



## EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO PROLONGADO SOBRE LA VIABILIDAD Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN SEMILLAS DE *Encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr.

### LONG TERM-STORAGE EFFECT ON VIABILITY AND FATTY ACIDS PROFILE OF *Encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr SEEDS.

Manuel Aguirre-Bolaños<sup>1</sup>, José C. Benítez-Flores<sup>2</sup>, María R. González-Valle<sup>2</sup>, Luis B. Hernández-Portilla<sup>1</sup>, Rafael E. Quintanar-Zúñiga<sup>1</sup> y César M. Flores-Ortiz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología Vegetal, Unidad de Biología y Prototipos, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av de los Barrios 1. 54090, Los Reyes Iztacala, Edo. México. Tel. (0155) 5623-1131, Fax (0155) 5623-1225. <sup>2</sup>Laboratorio de Histología, Unidad de Morfología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

\*Autor para correspondencia (cmflores@unam.mx)

#### RESUMEN

México concentra 6 % de la diversidad de Orchidaceae, una de las familias botánicas más ricas; sin embargo, la pérdida de su hábitat y su sobreexplotación han disminuido sus poblaciones. Los bancos de semillas podrían conservar el germoplasma de orquídeas mexicanas *ex situ*; en ellos debe evaluarse periódicamente la viabilidad y perfil bioquímico del material almacenado, ya que las condiciones de temperatura y humedad elevadas durante el almacenamiento pueden ocasionar lipo-peroxidación y pérdida de viabilidad. Para comprobarlo se comparó entre dos lotes de semillas con diferente tiempo de almacenamiento con un lote de semillas envejecidas artificialmente, semillas de *Encyclia adenocarpa* recolectadas en 2007 y 2014, conservadas en el Banco de Semillas FES Iztacala, UNAM, se envejecieron artificialmente por 0, 6, 12 y 18 d a 45 °C y 45 % HR. Las semillas así tratadas fueron germinadas en medios Knudson C (KC) y Phytamax (PH), (a 25 ± 1 °C con fotoperiodos de 12 h luz/12 h de oscuridad). Se determinó su viabilidad con cloruro de tetrazolio, perfil lipídico, morfología con microscopía de barrido e histología con microscopía óptica. Las semillas envejecidas por 6 d y germinadas en medio Knudson C tuvieron 95 % de germinación y las recolectadas en 2007 no germinaron. El envejecimiento acelerado y natural disminuyó la concentración de ácidos grasos insaturados y alteró la estructura anatómica y embrionaria de las semillas, lo que provocó la pérdida de viabilidad de las semillas de *E. adenocarpa*.

**Palabras clave:** Orquídeas, medios de cultivo, ácido linoleico, embrión, testa.

#### SUMMARY

Mexico has 6 % of the Orchidaceae diversity, one of the most diverse botanic families; however, the habitat loss and the species overexploitation have diminished their populations. Seed banks could be a great option for storing *ex situ* Mexican orchids germplasm; in this kind of storing, seeds viability and biochemical profile should be evaluated periodically. *Encyclia adenocarpa* seeds collected in 2007 and 2014, preserved in UNAM FES Iztacala seed bank were aged for 0, 6, 12 and 18 d under 45 °C and 45 % RH conditions. Seeds were germinated in Knudson C (KC) and Phytamax (PH) media (at 25 ± 1 °C with photoperiod light 12 h/dark 12 h). Viability was analyzed using tetrazolium chloride assay, and the lipid acid profile was assessed. Scanning electron microscopy and optic microscopy were used for examining seed morphology. Six days aged seeds grown in Knudson C media showed 95 % of germination while wild seeds collected in 2007 did not germinated at all. Accelerated and natural ageing of seeds of *E. adenocarpa* reduced unsaturated fatty acid concentration modified their anatomy and embryonic structure. These damages

caused loss of seed viability.

**Index words:** Orchids, culture media, linoleic acid, embryo, seed coat.

#### INTRODUCCIÓN

Con más de 25,000 especies en todo el mundo, Orchidaceae es una de las familias botánicas más diversas y ampliamente distribuidas. México, como país megadiverso, ocupa el quinto lugar mundial en riqueza de plantas (SEMARNAT, 2005) y en orquídeas posee alrededor de 1300 especies de las cuales 40 % son endémicas y representan 6 % de la orquideoflora mundial (Soto y Salazar, 2004). Desde tiempos precolombinos estas plantas se han utilizado como: aromatizantes, afrodisiacos, medicinales, alimenticias, cementantes y ornamentales (Ossenbach, 2005). La recolecta descontrolada de orquídeas silvestres junto con la pérdida acelerada de su hábitat, la urbanización y el cambio climático (Swartz y Dixon, 2009), han provocado que 187 especies estén listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059 dentro de alguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2010).

Por lo anterior, es necesario resguardar la biodiversidad de esta familia. Una opción son los bancos de semillas, como una de las alternativas más efectivas para conservar el germoplasma de especies ortodoxas *ex situ* (Lohengrin, 1999). La conservación de semillas de orquídeas a largo plazo requiere monitoreo periódico de su calidad y viabilidad con pruebas de germinación y análisis de la composición lipídica, para conocer el grado de envejecimiento (Thornhill y Koopowitz, 1992).

Los estudios de la germinación *in vitro* de las semillas de orquídeas incluyen análisis del efecto de las condiciones de almacenamiento como temperatura y humedad, previas a su germinación (Pritchard *et al.*, 1999; Thornhill y Koopowitz,

1992), y de germinación como medio de cultivo, fotoperiodo y factores de crecimiento (Dutra *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2010). Aunque la información de la fisiología de la germinación de semillas de orquídeas es amplia, los cambios que ocurren en el perfil de ácidos grasos se conocen parcialmente (Colville *et al.*, 2016). En semillas diversas la temperatura y humedad elevadas durante el almacenamiento pueden ocasionar lipo-peroxidación y pérdida de viabilidad (McDonald, 1999).

