

## Aplicación de semillas artificiales como método de conservación *in vitro* de orquídeas: Encapsulación de embriones

### Application of Artificial Seeds as A Method of In Vitro Conservation of Orchids

Cárdenas Guarín, Jurghen Hernando; Sigarroa Rieche, Alina Katil; Salazar Mercado, Seir Antonio

**Jurghen Hernando Cárdenas Guarín**  
jurghenhernandocg@ufps.edu.co  
Universidad Francisco de Paula Santander, Colombia  
**Alina Katil Sigarroa Rieche**  
asigarroa@ufps.edu.co  
Universidad Francisco de Paula Santander, Colombia  
**Seir Antonio Salazar Mercado**  
salazar663@hotmail.com  
Universidad Francisco de Paula Santander, Colombia

**Revista Mutis**  
Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Colombia  
ISSN: 2256-1498  
Periodicidad: Semestral  
vol. 12, núm. 1, 2022  
revista.mutis@utadeo.edu.co

Recepción: 06 Octubre 2021  
Aprobación: 15 Noviembre 2021

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/193/1934639006/>

DOI: <https://doi.org/10.21789/22561498.1818>

**Resumen:** Las técnicas de conservación ex situ de germoplasma vegetal se han convertido en herramientas imprescindibles para la preservación de la biodiversidad en el mundo. Las orquídeas son conocidas por ser una de las familias más afectadas por este problema, y se requieren de grandes esfuerzos para asegurar genéticamente el germoplasma de estas especies. Con el paso de los años, el cultivo de tejidos vegetales se ha establecido como el método más práctico y efectivo para la conservación y propagación de la familia *Orchidaceae*, debido a la gran cantidad de material que se puede disponer de un número limitado de plantas. Sin embargo, es bien conocido el corto tiempo de vida en almacenamiento que presentan las semillas de las orquídeas. Desde el desarrollo biotecnológico se han implementado técnicas como la encapsulación de embriones vegetales, la cual ha obtenido resultados efectivos y favorables para la conservación de germoplasma de las orquídeas. En la presente revisión se hace una recopilación de algunos de los avances más significativos en la técnica de semillas artificiales, resaltando sus principales diferencias y similitudes con otras técnicas de preservación vegetal utilizadas para la conservación de orquídeas. Se demuestra así que las técnicas de encapsulación de embriones representan un gran avance para la conservación de orquídeas a corto y mediano plazo, y la optimización de los protocolos permitirá su uso en diferentes laboratorios de la región y el país, y contribuirá a la estandarización de la técnica y su implementación en distintas variedades de orquídeas, obteniendo un impacto significativo en la conservación de germoplasma de esta familia.

**Palabras clave:** alginato, conservación de semillas, gelificantes, *Orchidaceae*, semillas sintéticas.

**Abstract:** The *ex-situ* conservation techniques of plant germplasm have become essential tools for the preservation of biodiversity in the world. Orchids are known to be one of the most affected families by the problem of biodiversity loss, and great efforts are required to genetically secure the germplasm of these species. Over the years, plant tissue culture has become the most practical and effective method for the conservation and propagation of the *Orchidaceae* family, due to the large amount

of material that can be extracted from a limited number of plants. However, it is a well-known fact that the shelf life of orchid seeds is short. Biotechnological development has allowed the implementation of techniques such as the encapsulation of plant embryos, which has obtained effective and favorable results for the conservation of orchid germplasm. In this work, some of the most significant advances in the technique of artificial seeds are reviewed and their main differences and similarities with other plant preservation techniques used for the conservation of orchids are highlighted. It is thus demonstrated that embryo encapsulation techniques represent a great advance for the conservation of orchids in the short- and medium-term, and the optimization of the protocols will allow their use in different laboratories in the region and the country. It will also contribute to the standardization of the technique and its implementation in different varieties of orchids, obtaining a significant impact on the conservation of germplasm of this family.

**Keywords:** alginate, seed preservation, gelling agents, Orchidaceae, synthetic seeds.

## INTRODUCCIÓN

Inicialmente, la biotecnología se hace un camino en el agro a partir del cultivo de tejidos vegetales (CTV) con el objetivo de mejorar las capacidades fitosanitarias y agronómicas de diferentes especies vegetales de interés comercial, dando origen a la propagación masiva de plantas (Suárez, 2020). A inicios del siglo XX, Knudson (1922) realizó una investigación que generó un gran impacto en el mundo de las orquídeas: desarrolló el primer método eficaz para la germinación asimbiótica de semillas de *Cattleya*, dando origen a la propagación de plantas en condiciones in vitro (Knudson, 1946). Asimismo, diferentes autores como Arditti (1982) y Fast (1980) realizaron sus contribuciones al cultivo de tejidos vegetales: formularon distintos medios de cultivos para muchos géneros y especies silvestres. Este hecho, en consecuencia, promovió la experimentación continua y la búsqueda de nuevas técnicas que permitieran obtener plantas de manera rápida y efectiva, y que, del mismo modo, garantizaran la calidad del producto. Ante este panorama, el concepto de conservación de germoplasma adquiere gran relevancia; siguiendo lo descrito por Sánchez & Jiménez (2010), la conservación de los recursos fitogenéticos expresa el uso de métodos que guarden y protejan la diversidad genotípica de una planta, así como el uso de técnicas de almacenamiento, conservación y regeneración que disminuyan sus cambios y alteraciones con el paso del tiempo.

Las plantas que son propagadas en condiciones in vitro también están expuestas a deterioros y complicaciones durante el periodo de comercialización; sin embargo, estos inconvenientes son superados con el uso de la técnica de encapsulación (Bonilla, Mancipe, y Aguirre, 2015). Esta técnica se fundamenta en la tecnología desarrollada para la producción de semillas artificiales, es decir, la encapsulación de explantes en perlas de alginato de sodio. El encapsulado de los explantes permite hacerles pasar por un proceso drástico, sin el cual no podrían sobrevivir (Díaz, 2015). Esta característica posiciona la técnica de semilla sintética como un método seguro de conservación de germoplasma, que permite protegerla de los inconvenientes físicos del ambiente (Singh, Singh, y Khan, 2013).

