la subsecuente regeneración de plantas.

Los tratamientos fueron arreglados en un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones de 10 ápices cada uno. Al cabo de 120 días de iniciado el experimento, se determinaron los porcentajes de regeneración (entendida como la obtención de al menos una planta entera a partir de un ápice cultivado) y el número promedio de plantas regeneradas por cada ápice cultivado. Los datos fueron sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) y la comparación de las medias fue realizada usando el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P < 0,05$).

5.3. Crioconservación: Se trabajó con ápices caulinares de plantas etioladas, ensayando el procedimiento básico de vitrificación, así como las técnicas de gota-vitrificación y V-criolámina. En todos los casos, los ápices caulinares (2 mm de longitud) fueron explantados y precondicionados durante 16-24 hs en un medio constituido por MS suplementado con 0,3 M de sacarosa.

Procedimiento básico de vitrificación:

El método de vitrificación se caracteriza por inducir una intensa deshidratación osmótica, mediante la exposición del material biológico a mezclas crioprotectoras muy concentradas, conocidas como formulaciones PVS (*Plant Vitrification Solutions*). El tratamiento con las PVS facilita la ocurrencia de la transición vítrea durante el enfriamiento rápido de las muestras por la inmersión directa al nitrógeno líquido (Sakai y Englemann, 2007). El tratamiento de los explantes con la PVS generalmente se lleva a cabo a los 0°C para reducir la posibilidad de toxicidad ocasionada por el elevado potencial osmótico de dichas soluciones. Adicionalmente, para que los tejidos adquieran mayor tolerancia frente a la deshidratación con la PVS y a la crioconservación, previo a estos dos procesos se realiza un tratamiento breve denominado “tratamiento de carga”, en el cual se utiliza una mezcla de sacarosa y glicerol.

El procedimiento llevado a cabo en esta investigación consistió en transferir los ápices caulinares precondicionados a una caja de Petri conteniendo la solución de carga (0,4 M de sacarosa + 2 M de glicerol), donde permanecieron por 20 min a temperatura ambiente. A continuación, los explantes fueron tratados con las soluciones vitrificadoras PVS2: 30% glicerol + 15% etilenglicol + 15% DMSO (w/v) en medio de cultivo con 0.4 M sacarosa y PVS3: 50% de glicerol + 50% sacarosa (w/v) durante 15, 30, 45 y 60 min a 0°C. Luego, los ápices fueron colocados en crioviales conteniendo 1 mL de PVS2 o PVS3 e inmersos rápidamente en NL y mantenidos allí durante al menos 1 h.

Para el calentamiento de las muestras, los crioviales fueron extraídos del NL y sumergidos rápidamente en un baño termostático a 35 °C durante 2 min. Finalmente, se procedió al lavado de las soluciones crioprotectoras colocando los ápices en un frasco conteniendo 25 mL de solución de lavado (MS líquido suplementado con 1,2 M de sacarosa) durante 20 minutos (tratamiento de descarga).

Gota-vitrificación:

Esta técnica ha derivado del método de vitrificación y se diferencia de éste en que se logra una ultra-rápida velocidad de enfriamiento y de calentamiento de las muestras,

dado que en lugar de usar crioviales, los tejidos se transfieren a una gota de solución vitrificadora colocada sobre una pequeña lámina de aluminio, en la que son inmersas directamente al nitrógeno líquido (Panis et al., 2005). Estas láminas dan lugar a tasas de enfriamiento ultra-rápidas de alrededor de $130\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{seg}^{-1}$. Para el calentamiento, la lámina con las muestras se sumerge directamente en abundante medio de cultivo líquido suplementado con sacarosa. La magnífica conductividad térmica de la lámina de aluminio, aunada al poco volumen de solución crioprotectora en contacto con los tejidos, propicia que tanto el enfriamiento como el calentamiento transcurran a una velocidad muy elevada (Sakai y Engelmann, 2007).

Para el desarrollo de este protocolo, se realizaron los tratamientos de carga y de exposición a las PVS como se describió en la técnica anterior. A continuación, los ápices fueron colocados en gotas de PVS (15 μl) previamente dispensadas sobre pequeñas láminas de papel aluminio e inmediatamente inmersas en NL. La recuperación del material vegetal crioconservado se realizó extrayendo las láminas de aluminio del NL y sumergiéndolas rápidamente en MS líquido suplementado con 1,2 M de sacarosa durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de proceder al recultivo.