Los cambios en la morfología de las semillas de orquídea durante su almacenamiento a largo plazo tampoco se conocen. Esta información podría ser valiosa en los bancos de germoplasma. El objetivo del presente estudio fue caracterizar los efectos del almacenamiento en condiciones de banco de germoplasma y envejecimiento acelerado de semillas de *E. adenocarpa* sobre su viabilidad, morfología y composición lipídica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Prueba de viabilidad.** Cinco mg de semillas de cada tratamiento se mantuvieron en sacarosa 10 % por 24 h a 40 °C. La solución se eliminó y las semillas se mantuvieron 24 h en oscuridad con 1 mL de cloruro de tetrazolio a 0.43 % a 30 °C. Las semillas se enjuagaron y se evaluó su reacción al cloruro de tetrazolio.

**Envejecimiento acelerado.** Se aplicó en un recipiente de plástico provisto con tapa hermética que contenía 15 mL de una solución de LiCl a 40.5 % (Hay *et al.*, 2008), para mantener una humedad relativa de 45 % dentro de estas cámaras de envejecimiento se colocaron cajas Petri con 40 mg de semillas cosechadas en 2014 y ahí se mantuvieron por 6, 12 y 18 d. Las cámaras estuvieron en oscuridad y dentro de estufa a 45 °C, condiciones que aceleran el envejecimiento de las semillas. Las semillas testigo se mantuvieron en una cámara de envejecimiento a temperatura y humedad relativa ambiental en oscuridad. Después se evaluó la germinación de las semillas envejecidas y del testigo como se indica a continuación.

**Germinación.** La germinación se evaluó en semillas recolectadas en mayo 2014, almacenadas a 15 °C y 15 % HR, y en septiembre 2007, almacenadas en condiciones no controladas. Diez mg de semillas se desinfectaron con solución de NaClO (2.5 %) y Tween (1 %) por 15 min y luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Cinco repeticiones por unidad experimental, se sembraron en campana de flujo laminar, 100 semillas de cada lote en caja Petri con medio Knudson C o Phytamax y agar a 1.5 %, esterilizado por 20 min a 120 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup>.

Las cajas se mantuvieron a 25 °C, con fotoperiodo de 12

h luz/12 h oscuridad, e intensidad lumínica de 110 μmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Se cuantificó porcentaje de germinación, tasa máxima germinativa (TMG), tiempo medio de germinación (TMDg) y sincronía. El porcentaje de germinación se analizó con el valor del arcoseno. Cada variable se sometió a un análisis de varianza (ANDEVA) de dos factores y en su caso se aplicó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD, por sus siglas en inglés) para determinar diferencias entre medias.

**Extracción y transesterificación de ácidos grasos de semillas.** Lotes de 2.5 mg de semillas se maceraron por 3 min con 1 mL de CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (2:1) con mortero y pistilo. La muestra se recuperó en tubos Eppendorf y luego se agitó en vortex Genie® 2 (Scientific Industries™, Waltham, Massachusetts, USA), por 5 min. Para separar las fases y recuperar la fracción orgánica, la muestra se lavó con NaCl a 0.9 % (0.2 mL) y se centrifugó 5 min a 18,000 X g y 4 °C para evitar la oxidación (Priestley *et al.*, 1985). Para la transesterificación, 100 μL de la fase orgánica se evaporaron con N<sub>2</sub>, se adicionaron 500 μL de BF<sub>3</sub> a 12 % en CH<sub>3</sub>OH y la mezcla se colocó en ebullición por 20 min. Después de enfriarse a temperatura ambiente se adicionó 1 mL de hexano y 500 μL de agua destilada, de acuerdo con el método de Priestley *et al.* (1985) modificado de Morrison y Smith (1964). El ácido heptadecanoico se empleó como estándar interno para cuantificar los ácidos grasos.

**Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS por sus siglas en inglés).** Este análisis se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6850, Santa Clara, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5975C VL MSD, Santa Clara, CA, USA). El análisis se hizo con inyección en modo de fraccionamiento, temperatura del inyector de 200 °C, gradiente de temperatura de 100 (3 min al inicio) a 250 °C (mantenida 4 min) y tasa de aumento de 5 °C por min. La columna del cromatógrafo fue del tipo DB-1 (dimetilpolisiloxano). El gas acarreador fue He a 35 cm s<sup>-1</sup>.

Las condiciones del detector de masas fueron: línea de transferencia a 250 °C, intervalo de 20 a 400 m z<sup>-1</sup>, polaridad positiva, temperatura de la fuente de iones de 200 °C, el tipo de ionización de impacto electrónico a 70 eV. La muestra que se analizó fue de 2 μL de los ácidos grasos derivatizados. Los estándares de los ésteres metílicos y patrones de fragmentación se obtuvieron de bibliotecas de referencia (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, NIST, por sus siglas en inglés, (<https://www.nist.gov>)).

**Morfología de la semilla.** Las semillas de los cinco tratamientos de envejecimiento acelerado se montaron sobre portaobjetos cilíndricos de aluminio, se recubrieron con

cerca de 7 nm de oro en una ionizadora a 1200 V y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-6380LV, Tokio, Japón).

**Histología de las semillas.** Diez mg de semillas se embebieron por 48 h en agua, se mantuvieron (fijaron) en formol 10 % por 24 h y se enjuagaron por 1 h. Después se aplicó (post-fijación) ácido crómico (0.5 %) por 24 h y se enjuagaron por 1 h. Las muestras se deshidrataron en series graduales con etanol y xilol e incluyeron en parafina. Los cortes de 7 µm se tiñeron con safranina-verde rápido y con tinción específica para lípidos (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2003).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las orquídeas poseen semillas ortodoxas (Pritchard *et al.*, 1999) sin endospermo, por lo que dependen de una fuente exógena de nutrimentos. Ésta, en su medio natural puede ser provista por hongos micorrízicos, y en el laboratorio por los medios de cultivo (Eriksson y Kainulainen, 2011; Stewart *et al.*, 2003).

**Viabilidad.** El porcentaje de viabilidad fue (38.86 % ± 3.92) mayor (P ≤ 0.05) en las semillas de 2014 (Figura 1), respecto a las de 2007 (9.74 % ± 1.94). Esto permite sugerir que el almacenamiento a temperatura ambiente disminuye la viabilidad de esas semillas. La longevidad de las semillas fue equivalente a la obtenida en criopreservación de la especie de *Hadrolaelia grandis* (Vudala y Ribas, 2017). Los resultados de viabilidad se relacionan directamente con la ausencia de germinación de las semillas de *E. adenocarpa*

de 2007. Además, los valores de germinación de los testigos Knudson C (KC) y Phytamax (PH) (36 % y 40.2 %) fueron cercanos a los de viabilidad de las semillas de 2014.