Asimismo, Colombia es uno de los países más biodiversos a nivel mundial en cuanto a especies vegetales y en animales, de ahí la gran importancia de adoptar nuevas técnicas y herramientas que salvaguarden este recurso natural. Como bien se sabe, las orquídeas forman parte de la flora más importante en el país, llevando a una de sus variedades, *Cattleya trianae*, a ser nombrada en 1936 como la Flor Nacional del país (Ministerio

del Ambiente, 2015a; Salazar y Vega, 2017). Colombia es el país con mayor número de especies de orquídeas en el mundo, con un total de 4270 registradas, agrupadas en 274 géneros distribuidos en casi todo el territorio nacional. Sus colores, olores, formas, texturas y tamaños hacen que la familia Orchidaceae sea objeto de admiración permanente (Ministerio del Ambiente, 2015b, parr. 1; Salazar et al., 2019; Salazar et al., 2020a), lo que resulta en que sean apetecidas por diferentes grupos comerciales y el país pueda aprovechar estos recursos naturales como fuente económica (Lal y Singh, 2020).

De manera contraproducente, en los últimos años se ha intensificado la extracción de estas especies y no se controla su comercio respecto a la ley, lo cual ha producido un problema de amenaza de extinción (Pérez y Castañeda, 2016; Mercado et al., 2020). Según Orejuela (2010), esta familia ocupa lastimosamente el primer lugar como la familia de plantas con el mayor número de especies amenazadas de extinción, entre las cuales destacan negativamente los géneros *Masdevallia*, *Restrepia*, *Anguloa* y *Cattleya*, siendo estos incluidos globalmente en las categorías “Peligro Crítico (CR)” y “En Peligro (EN)” (Calderón-Sáenz, 2006). Estos géneros se encuentran gravemente amenazados por su comercio indiscriminado y la deforestación de hábitats naturales (Roura, 2010). Por lo tanto, la conservación de sus especies es un problema que debe ser tratado como prioridad para evitar la extinción de muchas especies de esta familia (Nandini y Giridhar, 2019). Además de esto, las orquídeas son plantas que poseen ciertas peculiaridades a nivel morfológico y ambiental; ante esta problemática, Chávez, Mosquera, y Otero (2014) explican que las orquídeas producen flores que pueden tardar un largo tiempo para su desarrollo debido a que sus semillas no cuentan con nutrientes de reserva para su germinación, por lo que deben ser suplementadas con hormonas o nutrientes externos. Dentro de este mismo punto es importante destacar la relación simbiótica utilizada por las orquídeas con algunos hongos micorrícicos, con el fin de incorporar correctamente los nutrientes del suelo para realizar su germinación, lo que implica que estas plantas necesitan algún tipo de suplemento o mecanismo externo para llevar a cabo su germinación natural (Knudson, 1922).

De esta manera, la técnica de encapsulamiento de embriones vegetales en semillas artificiales de alginato es una metodología que posee gran aplicación en el cultivo de tejidos vegetales (CTV), obteniendo resultados positivos en términos de conservación y viabilidad (Gantait y Mitra, 2019; Sunitibala y Neelashree, 2018). Esta técnica resuelve los problemas de reproducción de las orquídeas, los cuales limitan su propagación de modo natural; entre estos inconvenientes se encuentran el pequeño tamaño de las semillas (Arditti y Ghani, 2000) y la ausencia de sustancias de reserva, lo cual dificulta la viabilidad de las semillas (Calderón-Sáenz, 2006; Salazar et al., 2020b; Salazar et al., 2020c). Por tanto, dicha técnica puede desarrollarse como un método eficiente con potencial biotecnológico para la conservación y propagación masiva de plantas (Shaafi et al., 2021). Conforme a lo anteriormente descrito, es el objetivo de esta revisión recopilar los avances más significativos en la técnica de semillas artificiales para su comparación como método de conservación in vitro de orquídeas, resaltando su viabilidad, ventajas y desventajas con respecto a otros métodos, así como el desarrollo de un procedimiento general que permita la obtención de semillas artificiales de manera óptima.

## TÉCNICA DE SEMILLAS ARTIFICIALES

La técnica de producción de semillas sintéticas (artificial) hace referencia a la encapsulación de embriones somáticos o protocormos, en una matriz de algún agente gelificante, en su mayor caso, alginato de sodio (Bhattacharyya et al., 2018). Esta técnica permite la propagación y cultivo de especies que no pueden obtenerse mediante reproducción sexual, o en casos, donde esta, posea diversos inconvenientes que afecten su funcionamiento. Además, Pech (2017) agrega que, para facilitar la viabilidad y desarrollo del embrión encapsulado, es posible añadir reguladores de crecimiento y sustancias de reservas que cumplirían la función del endospermo, el cual no está presente en muchas especies de interés comercial, como es el caso de la familia *Orchidaceae*. Esto facilita el desarrollo normal de las semillas de las plantas, lo que conduce a una

germinación sintetizada y una formación saludable de las plantas (Nongdam, 2016). La representación de la semilla artificial es mostrada en la Figura 1.

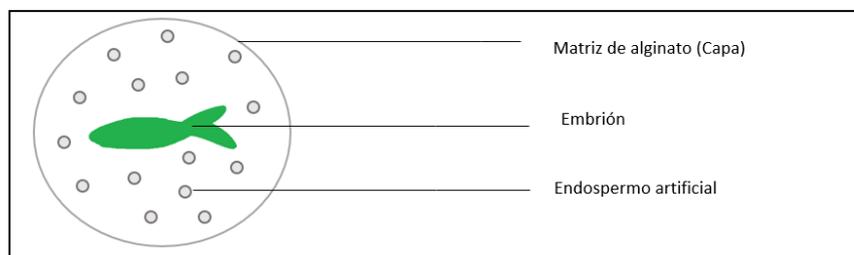


FIGURA 1.

Figura 1. Representación de una semilla artificial

Fuente: modificado de "Artificial seeds and their applications" (Saiprasad, 2001).