V-criolámina:

Este método involucra primeramente la encapsulación de los tejidos en una capa fina de alginato de calcio que gelifica en la superficie de la lámina de aluminio e inmoviliza los tejidos sobre ella (Yamamoto et al., 2011). Los tratamientos de carga, deshidratación con la solución PVS, inmersión al NL, calentamiento y lavado (descarga) se realizan acorde a lo descrito para el método de gota-vitrificación. Una característica de esta metodología es que se beneficia de las facilidades que proporciona la manipulación del material inmovilizado en alginato de calcio, a diferencia del método de vitrificación que implica el manejo directo de cada tejido; así como una protección adicional de los ápices proporcionada por el gel de alginato de calcio (Yamamoto et al., 2012).

Para el desarrollo de este protocolo, se procedió primeramente a “adherir” los ápices caulinares preacondicionados a la lámina de aluminio. Para ello, los tejidos se transfirieron a una gota (aproximadamente 20 μl) de solución de alginato de sodio al 2% (SIGMA, baja viscosidad) colocada en la lámina criogénica. Después de eso, se vertió suavemente una solución de cloruro de calcio 0,1 M (150 μL) en los bordes y sobre la gota de alginato de sodio (usando una micropipeta para evitar la dispersión de la solución de alginato), provocando su polimerización durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los tratamientos de carga, deshidratación con la solución PVS, inmersión al NL, calentamiento después de la crioconservación y lavado de crioprotectores fueron las mismas que las descritas para el protocolo de gota-vitrificación. Finalmente, los ápices fueron retirados del gel de alginato de calcio previo a su cultivo en el medio de brotación.

En todos los casos, luego del recalentamiento de las muestras crioconservadas, así como los controles sin crioconservar de los diferentes pasos de los protocolos ensayados, los explantes fueron transferidos al medio de regeneración de plantas

constituido por MS suplementado con KIN 1 mg.L^{-1} + IBA $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ e incubadas en oscuridad durante los primeros 15 días (para evitar el estrés foto-oxidativo) y a continuación llevadas a condiciones de luz (fotoperíodo de 14 hs e intensidad lumínica de $116 \mu\text{m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PPFD) para poder evaluar la sobrevivencia y capacidad de recuperación del material vegetal.

Los tratamientos fueron arreglados en un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones de diez muestras cada uno. Luego de 60 días de la recuperación de las muestras del NL y su cultivo en el medio de regeneración de plantas, se determinaron los porcentajes de sobrevivencia (entendida como la obtención de al menos una planta entera a partir de cada ápice cultivado). Los resultados se analizaron calculando los valores promedio de las tres repeticiones. Finalmente, los datos fueron sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) y la comparación de las medias fue realizada usando el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Micropropagación

Al cabo de 120 días de iniciado el cultivo (60 días en los medios de inducción + 60 días en MS desprovisto de reguladores de crecimiento vegetal), la regeneración de plántulas ocurrió en todos los medios de cultivo evaluados, incluso en MS desprovisto de reguladores de crecimiento vegetal tanto para *Cohniella cepula* como para *C. jonesiana*. Los porcentajes de regeneración oscilaron entre 83 y 97%, sin registrarse diferencias significativas entre los distintos medios de cultivo, excepto en el medio basal MS donde el porcentaje de regeneración de plántulas fue de alrededor del 50% (Tablas 1 y 2).

Por otra parte, respecto al número promedio de plántulas registrado luego de 120 días desde el inicio del experimento, los mayores valores se obtuvieron a partir de ápices cultivados en los medios de inducción constituidos por MS suplementado con KIN 1 mg.L^{-1} + IBA $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$, KIN 3 mg.L^{-1} + ANA $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ y BAP $1-3 \text{ mg.L}^{-1}$ + ANA $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ (Fig. 1D y 1E). En dichos medios de cultivo, se obtuvo un promedio de alrededor de 5 plántulas por cada ápice cultivado, diferenciándose significativamente de los valores registrados en MS desprovisto de reguladores de crecimiento vegetal ($1 \text{ plántula.ápice}^{-1}$) o suplementado únicamente con una citocinina ($1-3 \text{ plántulas.ápice}^{-1}$).