**Germinación.** El porcentaje mayor de germinación se obtuvo en 6 d KC y 6 d PH, que representó más del doble (P ≤ 0.05) con respecto al testigo en medio KC y PH (Figura 1). A partir de los 12 d de envejecimiento acelerado la germinación disminuyó estadísticamente con respecto al testigo. En las semillas con 7 años de envejecimiento natural en banco de germoplasma la germinación fue 0 %.

La tasa máxima germinativa (TMG) más elevada (5.6) fue la de las semillas con 6 d de envejecimiento en ambos medios y en las envejecidas por 18 d en medio PH (5.5), sin diferencias significativas con respecto al testigo (P ≤ 0.05). Las TMG menores (2.39 y 2.32) correspondieron a 12 d en ambos medios (Figura 2 A). El tiempo medio de germinación (TMdG) fue mayor en 6 d en ambos medios (22.9 y 22.45 d) y superó por 8 d a los testigos (P ≤ 0.05) que, a la vez, fueron los tratamientos con menor TMdG (Figura 2 B).

Las semillas envejecidas por 12 d y germinadas en el medio KC y PH presentaron la sincronía más alta (0.77 y 0.75 d) respectivamente, y las envejecidas por 6 d germinadas en KC con 1.78 d (Figura 2 C), fue el tratamiento con menos sincronización en la germinación (P ≤ 0.05).

Los medios de cultivo no generaron diferencias estadísticas en los porcentajes de germinación. La tendencia del valor mayor en medio Knudson C concuerda parcialmente con el desarrollo mayor de *Bletia gracilis* en el medio Vacin

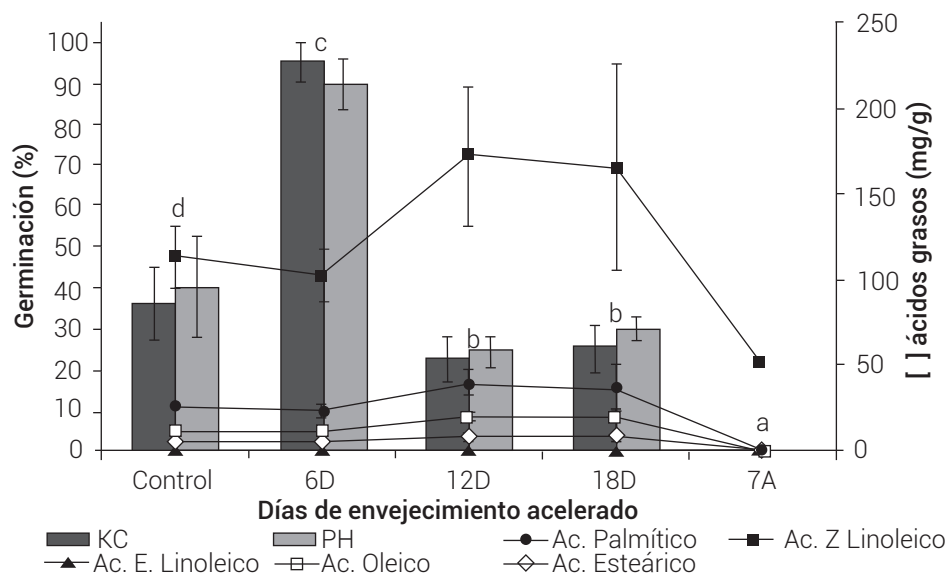


Figura 1. Germinación de semillas de *Encyclia adenocarpa* en medios de cultivo Knudson C (KC) y Phytamax (PH) y concentración de ácidos grasos de las semillas. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, 0.05).

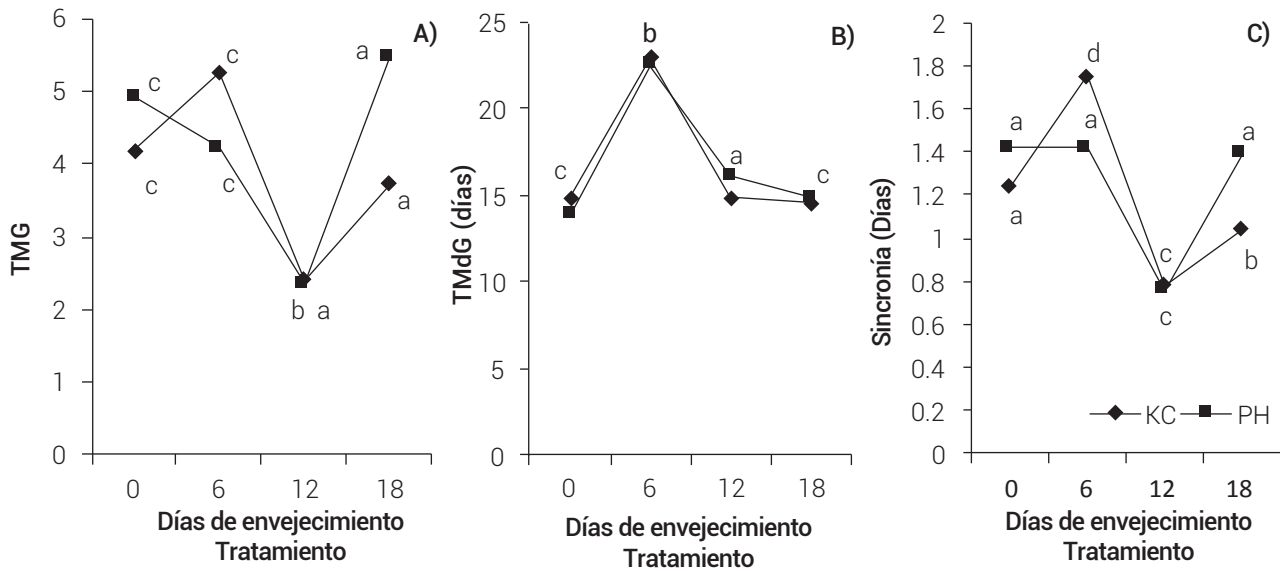


Figura 2. Parámetros germinativos de semillas de *Encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr. Recolectadas en 2014. (A) Tasa máxima germinativa (TMG), (B) Tiempo medio de germinación (TMdG) y (C) Sincronía. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD, 0.05). KC: medio Knudson C; PH: medio Phytamax.

y Went que igual que Knudson C, consta únicamente de macronutrientes (Dutra *et al.*, 2008). La tendencia de algunas semillas de orquídeas para germinar mejor en medios de composición sencilla, puede deberse a que en su medio natural, suelen germinar en lugares con baja disponibilidad de nutrientes (Johnson *et al.*, 2011).