Teniendo en cuenta que las semillas sintéticas son análogas de las semillas tradicionales, es necesario resaltar que estas últimas poseen diversas limitaciones naturales, las cuales son resueltas a partir de las técnicas de encapsulación (Sevindik et al., 2019). Entre estos limitantes se encuentra el pequeño tamaño y la delicada estructura de las semillas de orquídea, la ausencia de tejido nutricional y la necesidad de germinaciones simbióticas para su correcto desarrollo. Por su parte, las semillas artificiales están conformadas por una cubierta que tiene la función de garantizar la protección de los explantes (Hung y Trueman, 2011); dicha cubierta o matriz debe incluir nutrientes y otros factores de crecimiento, formando así un endospermo artificial; igualmente, debe proteger la semilla artificial durante el almacenamiento y manipulación sin afectar su estado natural (Jain et al., 2018), permitir la germinación del embrión o protocormo, no ser tóxica y preferiblemente ser biodegradable (Sankari et al., 2020). Para el caso de las orquídeas, la formación de un endospermo artificial es fundamental para el mejoramiento de su viabilidad y germinación. Para el desarrollo de la planta, el endospermo artificial debe contener nutrientes, principalmente sales minerales, vitaminas y una fuente de carbono, sin que estos se lixivien (Sherif et al., 2017). De esta manera, el principal objetivo de la investigación en semillas artificiales es producir una estructura semejante que posea características de protección, nutrición y manejo práctico (Mudasir et al., 2017), donde la eficacia de la producción y de la conservación de dichas semillas artificiales está influenciada por varios factores, y la manipulación óptima de estos determinan el éxito de la técnica de las semillas sintéticas (Bekheet, 2017).

## USO DE GELIFICANTES PARA LA ENCAPSULACIÓN DE SEMILLAS ARTIFICIALES

Para la producción de semillas sintéticas, se han probado diferentes agentes gelificantes con el fin de determinar su eficiencia y practicidad para esta técnica; entre estos encontramos geles como el agar, el alginato, el polyco 2133, la carboximetilcelulosa, la carragenina, la gelrita, la goma guar, el pectato de sodio y la goma de tragacanto (Saiprasad, 2001); de estos, el alginato ha sido propuesto como el más adecuado para estos fines debido a sus propiedades de biocompatibilidad. Según lo descrito por Rihan et al. (2017), el alginato es seleccionado frecuentemente gracias a su moderada viscosidad y su baja toxicidad hacia los embriones, además de que es relativamente más económico que otros gelificantes; a esto se le suma su gran practicidad y capacidad de almacenamiento a largo plazo comparado con otros geles como el agar. El principio fundamental de la formación de la cápsula por parte del alginato es el intercambio de iones entre el sodio ( $\text{Na}^+$ ) del alginato de sodio y el calcio ( $\text{Ca}^+$ ) del cloruro de calcio; este intercambio produce un reordenamiento estructural en la cadena del alginato, resultando en un material sólido con las características de un gel (Reddy, Murthy, y Pullaiah, 2012). Este intercambio iónico no afecta la naturaleza de los embriones, los cuales se encuentran presentes en el proceso de formación de la cápsula. Un factor importante en este proceso es la solidez de la

cápsula, la cual dependerá de las concentraciones de los dos agentes utilizados para el encapsulamiento (Kaur, Sharma, y Kaur, 2019).

De la misma manera, el alginato cuenta con propiedades que permiten la adición de nutrientes, como lo es su capacidad de retención de agua o su capacidad como absorbente, lo cual constituye diversas aplicaciones en diferentes industrias como la de los alimentos. Gracias a esta característica, puede formar retículos poliméricos tridimensionales, los cuales poseen grupos hidrófilos capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos (Avendaño, López, & Palou, 2013, p. 91). Esto permite la formación de un endospermo artificial adicionando nutrientes esenciales y reguladores de crecimiento, los cuales aumentarán la capacidad de supervivencia de la semilla tradicional para su almacenamiento, así como la competencia de germinación de estas semillas.

Respecto a este último punto, muchas investigaciones aplicadas a la producción de semillas sintéticas están propuestas para determinar las concentraciones óptimas de alginato de sodio y cloruro de calcio para una determinada especie vegetal; entre sus resultados se ha destacado la estructuración de una matriz consistente cuando las concentraciones de alginato de sodio no superaban el 4%. Lee et al. (2009) lograron obtener semillas artificiales a partir de embriones somáticos de *Laelia anceps ssp. dawsonii*, los cuales fueron encapsulados en una matriz de alginato de sodio y cloruro de calcio, en concentraciones diferentes de alginato (2%, 3% y 4%), con el fin de determinar las concentraciones óptimas para la producción de semillas y así establecer una estrategia de rescate y conservación para esta especie a partir de semillas artificiales. En su investigación obtuvieron una germinación del 100% cuando las semillas se encapsularon con 3% de alginato de sodio en complejo con  $\text{CaCl}_2$  a 75 mM; mientras tanto, a la concentración de alginato de 4%, los porcentajes de germinación descendieron a 41,6%; resultados que pueden variar entre distintas especies de orquídeas. Así lo demostraron Pradhan et al. (2014), donde obtuvieron una alta producción de semillas artificiales de *Cymbidium aloifolium* al encapsular protocormos con alginato de sodio al 4% y una solución de cloruro de calcio a 0,2 mol/L luego de cuatro semanas de almacenamiento, logrando una germinación del 97,5%. Estos resultados demuestran la adaptabilidad de la técnica de semillas artificiales a diferentes tipos de explantes (embriones y protocormos). Resultados similares fueron evidenciados por Morales (2012), que obtuvo semillas artificiales usando brotes anteriormente propagados de *Bletia purpurea*, y evaluó los efectos de distintas concentraciones de alginato de sodio combinado con cloruro de calcio; como resultado se encuentra que el alginato de sodio al 4% con cloruro de calcio en 50 mM es la concentración óptima para la formación de semillas sintéticas para dicha especie de orquídea.