Adicionalmente, la suplementación con KIN 1 mg.L^{-1} + IBA $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ no solo evidenció un efecto positivo en lo que respecta al porcentaje de regeneración de plantas y la tasa de multiplicación, sino que las plántulas obtenidas a partir de este medio de inducción presentaron un mayor tamaño, tanto de hojas como de raíces (datos no mostrados). Cabe destacar la importancia de esta característica, ya que es categórica a la hora de seleccionar los individuos que van a ser llevados a invernadero para su aclimatación y crecimiento para usos posteriores como plantas madres para futuras investigaciones.

Es bien conocido que el equilibrio entre los reguladores de crecimiento vegetal, particularmente las citocininas y auxinas, en el medio de inducción es un determinante para la regeneración de plantas mediante la vía organogénica (Evans et al., 1981). En este estudio, los ápices caulinares mostraron respuestas diferenciales de acuerdo a la combinación y concentración hormonal utilizada en los medios de inducción. Si bien los ápices cultivados en MS libre de reguladores de crecimiento vegetal o suplementado únicamente con BAP o KIN fueron capaces de regenerar plantas, se logró una mayor tasa de multiplicación cuando las citocininas se usaron en combinación con auxinas.

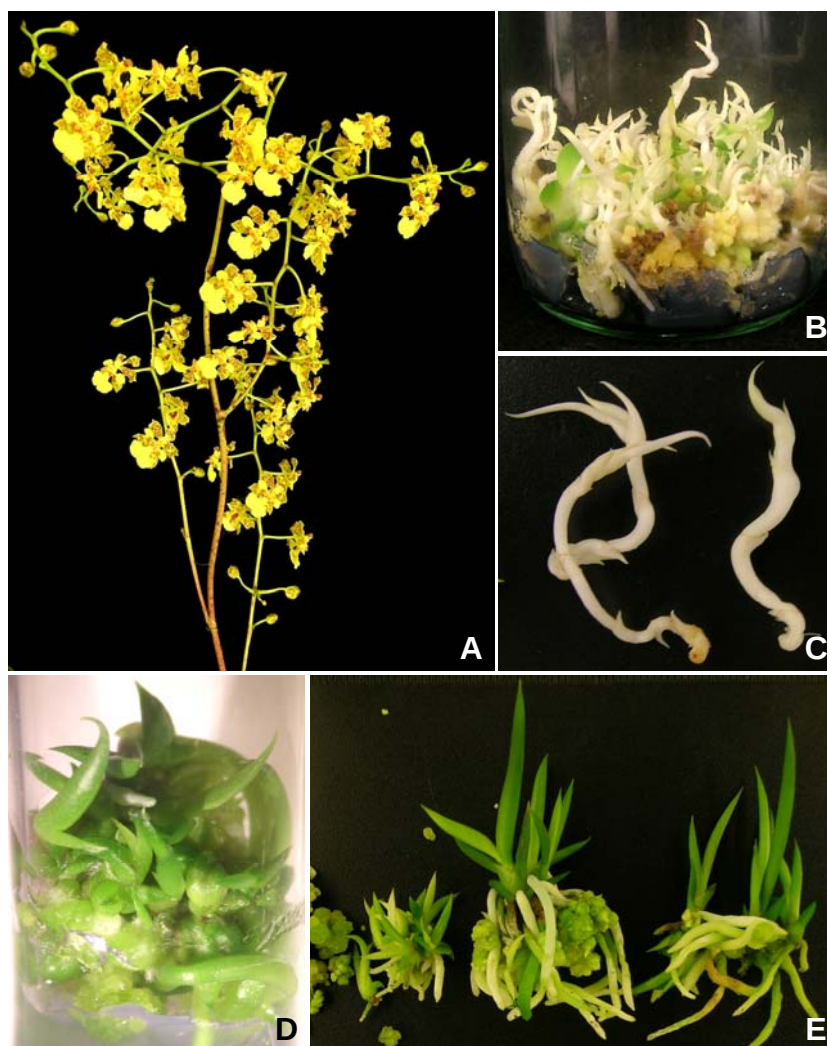


Fig. 1. A) Inflorescencia de un ejemplar de *Cohniella cepula* mantenido en un invernadero de la FCA-UNNE. B-C) Plantas madres *in vitro* creciendo en condiciones de oscuridad permanente, a partir de las cuales se aislaron los ápices caulinares. D-E) Regeneración de plantas a partir de un ápice caular inducido en MS suplementado con KIN 1 mg.L⁻¹ + IBA 0,01 mg.L⁻¹ luego de 60 (D) y 120 días de iniciado el cultivo (E).