Las semillas del testigo y las envejecidas por 12 y 18 d tuvieron porcentajes mayores de germinación y TMG en el medio Phytamax, similar a lo que observaron Ruíz *et al.* (2008). Particularmente, en el tratamiento testigo, como en el estudio de Lee *et al.* (2010), después de la emergencia del embrión en medio Phytamax la semilla mostró reproducción vegetativa pues a partir de cada semilla se originaron varios clones (formación de callo embriogénico).

La composición del medio Phytamax (macro y micronutrientes, y ácido naftalenacético) cumple con los requerimientos nutricios que Lee *et al.* (2010) señalan como indispensables para lograr la producción exitosa de plántulas con dicho proceso, también señalaron que este fenómeno es conveniente, porque aumenta la producción de las plantas seleccionadas. Sin embargo, para la conservación de germoplasma, la FAO (2014) indica puntualmente que la embriogénesis somaclonal debe evitarse para reducir los procesos de erosión genética del material resguardado. Así, se observó que el medio más adecuado para germinar las semillas que se han almacenado en banco de germoplasma es el Knudson C, pues propicia la germinación y, en contraste con Phytamax, el proceso natural de desarrollo de cada plántula, lo que permite diferenciar en forma nor-

mal sus estructuras (Johnson *et al.*, 2011).

El incremento en la germinación de las semillas envejecidas por 6 d respecto al testigo y a los otros tiempos de envejecimiento, también se observó en orquídeas terrestres (Hay *et al.*, 2010). *E. adenocarpa* se distribuye en zonas áridas y semiáridas de México, que son sitios con estacionalidad marcada, poca lluvia y generalmente con humedad ambiental reducida (Hágsater *et al.*, 2005). Para que la especie sobreviva en esos lugares sus semillas deben germinar a pesar de lo errático de las lluvias. Un comportamiento similar de memoria hídrica y acondicionamiento ecológico ("priming") se ha reportado en algunas cactáceas que presentan adaptaciones fisiológicas que les permiten aprovechar el suministro discontinuo de agua para completar gradualmente su germinación (Dubrovsky, 1998).

Los porcentajes de germinación registrados después de 6 d de envejecimiento, sugieren que *E. adenocarpa* podría presentar una adaptación fisiológica similar. Ésta se estimó con la elevada humedad ambiental (45 % HR) que se proporcionó durante el tratamiento; sin embargo, los valores de TMdG altos y de sincronía difieren de la germinación rápida y uniforme observada por otros autores al aplicar tratamientos de acondicionamiento de las semillas (Dubrovsky, 1998; McDonald, 2004).

Baskin y Baskin (2001) y Kauth *et al.* (2008) ya habían indicado la latencia en semillas de orquídeas que habitan en condiciones estresantes, lo cual coincide con los datos

de germinación aquí obtenidos en función del tiempo de envejecimiento, que indican que con 6 d de envejecimiento la latencia se supera. Esto indica que la temperatura y humedad de los tratamientos probablemente promovieron la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las semillas, que en bajas concentraciones son indispensables para el rompimiento de la latencia y la germinación. En relación con esto, la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye la concentración de ácido abscísico (promotor de la latencia) y aumenta la concentración de giberelinas, que estimulan la ruptura de la latencia de las semillas y propician su germinación (Jeevan *et al.*, 2015; Kucera *et al.*, 2005).

**Análisis de ácidos grasos por GC-MS.** El perfil de los ácidos grasos en las semillas de 2014 con 18 d de envejecimiento acelerado fue similar al perfil de las semillas de 2007; con la excepción del ácido linoleico, que se presenta solo en estas últimas. Así se observó un leve decremento de la concentración de ácidos grasos con 6 d de envejecimiento, seguido de un marcado incremento prominente hacia el día 12, especialmente en el ácido Z linoleico con respecto al testigo; al día 18 disminuyeron ligeramente las concentraciones, y en las semillas de 2007 se observó disminución pronunciada en la concentración de todos los ácidos grasos (Figuras 1 y 3).

El aumento desproporcionado de la concentración de ROS, genera gran cantidad de daños, principalmente en lípidos de membrana y de reserva, a través de la peroxidación lipídica, fenómeno que explica la disminución en la concentración de ácidos grasos al día seis de envejecimiento (Jeevan *et al.*, 2015). El aumento en la concentración de estos ácidos grasos con 12 y 18 d de envejecimiento, y el incremento en la TMG al día 18 puede deberse a que las semillas, por su tamaño pequeño, absorbieron suficiente humedad ambiental durante el tratamiento, con lo que su metabolismo se reactiva y también se activan los mecanismos de reparación que contrarrestan la peroxidación lipídica (McDonald, 2004).

En esas condiciones las semillas germinaron rápido y uniformemente, y mantuvieron porcentajes de germinación superiores a 20 %, la caída de este valor con respecto al día seis de envejecimiento, confirmó el deterioro de las semillas al exponerse más tiempo a condiciones de envejecimiento acelerado, estos resultados coinciden con lo que antes reportaron Hay *et al.* (2010).

La ausencia de germinación de las semillas de 2007 y su viabilidad reducida son efecto de la peroxidación prolongada de sus lípidos. Luego de 7 años de envejecimiento se observó que el perfil lipídico constó de dos ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) y solo uno insaturado (linoleico), en sus formas *cis* y *trans*, de las cuales, la forma

*trans* se comporta como un ácido graso saturado, por su acomodo estructural; ello afecta la integridad membranal y viabilidad de las semillas (Balesevic-Tubic *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2013; Stewart y Bewley, 1980).

**Morfología de la semilla.** La microscopía electrónica mostró que las semillas de *E. adenocarpa* tienen forma fusiforme y engrosamiento de las paredes celulares. No se apreciaron diferencias entre las semillas de los tratamientos testigo, ED6, ED12 y del lote de 2007; pero en las del tratamiento ED18 se observó al embrión emerger de la testa durante el proceso de germinación (Figura 4).