## CONSERVACIÓN IN VITRO DE ORQUÍDEAS

Con el paso de los años y el aumento en la necesidad de salvaguardar la biodiversidad del planeta, se han desarrollado técnicas que permiten el almacenamiento de distintas variedades vegetales en un espacio considerablemente pequeño y en condiciones favorables que evitan su pérdida. Para el caso de las orquídeas, las técnicas de conservación *in vitro* representan un método viable para su preservación, principalmente debido al problema de viabilidad y germinación existente en las semillas de esta familia, que, a causa de falta de sustancias de reserva, necesitan de la relación simbiótica con micorrizas para la absorción de estos nutrimentos; por ende, si estos hongos no forman parte del ecosistema microbial del suelo, muy difícilmente se obtendrán semillas germinadas (Apolo, 2021). En el caso de la conservación *in vitro*, estos nutrimentos pueden ser aplicados en formas asimilables por la semilla en los medios de cultivo. Asimismo, Santos (2020) explica que, aunque los bancos de semillas son utilizados como una alternativa para la conservación de germoplasma vegetal, no todas las especies son aptas para este método, ya que algunas especies no producen semillas en suficiente cantidad, o bien, no todas las semillas son viables para soportar las condiciones de almacenamiento. Este es el caso de las orquídeas, donde las técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos

vegetales (ctv) y sus derivados se convierten en una herramienta invaluable para la conservación de este tipo de plantas (Yücesan, 2019).

El almacenamiento de las semillas y tejidos vegetales se clasifica según su duración en “conservación a largo plazo” y “conservación a corto plazo”, y dentro de esta clasificación existen numerosas técnicas que se emplean con el fin de conservar una variedad específica (Engelmann, 1991). Estas técnicas son empleadas dependiendo del explante a utilizar, debido a que estas semillas y tejidos no están exentos de diversos problemas fisiológicos provenientes del mismo mecanismo de conservación. Para el caso de las semillas, existen variedades que pueden soportar un bajo contenido de humedad y almacenamientos a temperaturas extremadamente bajas; sin embargo, existen otras variedades que no soportan estos mecanismos y su longevidad es puesta en riesgo, por lo que es necesario el uso de otro tipo de material vegetal, como es el caso de los embriones somáticos o de los protocormos. En consecuencia, es indispensable el uso de nuevas técnicas que permitan la correcta conservación de los explantes de estas especies en diferentes periodos (Kocak et al., 2019).

En la actualidad, los métodos tradicionales de conservación de semillas representan una gran oportunidad para preservar distintos géneros de orquídeas, pues estas son reconocidas por producir enormes cantidades de pequeñas semillas que hacen posible la conservación de grandes cantidades en volúmenes de almacenamiento pequeños (Ekinci, 2019). Estos métodos implican la disminución de diferentes factores del medio de almacenamiento, como pueden ser la temperatura, la intensidad lumínica o las concentraciones de nutrientes en el medio. Estas condiciones de cultivo son utilizadas para almacenamientos en periodos cortos (Engelmann, 1991), pues se disminuye naturalmente la velocidad de crecimiento y maduración de la semilla. Algunas especies son almacenadas en temperaturas no inferiores a 0 °C, lo que permite disminuir la maduración de la semilla y almacenarla en periodos de 6 a 8 semanas hasta la formación de protocormos. Asimismo, Vendrame (2018) explica que la disminución de la temperatura debe ir acompañada de una reducción de la humedad que evite posibles contaminaciones en casos donde las temperaturas no sean muy bajas; y de la formación de cristales cuando estas sean cercanas a 0 °C. Lo anterior puede garantizar la estabilidad genética y los porcentajes de viabilidad de las semillas a corto plazo, los cuales aumentan cuando son sometidas al secado (Seaton et al., 2013).

Sin embargo, si bien la tolerancia al secado en las semillas obtiene buenos resultados, los datos acerca de la supervivencia de las semillas de orquídeas con el paso de los años son escasos; esto se debe a que los métodos tradicionales de conservación no son recomendables para almacenamientos a largo plazo, ya que la viabilidad y la variabilidad genética de las semillas se puede ver afectada (Merritt, 2014). Por lo tanto, es necesario implementar condiciones de almacenamiento adecuadas y periodos cortos con el fin de mantener la viabilidad de las semillas durante su conservación (Ikhlaq et al., 2010; Sharma et al., 2013; Tabassum et al., 2010).

Estos métodos de conservación son utilizados en diversos laboratorios de investigación y docencia, donde tienen lugar resultados variables, pues aún si el protocolo realizado es correcto, este material no se encuentra exento a su manipulación en las semanas de almacenamiento (Hung & Dung, 2015; Sharma et al., 2013; Banerjee et al., 2012). Este problema es resuelto con la aplicación de una matriz de alginato que confiera mayor protección externa a la semilla; de esta manera, el diseño de un protocolo de conservación que incluya la encapsulación de las semillas adquiere gran relevancia (Saxena et al., 2019).

En plantas ornamentales y orquídeas, la técnica de semillas sintéticas ha obtenido mucha importancia debido a la presencia de un endospermo nutricional en las semillas. Los explantes más empleados para la preparación de semillas artificiales son los embriones cigóticos, los protocormos y los cuerpos similares a protocormos (PLBs). Distintos autores han reportado resultados favorables en técnicas de encapsulación para dichos explantes. Khor et al. (1998) lograron desarrollar un sistema de doble-capa para formar encapsulados de semillas y protocormos de *Spathoglottis plicata*, donde dichas semillas soportaron el tratamiento de encapsulación con una alta tasa de viabilidad del 64% y 40%, respectivamente. Asimismo, Datta et al. (1999) produjeron exitosamente semillas sintéticas de *Geodorum densiflorum* utilizando PLBs. Los protocormos fueron encapsulados durante 30 días en alginato de sodio. Como resultado, las semillas

artificiales almacenadas a 4 °C durante 120 días no presentaron reducción en su viabilidad. Por su parte, los protocormos no encapsulados no mostraron viabilidad luego de 30 días a 4 °C. Estos resultados demuestran la importancia y funcionamiento que posee el mecanismo de encapsulación, que permite a las semillas mantenerse viables luego de un corto periodo de almacenamiento.