Tabla 1. Efecto del tipo, concentración y combinación de citocininas y auxinas adicionadas al medio basal MS sobre la regeneración de plantas y el número promedio de plantas obtenidas a partir de ápices caulinares de *Cohniella cepula* cultivados in vitro.

Reguladores de crecimiento vegetal (mg l ⁻¹)				^(a) Regeneración de plantas (%)	^(b) Nº promedio de plantas/ápice
KIN	BAP	IBA	ANA		
-	-	-	-	56,7 b	1,0 n
0,5	-	-	-	86,7 a	1,4 klmn
1,0	-	-	-	93,3 a	1,6 jklmm
3,0	-	-	-	90,0 a	2,0 ijk
0,5	-	0,01	-	93,3 a	1,3 mn
0,5	-	0,1	-	90,0 a	1,3 lmn
0,5	-	-	0,01	86,7 a	1,8 jklm
0,5	-	-	0,1	96,7 a	1,9 jkl
1,0	-	0,01	-	90,0 a	5,7 a
1,0	-	0,1	-	90,0 a	2,5 ghi
1,0	-	-	0,01	96,7 a	2,0 ijk
1,0	-	-	0,1	93,3 a	1,3 lmn
3,0	-	0,01	-	93,3 a	1,2 mn
3,0	-	0,1	-	96,7 a	1,1 n
3,0	-	-	0,01	90,0 a	3,6 de
3,0	-	-	0,1	86,7 a	5,1 b
-	0,5	-	-	86,7 a	3,1 ef
-	1,0	-	-	83,3 a	3,2 ef
-	3,0	-	-	90,0 a	1,5 klmn
-	0,5	0,01	-	93,3 a	2,2 hij
-	0,5	0,1	-	90,0 a	2,8 fgh
-	0,5	-	0,01	96,7 a	1,1 n
-	0,5	-	0,1	86,7 a	1,8 jklm
-	1,0	0,01	-	93,3 a	2,2 ij
-	1,0	0,1	-	86,7 a	4,1 c
-	1,0	-	0,01	93,3 a	3,0 efg
-	1,0	-	0,1	96,7 a	5,0 b
-	3,0	0,01	-	86,7 a	3,4 de
-	3,0	0,1	-	93,3 a	3,9 cd
-	3,0	-	0,01	90,0 a	3,2 ef
-	3,0	-	0,1	93,3 a	5,2 ab

Los datos representan la media de tres repeticiones. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

^(a)Frecuencia de explantes que regeneraron plantas luego de 120 días de iniciado el cultivo (n = 30).

^(b)Número promedio de plantas regeneradas a partir de un ápice cultivado, luego de 120 días de iniciado el cultivo (n = 30).

Tabla 2. Efecto del tipo, concentración y combinación de citocininas y auxinas adicionadas al medio basal MS sobre la regeneración de plantas y el número promedio de plantas obtenidas a partir de ápices caulinares de *Cohniella jonesiana* cultivados in vitro.