Debido a la testa delgada y al tamaño reducido de las semillas, 45 % HR por 18 d fueron suficientes para que las semillas embebieran e iniciaran la germinación. Este fenómeno ya se ha reportado previamente (McDonald, 2004). Pero esta reacción en estas semillas es sobresaliente porque carecen de endospermo (Yeung *et al.*, 1996), y el hecho de que hayan germinado sin una fuente exógena de nutrientes, permite sugerir que las semillas de esta especie cuentan con reservas suficientes para comenzar su germinación, y probablemente responden a las condiciones limitantes de las zonas en las que habitan.

**Histología de las semillas.** Las técnicas histológicas mostraron diferencias anatómicas en la afinidad del tejido por el colorante, al tamaño de las células, y a la integridad de las estructuras entre las semillas de *E. adenocarpa* de los diferentes tratamientos. Los cortes longitudinales evidenciaron que en las semillas del testigo y envejecidas artificialmente, el citoplasma, núcleos y testa se tiñeron con mayor intensidad que las semillas del 2007. Los cortes transversales mostraron el alto nivel de conservación de las regiones anatómicas de las semillas del testigo, que contrastó con las alteraciones incipientes en las semillas envejecidas por 18 d y las estructuras altamente dañadas luego de 7 años de envejecimiento (Figura 5). La técnica de tinción con rojo oleoso mostró las diferencias de contenido y localización de lípidos entre las semillas de los tratamientos. El tono de la tinción fue diferente entre las semillas de 2007 y los demás tratamientos.

La microscopía óptica permitió observar la estructura interna de las semillas. Hubo diferencias sobresalientes entre las semillas testigo y las envejecidas naturalmente y artificialmente: una de las más notorias es la intensidad de tinción, ya que a pesar de haberse teñido simultáneamente, las semillas del lote de 2007 mostraron coloración menos intensa que todas las demás. La intensidad de tinción fue directamente proporcional a la concentración de sustancias afines con el colorante (Conn, 1953), por lo que puede afirmarse que, en las semillas envejecidas por 7 años, la concentración tanto de material esclerosado y nuclear