Más adelante Verma y Pathak (2021) estudiaron la influencia de diferentes temperaturas para la conservación de orquídeas a partir de técnicas de encapsulación. En su investigación prepararon dos lotes de semillas artificiales de *Cymbidium aloifolium* a partir de embriones somáticos de plantas madre, y fueron almacenados a distintas temperaturas: 4 oC y 25 oC, respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que las semillas almacenadas a 4 oC conservaron su viabilidad al 60% después de los 15 días, y se redujo gradualmente al 45% después de 30 días, al 25% después de 45 días y del 15% a los 60 días, mientras que las semillas almacenadas a 25 oC perdieron completamente su viabilidad al llegar a los 45 días. Los autores explican esta pérdida debido a que las semillas sintéticas se secan rápidamente y son difíciles de almacenar durante largos periodos a menos que se mantengan en un entorno húmedo o se recubran con una membrana hidrofóbica, la cual se puede conseguir usando materiales como la cera, la resina o el poliorganosilicato (Verma y Pathak, 2021).

Aun así, existen técnicas que permiten extender aún más los tiempos de almacenamiento y lograr conservaciones durante largos periodos. La criopreservación es el almacenamiento de tejidos vegetales a temperaturas extremadamente bajas durante un periodo superior a 12 meses. Las estructuras vegetales comúnmente utilizadas son meristemas, protocormos y semillas (embriones cigóticos) y embriones somáticos, ya que estos garantizan la estabilidad genética del material (Martínez, 2001). Su fundamento se basa en el uso del nitrógeno líquido, el cual se encuentra a una temperatura de -196 oC (Sánchez y Jiménez, 2010) que detiene los procesos metabólicos y la división celular, de manera que el material puede ser almacenado durante un largo periodo sin alterar su fisiología. Además, el material vegetal requiere de un espacio y mantenimiento reducido, ya que, luego del almacenamiento, no es manipulado.

Sin embargo, los protocolos de criopreservación son utilizados principalmente en laboratorios especializados en la conservación de tejidos vegetales, por lo cual su uso en laboratorios de docencia e investigación es muy bajo, producto del alto costo de reactivos y del mantenimiento de los congeladores programables. Se espera que el éxito de este método de conservación produzca nuevas investigaciones cuyos resultados conlleven la disminución de costos y su uso general en laboratorios de docencia e investigación en biotecnología vegetal. Debido a esto, el uso de la técnica de encapsulación de embriones posee gran potencial dada la sinergia que ha presentado con otras técnicas (Sánchez & Jiménez, 2010; Díaz, 2015; Bonilla et al., 2015), por cuanto la matriz de alginato posibilita el almacenamiento de las sustancias crioprotectoras y cumple la misma función que en la encapsulación tradicional, ya que las cápsulas de alginato ayudan a que la toxicidad de las sustancias crioprotectoras disminuya significativamente (Díaz, 2015). Gracias a esto, los protocolos de criopreservación y semillas sintéticas son métodos criobioteconológicos muy considerables para almacenamiento y conservación a largo y mediano plazo.

Esta sinergia es comprobada por Manokari et al. (2020), que realizan un almacenamiento a mediano plazo de semillas artificiales de *Vanda tessellata* (Roxb), una orquídea de importancia medicinal. En su estudio almacenaron un lote de embriones somáticos encapsulados con alginato de sodio y cloruro de calcio a una temperatura de -4 oC durante 12 meses en oscuridad. Como resultado, obtuvieron una germinación de 94 + 0,30% de en medio ms luego de incubarlas durante 8 semanas a 25 + 4 oC. Esta alta tasa de germinación fue explicada a través de la influencia de la fuente de nitrógeno en el medio, ya que el nitrato de amonio presente en el medio provoca una fácil asimilación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, lo que influye en el crecimiento y desarrollo morfológico (Manokari et al., 2020, p. 173). Tal fenómeno puede interferir en que la técnica de semillas sintéticas puede aplicarse en conservaciones a mediano y largo plazo si se cuenta con el equipo y material necesario para su almacenamiento, por lo que puede ser utilizado en sinergia con técnicas como la criopreservación.

Con esta prospección, se lograrían avances significativos dentro de la tecnología de las semillas artificiales, promoviendo la propagación masiva y la conservación de genotipos vegetales de élites (Reddy et al., 2012). Según Redenbaugh y Ruzin (1989), la encapsulación de embriones o protocormos debe proporcionar un método con potencial conservativo, que permita combinar las ventajas de gran volumen del cultivo de tejidos vegetales (CTV) con las capacidades de bajo costo de la conservación de semillas para ser considerado un método viable para la conservación y propagación de especies vegetales. De esta manera, los altos costes de técnicas como la propagación clonal y la crioconservación podrían reducirse al de las semillas verdaderas (Redenbaugh y Ruzin, 1989), proporcionando nuevos métodos de producción para los silvicultores, y de conservación para los laboratorios.

TABLA 1.  
Tabla 1. Comparación de métodos de conservación de semillas

Espece de planta	Explante	Concentración óptima de AS	Concentración óptima de CaCl <sub>2</sub>	Tasa de germinación	Referencia
<i>Cymbidium</i>	PLBs	3-4 %	100 mM	100 %	D1a Silva (2012)
<i>Aranda x Vanda</i>	PLBs	3 %	75 mM	96,4 %	Gantait et al. (2012)
<i>Cymbidium aloi-folium</i>	Protocormos	4 %	100mM	97,5 %	Pradhan et al. (2014)
<i>Cymbidium aloi-folium</i>	Embriones somáticos	3 %	100 mM	90 %	Verma y Pathak (2021)
<i>Flickingeria nodosa (Dalz.)</i>	Protocormos	2% - 4 %	100 mM	95 %	Nagananda, Sathishchandra, y Rajath (2011)
<i>Vanda tessellata</i>	Embriones somáticos	2 %	100 mM	94,0 %	Manokari et al. (2020)
<i>Erythrina Variegata</i>	Segmentos nodales	3 %	100 mM	93 %	Javed et al. (2017)
<i>Dendrobium Nobile</i>	Protocormos	3 %	100 mM	78.2 %	Mohanty et al. (2013)
<i>Spathoglottis Plicata</i>	Protocormos	1,5 %	3 % Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	93,3 %	Haque y Ghosh (2017)

Nota. \* La técnica de semilla artificial es utilizada para almacenamientos no mayores a 6 meses; sin embargo, su uso combinado con la crioconservación permite almacenarlas a plazos mayores a este límite. \*\*La temperatura utilizada depende de la naturaleza del cultivo; si las semillas pertenecen a cima tropical, esta temperatura puede cambiar entre 4 °C y 18 oC.