Reguladores de crecimiento vegetal (mg l ⁻¹)				⁽¹⁾ Regeneración de plantas (%)	⁽²⁾ Nº promedio de plantas/ápice
KIN	BAP	IBA	ANA		
-	-	-	-	56,7 b	1,1 l
0,5	-	-	-	83,3 a	1,2 kl
1,0	-	-	-	90,0 a	1,8 ghijkl
3,0	-	-	-	86,7 a	2,1 efghij
0,5	-	0,01	-	90,0 a	1,4 ijkl
0,5	-	0,1	-	86,7 a	1,2 kl
0,5	-	-	0,01	93,3 a	1,5 hijkl
0,5	-	-	0,1	90,0 a	1,8 fghijkl
1,0	-	0,01	-	93,3 a	5,3 a
1,0	-	0,1	-	96,7 a	3,2 bcd
1,0	-	-	0,01	90,0 a	2,4 defgh
1,0	-	-	0,1	93,3 a	1,6 hijkl
3,0	-	0,01	-	93,3 a	1,3 jkl
3,0	-	0,1	-	86,7 a	1,5 hijkl
3,0	-	-	0,01	96,7 a	3,3 bc
3,0	-	-	0,1	90,0 a	4,9 a
-	0,5	-	-	90,0 a	2,7 cdef
-	1,0	-	-	93,3 a	2,5 cdefg
-	3,0	-	-	86,7 a	1,6 hijkl
-	0,5	0,01	-	93,3 a	2,0 efghijk
-	0,5	0,1	-	96,7 a	2,3 defghijk
-	0,5	-	0,01	90,0 a	1,3 jkl
-	0,5	-	0,1	86,7 a	2,1 efghijk
-	1,0	0,01	-	93,3 a	2,4 defgh
-	1,0	0,1	-	90,0 a	3,6 b
-	1,0	-	0,01	86,7 a	2,8 cde
-	1,0	-	0,1	93,3 a	4,7 a
-	3,0	0,01	-	86,7 a	3,0 bcd
-	3,0	0,1	-	90,0 a	3,6 b
-	3,0	-	0,01	90,0 a	2,9 bcde
-	3,0	-	0,1	93,3 a	4,6 a

Los datos representan la media de tres repeticiones. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

⁽¹⁾Frecuencia de explantes que regeneraron plantas luego de 120 días de iniciado el cultivo (n = 30).

⁽²⁾Número promedio de plantas regeneradas a partir de un ápice cultivado, luego de 120 días de iniciado el cultivo (n = 30).

6.2. Crioconservación

Luego de 60 días del cultivo de los ápices provenientes de cada uno de los protocolos de crioconservación ensayados se evaluó el porcentaje de supervivencia tanto de las muestras crioconservadas como de las no crioconservadas. En las tablas 3 y 4 se presentan los resultados obtenidos para ambas especies estudiadas. Puede observarse que no se registró supervivencia en ninguno de los tratamientos en los cuales los ápices fueron sumergidos en NL, independientemente de la técnica utilizada y del tiempo de exposición a las soluciones PVS. Con respecto a los explantes que no fueron expuestos al NL (controles sin crioconservar), se registraron diferentes porcentajes de supervivencia dependiendo de los tratamientos a los cuales fueron sometidos. Los ápices que no recibieron algún tratamiento previo a su cultivo en el medio de brotación (testigos), presentaron 90-93% de sobrevivencia; mientras que aquellos tratados con la solución de carga mostraron una sobrevivencia de alrededor del 80% en ambas especies.

Tabla 3. Efecto del tratamiento de carga, los diferentes tiempos de exposición a las soluciones de vitrificación (PVS2 y PVS3) y la técnica de crioconservación aplicada (Vitrificación, Gota-vitrificación y V-criolámina) sobre la sobrevivencia de ápices crioconservados y no crioconservados (-NL) de *Cohniella cepula*.

Tratamientos	-NL ^(b)	Vitrificación ^(c)	Gota-vitrificación ^(c)	V-criolámina ^(c)
Testigo ^(a)	90 a	0	0	0
Solución de carga	83 a	0	0	0
PVS2 15 min	53 bc			
PVS2 30 min	37 c	0	0	0
PVS2 45 min	0 d	0	0	0
PVS2 60 min	0 d	0	0	0
PVS3 15 min	67 ab			
PVS3 30 min	53 bc	0	0	0
PVS3 45 min	0 d	0	0	0
PVS3 60 min	0 d	0	0	0

Los datos representan la media de tres repeticiones. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

^(a)Ápices recién explantados, sin recibir tratamiento previo a su cultivo en MS + KIN 1 + IBA 0,01.

^(b)Porcentaje de explantes (n = 30) que mostraron alguna vía de desarrollo morfogénico después de 60 días de cultivo en MS + KIN 1 + IBA 0,01.