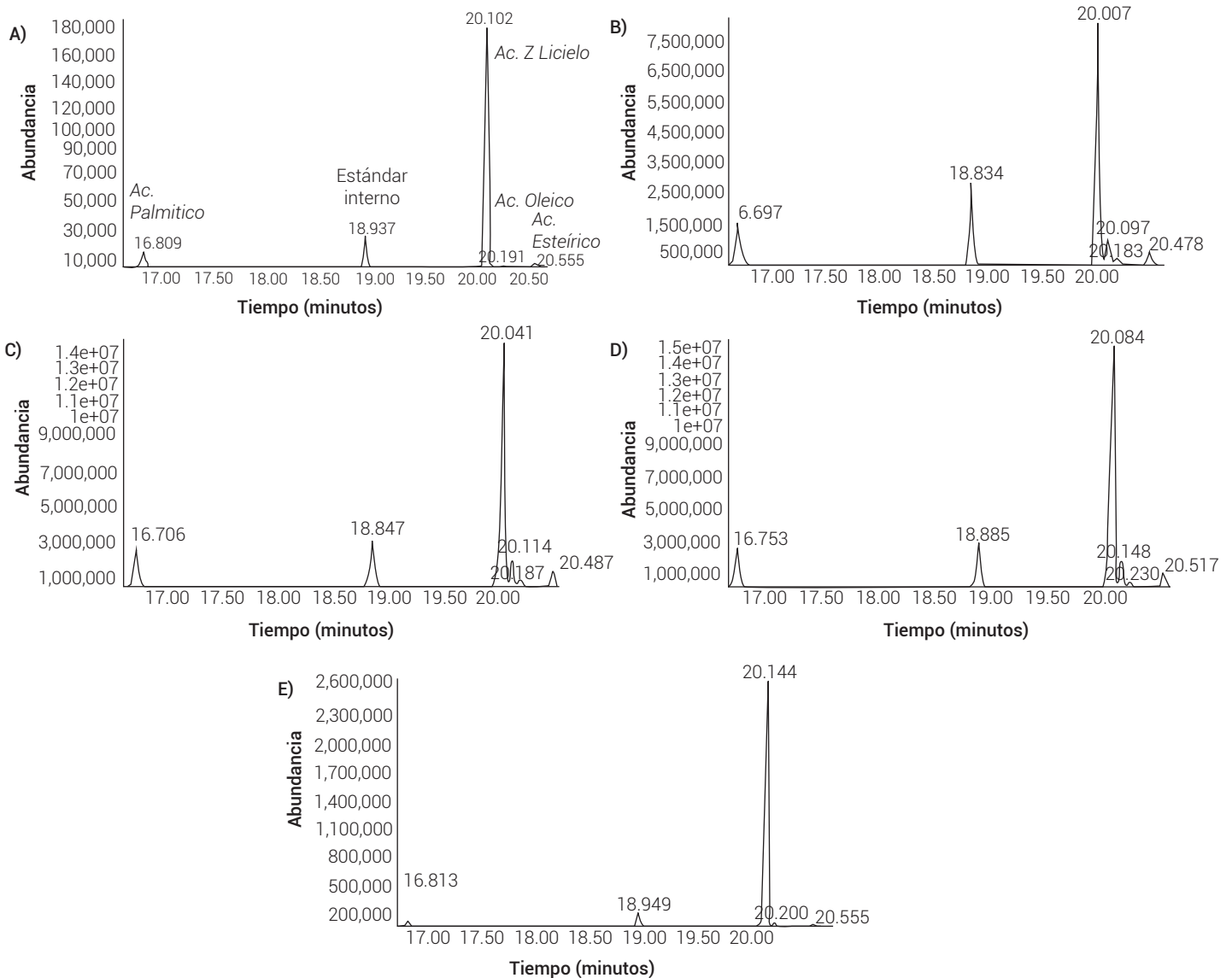


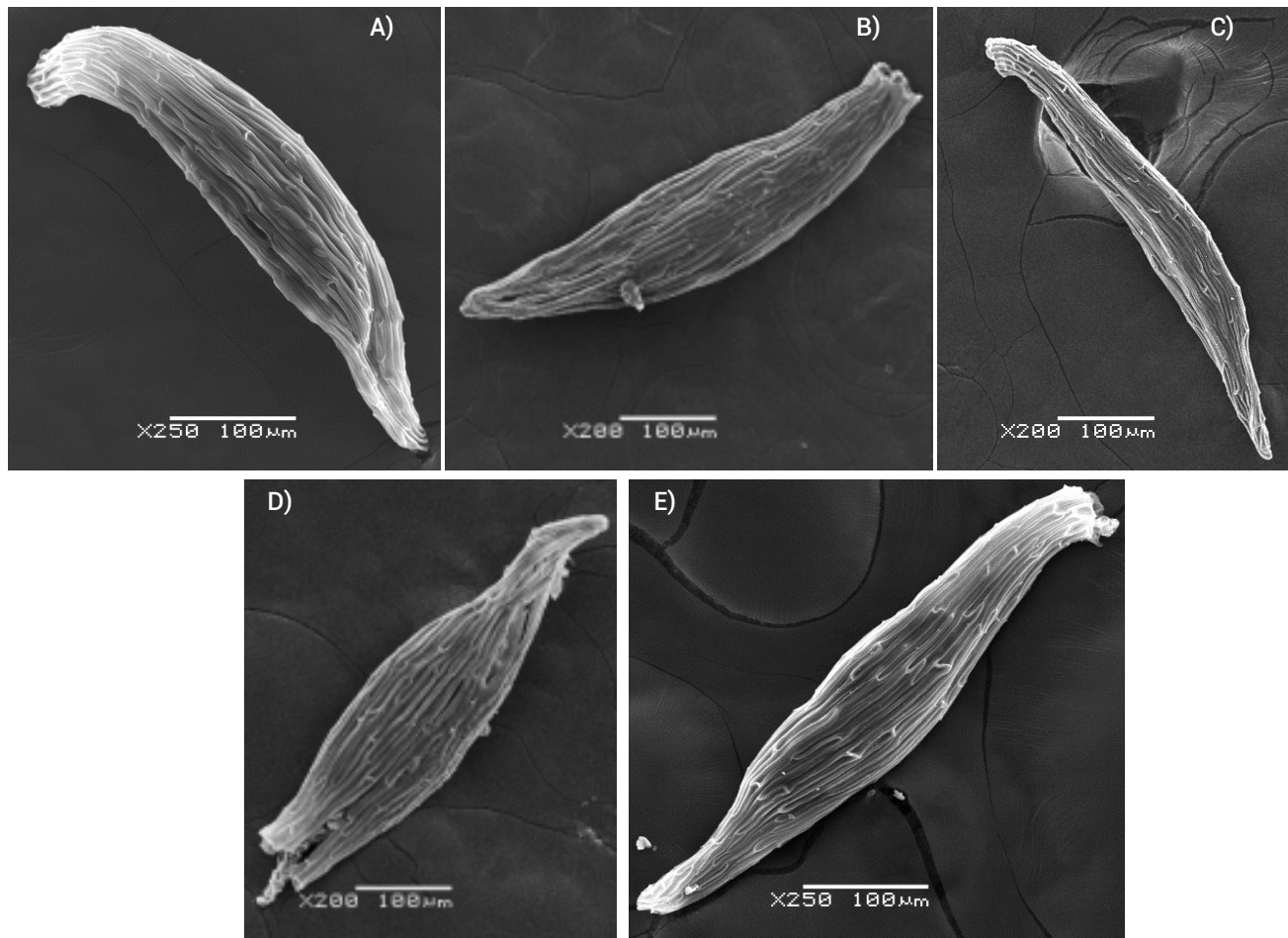
Figura 3. Cromatogramas de lípidos de las semillas de *Encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr. A) Testigo, B) Envejecidas por 6 d, C) Envejecidas por 12 d, D) Envejecidas por 18 d y E) Envejecidas por 7 años en banco de semillas.

(safranina), y citoplásmico (verde rápido), se vio reducida.

Este efecto se debe a la peroxidación de materiales celulares en la semilla completa, asociada al estrés oxidativo durante su envejecimiento (Hendry, 1993). Estos mismos daños afectan la estructura general de las semillas envejecidas, pues las semillas del 2007 mostraron zonas anatómicas poco diferenciadas y reducidas, citoplasma poco marcado, y embrión colapsado con núcleos poco visibles. En contraste, las semillas del tratamiento testigo se mostraron en condiciones excelentes, con células embrionarias robustas, que poseen núcleos evidentes y bien teñidos, y zonas anatómicas bien definidas, que incluye-

ron al embrión, suspensor uniestratificado, capa interna y externa de la testa uniestratificadas en su mayoría, pero pluriestratificada en algunas zonas, y exotesta (Sampaio et al., 2011). Las semillas con 18 d de envejecimiento presentaron características intermedias de deterioro estructural del embrión.

La tinción de lípidos permitió apreciar que a pesar de no tener endospermo, las semillas de *E. adenocarpa* portan cuerpos oleosos con forma esférica en las células embrionarias, como es común en monocotiledóneas (Perea-Flores et al., 2011); como en *Cymbidium sinense* (Yeung et al., 1996) y otras orquídeas (Arditti, 1992), estos tienen forma



**Figura 4.** Micrografía electrónica de barrido de la superficie de semillas de *Encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr. A) Testigo, B) Envejecidas por 6 d, C) Envejecidas por 12 d, D) Envejecidas por 18 d y E) Envejecidas por 7 años en banco de semillas.

esférica. Las diferencias entre los tratamientos, incluyeron coloración roja intensa en semillas de 2007 y color anaranjado amarillento en los otros tratamientos. Esto puede deberse a una afinidad mayor del rojo oleoso por los lípidos saturados que son más abundantes en las semillas del lote envejecido por 7 años.

Las semillas del tratamiento testigo y los tratamientos de envejecimiento acelerado tuvieron cuerpos oleosos bien formados y delimitados, en contraste con las de 2007 que mostraron manchones de lípidos no encapsulados. Esto permite sugerir que los cuerpos oleosos colapsaron durante el proceso de envejecimiento (Murphy *et al.*, 2001). También, se observó aumento en el número de cuerpos oleosos en las semillas envejecidas 18 d lo que puede deberse a la reactivación de su metabolismo. De este modo, el análisis cromatográfico se complementó con el histológico para explicar los cambios en las semillas de *E. adenocarpa* que perdieron su capacidad germinativa.