## APLICABILIDAD DE LA TÉCNICA

El éxito oportuno de esta técnica a partir de la encapsulación de embriones somáticos y protocormos derivados del cultivo de tejidos vegetales (CTV) ha propuesto nuevas metas y líneas de investigación sobre la producción de semillas sintéticas, dando una nueva prospección a la biotecnología vegetal. En investigaciones recientes, la técnica ha ganado una amplia aplicabilidad como herramienta en almacenamientos a cortos y medianos periodos, facilitando así la germinación de plántulas y el intercambio entre laboratorios (Maqsood et al., 2021).

Después de 30 años de investigación en la técnica de semillas artificiales, esta tecnología sigue en desarrollo, obteniendo buenos resultados en pruebas a pequeña escala; sin embargo, su implementación en procesos comerciales sigue siendo un concepto. La comercialización de un sistema de encapsulación requiere de un conocimiento aún mayor acerca de los mecanismos y conceptos básicos que envuelven a las semillas sintéticas (Pond & Cameron, 2017). Dentro de los inconvenientes presentes en la técnica, se encuentran la falta de resistencia a la desecación para un almacenamiento a largo plazo (Reddy et al., 2012), el cual puede ser resuelto con el uso en sinergia de técnicas de criopreservación, aumentando el costo de producción pero garantizando la calidad de la conservación y del producto final (Díaz, 2015; Bonilla et al., 2015). Asimismo, para el caso de semillas sin endospermo, es necesaria la incorporación de una fuente de azúcar para la germinación para así evitar una disminución en los porcentajes de conversión.

Se espera que los avances en la técnica y la investigación continua permitan el desarrollo de un sistema de producción de semillas sintéticas rentable que sincronice la siembra y germinación de un gran número de protocormos encapsulados que muestren un alto grado de conversión. Para ser considerada útil, la técnica de semillas artificiales debe reducir los costes de producción o aumentar el valor del cultivo (Saiprasad, 2001). Este tipo de beneficios debe ser relacionado con los costes de desarrollo, y el resultado de dicha revisión determinará si su uso se encuentra justificado para una determinada especie. Para el caso de las orquídeas, considerando los demás tipos de conservación de germoplasma actuales, existen técnicas para realizar conservaciones con un coste más reducido, como lo es el cultivo *in vitro*; no obstante, estas técnicas son conocidas por necesitar un mantenimiento constante y cuyos almacenamientos son limitados por el tiempo (Sharma et al., 2013). Otro punto central planteado por Sharma et al. (2013) dentro del mecanismo de encapsulación es la posibilidad de trasplantar los protocormos encapsulados y cultivados asépticamente, de modo directo al suelo, reduciendo considerablemente los costos en las fases de aclimatación y enraizamiento, logrando un funcionamiento análogo en comparación a las semillas naturales.

Esta conversión *ex vitro* de semillas sintéticas ha sido comprobada por Corrie y Tandon (1993), donde utilizaron protocormos de *Cymbidium giganteum* para la producción de semillas artificiales, e indujeron plántulas sanas al transferirlas a un medio nutritivo o de manera directa a arena y suelo estériles. Como resultado obtuvieron una conversión de 100% en condiciones *in vitro* y de 88% en condiciones *in vivo*. La siembra *ex vitro* de semillas sintéticas proporciona un mecanismo importante y rentable para la recuperación de plántulas (Sharma et al., 2013), ya que, si bien se puede producir un gran número de plantas a través de embriogénesis somática, esta no conservaría la diversidad genética de la familia *orchidaceae*; además, en algunos casos, el transporte de estas plántulas es complejo. Por su parte, los protocormos encapsulados presentan mayor flexibilidad de manipulación y transporte en comparación con las plantas *in vitro* (Maqsood et al., 2021). Igualmente, la siembra directa de los protocormos encapsulados en el suelo u otros sustratos ayuda a evitar el procedimiento de aclimatación necesario para las plántulas obtenidas del cultivo de tejidos vegetales, y se disminuyen los costos de mantenimiento y mano de obra.

La reducción de mano de obra conseguida al producir plantas por semillas artificiales, en comparación con el cultivo de tejidos vegetales, confiere una ventaja en los costos de la técnica (Gray, 1991). Asimismo, la posibilidad de encapsular embriones cigóticos y protocormos permite el almacenamiento de germoplasma silvestre, como resultado de una mejor manipulación de estos embriones y almacenarlos en condiciones *in vitro*. De este modo, las semillas sintéticas pueden utilizarse para propagar y conservar ciertos cultivos ornamentales como las orquídeas, que ahora se producen laboriosamente por cultivo de tejidos vegetales.

## PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS SINTÉTICAS

El método utilizado comúnmente para la germinación de semillas es la propagación *in vitro*, en la cual las semillas se cultivan en condiciones favorables en medios de cultivo como el MS (Murashige-Skoog), con fuentes de carbono. Sin embargo, este método es usado cuando la propagación es efectuada a pequeña escala,

ya que requiere de mucha mano de obra y su tasa de multiplicación es relativamente baja (Siew et al., 2014). A raíz de lo anterior, con el paso de los años se ha implementado la técnica de semillas artificiales para plantas que tienen una baja tasa de germinación y viabilidad en semillas, debido a que esta tecnología permite la inclusión directa de las semillas producidas a condiciones de invernadero, lo cual proporciona un fácil manejo, una capacidad de almacenamiento con mayor uniformidad genética y una disminución considerable de los costos (Gray, 1991).

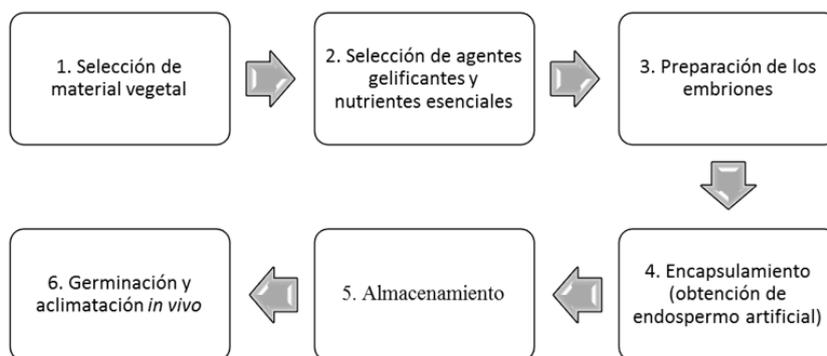


FIGURA 2.