^(c)Porcentaje de explantes (n = 30) que mostraron alguna vía de desarrollo morfogénico después de 60 días de la recuperación del nitrógeno líquido (NL) y el cultivo en MS + KIN 1 + IBA 0,01.

Por su parte, en aquellos explantes expuestos a la solución de carga seguida del tratamiento con las soluciones crioprotectoras la sobrevivencia fue significativamente

afectada por el tiempo de exposición del material a las soluciones PVS, siendo mayor el porcentaje de supervivencia cuando menor fue el tiempo de contacto con estas soluciones. Asimismo, a igual tiempo de exposición, se evidenció una mayor supervivencia en los ápices tratados con la solución PVS3 respecto a la solución PVS2.

Tabla 4. Efecto del tratamiento de carga, los diferentes tiempos de exposición a las soluciones de vitrificación (PVS2 y PVS3) y la técnica de crioconservación aplicada (Vitrificación, Gota-vitrificación y V-criolámina) sobre la sobrevivencia de ápices crioconservados y no crioconservados (-NL) de *Cohniella jonesiana*.

Tratamientos	-NL ^(b)	Vitrificación ^(c)	Gota-vitrificación ^(c)	V-criolámina ^(c)
Testigo ^(a)	93 a	0	0	0
Solución de carga	80 ab	0	0	0
PVS2 15 min	57 bcd			
PVS2 30 min	33 d	0	0	0
PVS2 45 min	0 e	0	0	0
PVS2 60 min	0 e	0	0	0
PVS3 15 min	63 bc			
PVS3 30 min	47 cd	0	0	0
PVS3 45 min	0 e	0	0	0
PVS3 60 min	0 e	0	0	0

Los datos representan la media de tres repeticiones. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

^(a)Ápices recién explantados, sin recibir tratamiento previo a su cultivo en MS + KIN 1 + IBA 0,01.

^(b)Porcentaje de explantes (n = 30) que mostraron alguna vía de desarrollo morfogénico después de 60 días de cultivo en MS + KIN 1 + IBA 0,01.

^(c)Porcentaje de explantes (n = 30) que mostraron alguna vía de desarrollo morfogénico después de 60 días de la recuperación del nitrógeno líquido (NL) y el cultivo en MS + KIN 1 + IBA 0,01.

Las tres técnicas empleadas (Vitrificación, Gota-vitrificación y V-criolámina) no resultaron adecuadas para la crioconservación de ápices de plantas etioladas de *Cohniella cepula* y *C. jonesiana*, al menos en lo que respecta al tipo de crioprotectores utilizados y tiempos de exposición que se evaluaron. Si bien la mayoría de las sustancias crioprotectoras en las concentraciones elevadas presentan fitotoxicidad, considerando las tasas de supervivencia obtenidas a partir de los tratamientos controles, queda demostrado que las utilizadas en este experimento ocasionaron ese efecto negativo en los explantes, pero no en su totalidad. De todas formas, no fueron suficientes para proteger adecuadamente a los ápices para tolerar la exposición al NL. Además, la tasa de supervivencia varió de acuerdo a la PVS utilizada, constatándose que la solución PVS3 resulta menos fitotóxica para este explante evaluado.

7. CONCLUSIONES

Este trabajo constituye un interesante aporte biotecnológico dado que la regeneración de plantas a partir de ápices caulinares, además de permitir la clonación de genotipos selectos tanto por sus características ornamentales como agronómicas, brinda un explante muy apropiado a la hora de encarar estudios para la crioconservación de su germoplasma, dado que se constituye de tejidos organizados y potencialmente estables desde el punto de vista genético, lo que garantiza el almacenamiento seguro de germoplasma.