## CONCLUSIONES

El medio de cultivo Knudson C es mejor para germinar semillas de *E. adenocarpa* y propiciar el desarrollo de plántulas en comparación con el medio Phytamax. Las semillas en condiciones de 45 °C y 45 % HR por 6 d elevaron significativamente su porcentaje de germinación, debido al acondicionamiento de las semillas y disminución de la latencia. Tiempos mayores de exposición a esas condiciones disminuyen la germinación hasta eliminarla totalmente. El daño se relaciona con el proceso de peroxidación lipídica que disminuye la concentración de ácidos grasos insaturados. El cambio en el perfil lipídico de las semillas provoca daños celulares que pueden relacionarse con las alteraciones microestructurales y colapso de las células embrionarias y los cuerpos oleosos. Así las alteraciones en la morfología de la semilla se relacionan con la pérdida total de la capacidad germinativa.

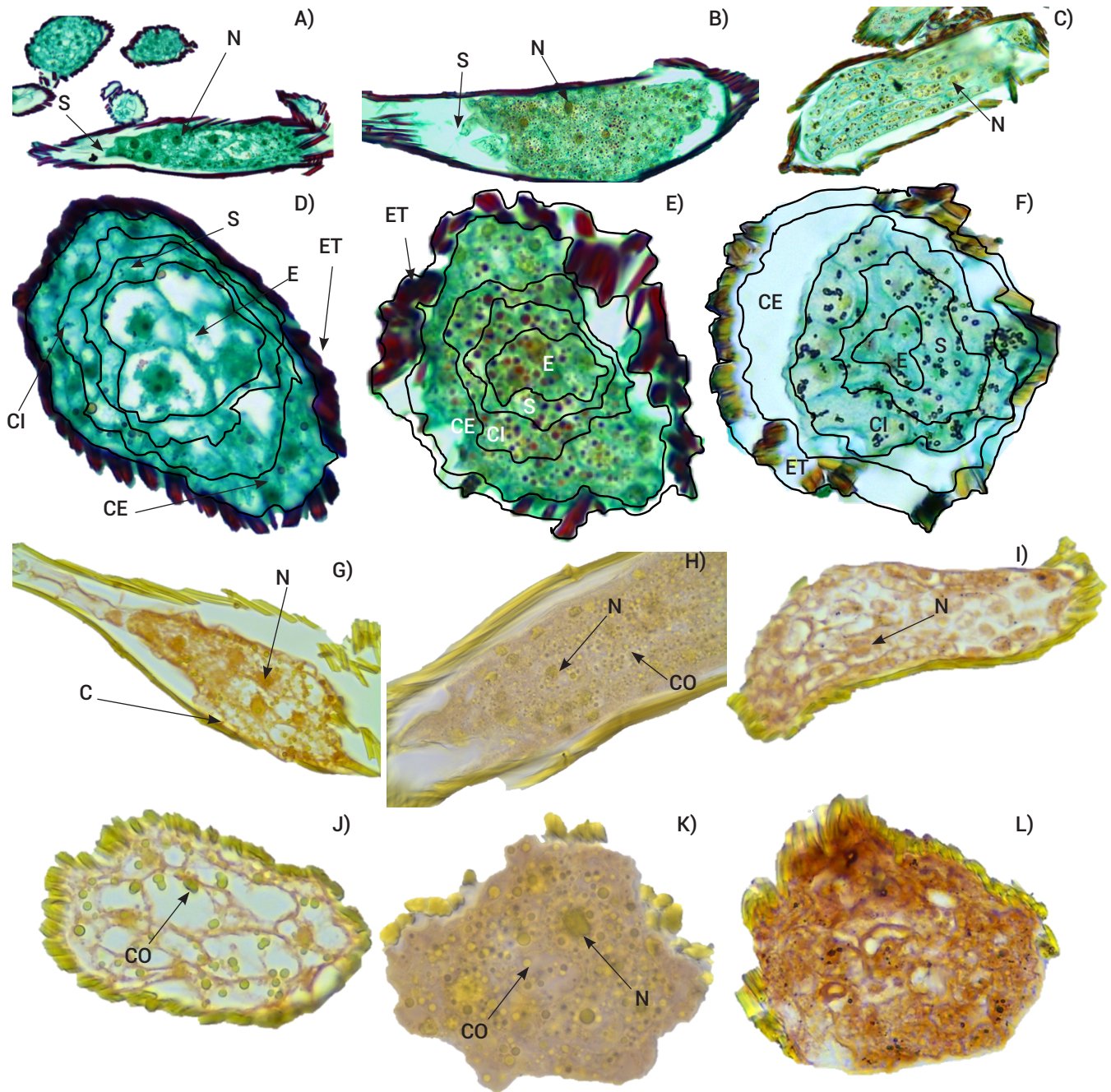


Figura 5. Cortes histológicos de semillas de *Encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr. Tinción de: 1) Safranina-verde rápido (A-F). Cortes longitudinales: A) Testigo, B) Envejecidas por 18 d y C) Envejecidas por 7 años en banco de semillas. Cortes transversales: D) Testigo, E) Envejecidas por 18 d y F) Envejecidas por 7 años en banco de semillas. N: Núcleo, S: Suspensor, CE: Capa externa de la testa, CI: Capa interna de la testa, E: Embrión, ET: Engrosamiento de la testa, 2) Rojo Oleoso (G-L). Cortes longitudinales: G) Testigo, H) Envejecidas por 18 d, y I) Envejecimiento por 7 años en banco de semillas. Cortes transversales: J) Testigo, K) Envejecidas por 18 días y L) Envejecidas por 7 años en banco de semillas; C: Cutícula y CO: Cuerpos oleosos.



## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al apoyo recibido por el Proyecto MGU-Plantas Útiles del Millennium Seed Bank, Toyal Kew Gardens y al Banco de Semillas de la FES Iztacala, UNAM.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arditti J. (1992) Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley & Sons. USA. 691 p.
- Balesevic-Tubic S., D. Malencic, M. Tatic and J. Miladinovic (2005) Influence of aging process on biochemical changes in sunflower seed. *Helia* 28:107-114.
- Baskin C. C. and J. M. Baskin (2001) Seeds Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press. San Diego, California, USA. 665 p.
- Colville L., T. R. Marks, H. W. Pritchard, C. C. Custódio and N. B. Machado-Neto (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* 26:84-91.
- Conn J. (1953) Biological Stains, a Handbook on the Nature and Uses of the Dyes Employed in the Biological Laboratory. 6<sup>th</sup> ed. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, Maryland, USA. 253 p.
- Dubrovsky J. G. (1998) Discontinuous hydration as facultative requirement for seed germination in two cactus species of the Sonoran Desert. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 125:33-39.
- Dutra D., T. R. Johnson, P. J. Kauth, S. L. Stewart, M. E. Kane and L. Richardson (2008) Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 94:11-21.
- Eriksson O. and K. Kainulainen (2011) The evolutionary ecology of dust seeds. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 13:73-87.
- FAO, Food and Agriculture Organization (2014) Normas para Bancos de Germoplasma de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. 182 p.
- Hágsater E., M. A. Soto A., G. A. Salazar C., R. Jiménez M., M. A. López R. y R. L. Dressler (2005) Las Orquídeas de México. Instituto Chinoin. México. 304 p.
- Hay F. R., J. Adams, K. Manger and R. Probert (2008) The use of non-saturated lithium chloride solutions for experimental control of seed water content. *Seed Science and Technology* 36:737-746.
- Hay F. R., D. J. Merritt, J. A. Soanes and K. W. Dixon (2010) Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164:26-41.
- Hendry G. (1993) Oxygen, free radical process and seed longevity. *Seed Science Research* 3:141-153.
- Jiménez P. P., L. Masson S. y V. Quitral R. (2013) Composición química de semillas de chía, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Revista Chilena de Nutrición* 20:155-160
- Jeevan K. S. P., S. Rajendra P., R. Banerjee and C. Thammineni (2015) Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany* 116:663-668.
- Johnson T. R., M. E. Kane and H. E. Pérez (2011) Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). *Plant Growth Regulation* 63:89-99.
- Kauth P. J., D. Dutra, T. R. Johnson, S. L. Stewart, M. E. Kane and W. Vendrame (2008) Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Advances and Tropical Issues. Volume V. J. A. Teixeira da S. (ed.). Global Science Books, Ltd. Department of Horticulture, Kagawa University, Japan. pp:375-391.
- Kucera B., M. A. Cohn and G. Leubner-Metzger (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15:281-307.
- Lee E. H. E., A. Laguna C., J. Murguía G., L. Iglesias-Andreu, B. García R., D. Escobedo L., Y. M. Martínez O., F. A. Barredo P. y N. Santana B. (2010) Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33:323-332.
- Lohengrin A. C. (1999) Bancos de semillas persistentes: modelos de germinación retardada y su aplicación en ambientes alpinos. *Revista Chilena de Historia Natural* 72:457-466.
- McDonald M. B. (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science Technology* 27:177-237.
- McDonald M. B. (2004) Orthodox seed deterioration and its repair. In: Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture. R. L. Benesh-Arnold and R. A. Sánchez (eds.). Food Products Press. New York, USA. pp:273-279.
- Morrison W. R. and L. M. Smith (1964) Preparation of fatty acid methyl ester and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research* 5:600-608.
- Murphy D. J., I. Hernández-Pinzón and K. Patel (2001) Role of lipid bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues. *Journal of Plant Physiology* 158:471-478.
- Ossenbach C. (2005) History of orchids in Central America part I: from prehispanic times to the independence of the new republics. *Harvard Papers in Botany* 10:183-226.
- Perea-Flores M. J., J. J. Chanona-Pérez, V. Garibay-Febles, G. Calderón-Dominguez, E. Terrés-Rojas, J. A. Mendoza-Pérez and R. Herrera-Bucio (2011) Microscopy techniques and image analysis for evaluation of some chemical and physical properties and morphological features for seeds of the castor oil plant (*Ricinus communis*). *Industrial Crops and Products* 34:1057-1065.
- Priestley D. A., B. G. Werner, A. C. Leopold and M. B. McBride (1985) Organical free radical levels in seed and pollen: The effects of hydration and aging. *Physiologia Plantarum* 64:88-94.
- Pritchard H. W., L. A. Poynter and P. T. Seaton (1999) Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. *Lindleyana* 14:92-101.
- Ruiz B. C., C. A. Laguna, A. L. G. Iglesias, A. Damon, H. T. N. J. Marín, R. H. S. Azpiroz y M. J. L. Moreno (2008) Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Phyton* 77:203-215.
- Sampaio M. J. L., S. M. Carmello-Guerreiro and B. Appezzato-da-Glória (2011) Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Flora* 206:601-609.
- SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2005) Biodiversidad México, un país megadiverso. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 36 p México. [http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe\\_04/04\\_biodiversidad.pdf](http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_04/04_biodiversidad.pdf) (Diciembre 2015).
- SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección Ambiental - Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres - Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio - Lista de Especies en Riesgo. Diario Oficial de la Federación. México. 75 p.
- Soto A. M. A. y G. A. Salazar C. (2004) Orquídeas. En: Biodiversidad de Oaxaca. A. J. García-Mendoza M. de J. Ordoñez y M. Briones-Salas. (eds.). Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund. Oaxaca, México. pp:271-295.
- Stewart R. R. C. and J. D. Bewley (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology* 65:245-248.
- Stewart S. L., L. W. Zettler, J. Minso and P. M. Brown (2003) Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida. *Selbyana* 24:64-70.
- Swartz N. D. and K. W. Dixon (2009) Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany* 104:543-556.
- Thornhill A. and H. Koopowitz (1992) Viability of *Disa uniflora* Berg (Orchidaceae) seeds under variable storage conditions: is orchid gene-banking possible? *Biological Conservation* 62:21-27
- Vudala S. M. and L. L. F. Ribas (2017) Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany* 108:1-7.

Yeung E. C., S. Y. Zee and X. L. Ye (1996) Embryology of *Cymbidium sinense*: embryo development. *Annals of Botany* 78:105-110.  
Zavaleta-Mancera H. A., M. S. Hernández-Villareal, J. A. Cuevas-Sánchez y E.

M. Engleman (2003) Anatomía de la semilla de *Cupania dentata* (Sapindaceae) con énfasis en la semilla madura. *Anales del Instituto de Biología, UNAM Serie Botánica* 74:17-29.