Figura 2. Metodología propuesta para la conservación de orquídeas

Fuente: elaboración propia.

## Selección de material vegetal

En esta etapa se obtiene el material vegetal que será utilizado para la ejecución de la técnica. Una selección correcta del mejor material disponible para su encapsulación y posterior conservación es un factor importante para garantizar el éxito de la técnica. En esta etapa es posible usar diferentes explantes como de embriones somáticos, protocormos, yemas y propágulos (Shajahan et al., 2019); sin embargo, para garantizar la conservación de diversidad genética, los explantes que deberán considerarse serán embriones cigóticos (semillas) y los cuerpos similares a protocormos (PLBs). De dicha selección se obtendrán los explantes que se utilizarán en el montaje del diseño.

## Selección de agentes gelificantes y nutrientes

Se ha establecido el uso del alginato de sodio y el cloruro de calcio como gelificantes para la encapsulación de los protocormos, debido a que con ellos se obtienen mejores resultados en comparación a otros agentes. Sin embargo, sí es posible elegir las fuentes de estos dos materiales que mejor se adapten a las condiciones de material vegetal y costos, ya que si bien las presentaciones genéricas comercializadas por los fabricantes para los laboratorios de tejidos vegetales es la más usada, es posible emplear las presentaciones de alginato de sodio y cloruro de calcio que son utilizadas en la industria de alimentos debido a la similitud de sus propiedades (Avendaño et al., 2013) y de sus resultados en esta industria (tabla 2). Esto representaría una disminución aceptable en los costos de la técnica sin afectar el posible resultado final. En esta etapa también es esencial tener en cuenta la cantidad y tipo de material vegetal que se utilizará como factor clave para la elección de los nutrientes esenciales, ya que estos son muy variables entre distintas especies y su éxito depende de su correcto uso en términos de concentración de sales, disponibilidad en el medio de cultivo, tiempo de almacenamiento y/o conservación de semillas (Soni y Sharma, 2017).

## Preparación de semillas

A partir de esta etapa comienza el manejo práctico de la técnica propuesta. Las semillas seleccionadas deben estar en las mejores condiciones fisiológicas y asépticas para garantizar el éxito del procedimiento. Para el proceso de desinfección y siembra de las semillas, estas deben ser tratadas con el método de jeringa propuesto por Salazar y Botello (2020), con modificaciones en caso de ser necesario. Para este proceso se usa una jeringa estéril de 5 mL, la cual debe estar aislada en su punta con un filtro de tela; a esta jeringa se le agrega una pequeña cantidad de los embriones utilizados y se sumergen en etanol al 70 %, se repite este proceso con una solución de hipoclorito de sodio al 1.0 % (NaOCl), realizando los correspondientes lavados. Luego de llevar a cabo este procedimiento, se retira el filtro de tela de la jeringa y se procede a hacer la siembra en las cajas de petri con su respectivo medio de cultivo, donde se espera que las semillas maduren y formen protocormos para su posterior encapsulación. Todo este procedimiento debe efectuarse en condiciones asépticas en cabina de flujo laminar con materiales e instrumentos previamente esterilizados.

Con este proceso se busca la eliminación de cualquier agente contaminante presente en los explantes y que estos se encuentren en condiciones óptimas para su encapsulación.

## Obtención de la cápsula y endospermo artificial (encapsulación)

Una encapsulación óptima es fundamental para la producción de las semillas sintéticas. Estas semillas deben presentar una buena consistencia que permita su manipulación y su posterior almacenamiento sin sufrir ningún tipo de desgaste o problema mecánico; igualmente, esta matriz debe derivar en la obtención de nutrientes por parte de la semilla natural (Sharma y Roy, 2020). Para cumplir con este objetivo, se deben evaluar distintas concentraciones de los reactivos utilizados para la obtención de la matriz, por lo que es muy importante realizar una extensa revisión de antecedentes acerca de la aplicación de la técnica de semillas artificiales; en este caso, se toman como base los reportes realizados por Calderón (2020), Faisal y Alatar (2019), Pradhan et al. (2014) y Lee et al. (2009), donde se aplican distintos tratamientos con concentraciones variables de alginato de sodio (3.0%-5.0%) y cloruro de calcio (25-100mM). Así también, debe ser complementado con sales ms y su constitución dependerá exclusivamente de la especie y tipo de material usado para la encapsulación (Tabla 2).

TABLA 2.

Tabla 2. Aplicación de la técnica de semillas artificiales en distintas especies de orquídeas

Espece de planta	Explante	Concentración óptima de AS	Concentración óptima de CaCl <sub>2</sub>	Tasa de geminación	Referencia
<i>Cymbidium</i>	PLBs	3-4 %	100 mM	100 %	D1a Silva (2012)
<i>Aranda x Vanda</i>	PLBs	3 %	75 mM	96,4 %	Gantait <i>et al.</i> (2012)
<i>Cymbidium aloifolium</i>	Protocormos	4 %	100mM	97,5 %	Pradhan <i>et al.</i> (2014)
<i>Cymbidium aloifolium</i>	Embriones somáticos	3 %	100 mM	90 %	Verma y Pathak (2021)
<i>Flickingeria nodosa (Dalz.)</i>	Protocormos	2% - 4 %	100 mM	95 %	Nagananda, Sathishchandra, y Rajath (2011)
<i>Vanda tessellata</i>	Embriones somáticos	2 %	100 mM	94,0 %	Manokari <i>et al.</i> (2020)
<i>Erythrina Variegata</i>	Segmentos nodales	3 %	100 mM	93 %	Javed <i>et al.</i> (2017)
<i>Dendrobium Nobile</i>	Protocormos	3 %	100 mM	78.2 %	Mohanty <i>et al.</i> (2013)
<i>Spathoglottis Plicata</i>	Protocormos	1,5 %	3 % Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	93,3 %	Haque y Ghosh (2017)

Nota. AS: alginato de sodio; CaCl<sub>2</sub>: cloruro de calcio; Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: nitrato de calcio.