De todos modos, aun se debe continuar investigando para ajustar ciertas variables que permitan establecer un protocolo adecuado de crioconservación para ápices caulinares de *Cohniella cepula* y *C. jonesiana*. Es necesario determinar tanto la máxima concentración posible de crioprotectores como los tiempos máximos de exposición a ellos, lo cual no resulte tóxico para la célula y a la vez sea suficiente para proteger adecuadamente a los tejidos para tolerar la exposición al NL.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonner, F.T. 1990. Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation. *Forest Ecology and Management* 35: 35-43.
- Bunn, E.; Turner, S.R.; Panaia, M. & K.W. Dixon. 2007. The contribution of in vitro technology and cryogenic storage to conservation of indigenous plants. *Australian Journal of Botany* 55: 345-355.
- Carnevali Fernández-Concha G.; Cetzal-Ix W.; Balam Narváez R. & G. Romero-González 2010. A synopsis of *Cohniella* (Orchidaceae, Oncidiinae). *Brittonia* 62(2): 153-177.
- Correa, M.N. 1996. Orchidaceae. En: Zuloaga, F.O. & O. Morrone (eds.) Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina I. Pteridophyta, Gymnospermae y Angiospermae Monocotyledoneae. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 60: 242-271.
- Dolce N.; Dávalos S.; Medina R. & L. Mroginski. 2016. Micropropagación clonal de *Cohniella cepula* (Orchidaceae) mediante el cultivo in vitro de explantes florales. *Actas XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*, pp. 197.
- Engelmann, F. 1991. In vitro conservation of tropical plant germplasm-a review. *Euphytica* 57: 227-243.
- Evans, D.A.; Sharp, W.R. & C.E. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T.A. (ed.) *Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture*. Academic Press, New York, pp. 45-113.
- Givnish, T.J.; Spalink, D.; Ames, M.; Lyon, S.P.; Hunter, S.; Zuluaga, A.; Iles, W.J.D.; Clements, M.A.; Arroyo, M.T.K.; Leebens-Mack, J.; Endara, L.; Kriebel, R.; Neubig, K.M.; Whitten, W.M.; Williams, N.H. & K.M. Cameron. 2015. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 282, 20151553.

- Insaurralde I.S. & J.A. Radins. 2007. Misiones Orquídeas - Orchids. Primera edición Buenos Aires Golden Company, Buenos Aires, 192 pp.
- Iriondo Alegría, J. 2001. Investigación agraria. Producción y Protección Vegetales 16: 5-24.
- Iriondo, J.M. & J.M. Pita. 1998. Bancos de cultivo in vitro. Agricultura 794: 714-715.
- Johnson A.E. 1992. Listado tentativo de las orquídeas de la Argentina. (Abundancia - Distribución - Conservación). Boletín Técnico Fundación Vida Silvestre Argentina 11: 1-82.
- Johnson, A.E. 2001. Las Orquídeas del Parque Nacional Iguazú, LOLA, Buenos Aires, 296 pp.
- Kaczmarczyk, A.; Turner, S.R.; Bunn, E.; Mancera, R.L. & K.W. Dixon. 2011. Cryopreservation of threatened native Australian species-what have we learned and where to from here? In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant 47: 17-25.
- Mroginski L.A. & W.M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia, pp. 19-40.
- Murashige T. & F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Panis, B.; Piette, B. & R. Swennen. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. Plant Science 168: 45-55.
- Pita Villamil, J.M. & C. Pérez Ruiz. 1997. Crioconservación de semillas. Agricultura 775: 123-125.
- Popova E.; Kim H.H.; Saxena P.K.; Engelmann F. & H.W. Pritchard. 2016. Biotechnology Advances 34: 380-403.
- Pritchard, H.W. 1995. Cryopreservation of seeds. En: Day, J.G. & M.R. McLellan. (eds.). Methods in Molecular Biology, Vol. 38. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 133-144.
- Sakai, A. & F. Engelmann. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. CryoLetters 28: 151-172.
- Wood, J. 1989. En: Pritchard, H.W. (ed.), Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management, Cambridge University Press, UK, pp. 141-145.
- Withner, C.L. 1977. Threatened and endangered species of orchids. En: Extinction is forever. Eds. Prance, G.T. & T.S. Elias. New York Botanical Garden. USA, pp: 314-322.
- Yamamoto S.; Rafique T.; Priyantha W.S.; Fukui K.; Matsumoto T. & T. Niino. 2011. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. CryoLetters 32: 256-65.
- Yamamoto S.; Rafique T.; Fukui K.; Sekizawa K. & T. Niino. 2012. V-Cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: Case study of mint cryopreservation. CryoLetters 33: 12-23.