El proceso de encapsulación comienza con la recolección de las semillas previamente sembradas en cajas de petri, las cuales han madurado hasta la formación de protocormos; estos últimos son transferidos en condiciones asépticas (cabina de flujo laminar) a la solución de alginato de sodio suplementado con sales ms; luego, con ayuda de una micropipeta 50-500 µl, son transferidas nuevamente a un matraz de 500 ml que contiene una solución de cloruro de calcio suplementado de la misma manera con sales ms, con el fin de lograr la incorporación de estos nutrientes a la cápsula. Es recomendable el uso de cultivos líquidos, ya que facilita la incorporación de nutrientes o reguladores del crecimiento en la semilla. Además, el cultivo en líquido proporciona una mayor eficiencia en la producción (Tissa, 1992); los PLBs son goteados de modo individual y se dejan aproximadamente 30 min en el matraz con agitación para permitir que la cápsula se forme alrededor del protocormo (Lee *et al.*, 2009). Luego de este tiempo, las cápsulas obtenidas deben ser lavadas con agua destilada estéril para eliminar los restos de cloruro de calcio, y transferidas a papel filtro estéril, donde serán secadas dentro de la cabina de flujo laminar para posteriormente almacenarse en condiciones óptimas dentro del cuarto de conservación.

De este proceso se espera obtener semillas artificiales de aproximadamente 5 mm de diámetro (Quito y Yunga, 2019), y a partir de las distintas concentraciones evaluadas de los gelificantes, un endospermo artificial rígido que protegerá a las semillas y que además captar los nutrientes esenciales para estas.

## Almacenamiento

Las semillas sintéticas se deben guardar en recipientes de vidrio sellados y estériles en un rango de temperatura establecido previamente, de acuerdo con las condiciones naturales de las semillas, pues la temperatura de almacenamiento óptima para la conservación a corto o mediano plazo varía según la especie de planta. Este rango debe abarcar entre 4 y 18 °C (con modificaciones según la especie), como describen Baskaran et al. (2014), ya que temperaturas superiores pueden activar el metabolismo energético de la planta y, en consecuencia, su maduración y germinación, evitando así su conservación. Por su parte, Manokari et al. (2020) plantean que los almacenamientos a temperaturas menores a 0 °C son posibles si se determinan condiciones favorables para las semillas, como pueden ser bajos niveles de luminosidad, poca manipulación y el uso de medios de cultivo con altas fuentes de nitrógeno, logrando así almacenamientos de 48 semanas. El tiempo de almacenamiento es variable según los objetivos de cada investigación; sin embargo, se recomienda el almacenamiento durante 12, 16, 20 y 24 semanas en cuarto oscuro, pues permitirá evaluar la capacidad de las semillas artificiales en conservaciones a mediano plazo, para luego dar paso a conservaciones más largas. Asimismo, Salma et al. (2019) establecen la importancia de que el medio de cultivo en el cual se almacenen las semillas sintéticas posea una menor concentración de sales con el fin de disminuir y ralentizar de manera efectiva el metabolismo de la semilla.

## Germinación y aclimatación in vivo

El endospermo artificial tiene un gran efecto sobre la germinación de las semillas sintéticas. En diferentes investigaciones se ha reportado un aumento en los porcentajes de germinación de semillas encapsuladas artificialmente, en comparación con las semillas naturales utilizadas como control (Javed et al., 2017). Las plántulas obtenidas a través de semillas artificiales son conocidas por su capacidad de cultivo en diferentes sustratos para su conversión en plantas completas en invernadero o directamente en campo (Qahtan et al., 2019). Estas semillas deben ser plantadas en sustratos que posean concentraciones de nutrientes superiores a las establecidas en su conservación, con el fin de reestablecer su metabolismo natural (Bektas y Sökmen, 2016). Después de realizar la metodología en laboratorio, las plántulas deben ser transferidas a bolsas que contengan suelo estéril y se mantienen bajo condiciones de invernadero durante seis semanas, periodo en el que aparecen las primeras hojas eficientes (Lee et al., 2009) y deben ser monitoreadas semanalmente, con el fin de seguir su proceso de desarrollo y maduración hasta la obtención de plántulas completas.

Esta siembra directa disminuye considerablemente los costos necesarios en otras técnicas de cultivo, pues parte de estos se deben a la mano de obra aplicada para los múltiples pasos de cultivo y enraizamiento, de manera que la sustitución de dichos sistemas de cultivo por la siembra directa de los protocormos encapsulados reducirían ciertos gastos (Tripathi, 2017).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al igual que todas las técnicas de micropropagación, la encapsulación con alginato es un proceso muy laborioso. Cada explante se manipula varias veces: en la selección de material, la desinfección, el recubrimiento con alginato de sodio, la inmersión en cloruro de calcio, el lavado en agua y, finalmente, su disposición en un recipiente para su almacenamiento. Sin embargo, los resultados obtenidos en las investigaciones reseñadas han corroborado la importancia de su uso en la conservación de germoplasma vegetal de orquídeas: se resaltan las ventajas que posee en términos de costos y tiempos de conservación con respecto a los métodos tradicionales de conservación *in vitro* y a métodos más sofisticados como la criopreservación, mostrando incluso cómo la técnica de semillas artificiales se logra adaptar y trabajar

en sinergia con este último método, hasta alcanzar resultados óptimos y eficaces para la conservación de embriones. El coste total de la aplicación de la tecnología de semillas sintéticas será variable para cada cultivo, y este será el resultado entre la relación de los costes de desarrollo y de la producción total de semillas, de manera que, entre mayor nivel de investigación en el uso sofisticado de la técnica, mayor será la rentabilidad de esta. De este modo, es necesario generar más investigación en semillas artificiales, con el fin de mejorar las capacidades que poseen estas semillas en sustratos no esterilizados, además de proponer el uso de distintos agentes, como antibióticos, que podrían mejorar las condiciones de calidad y resistencia de las semillas, y evaluar las concentraciones óptimas de sustrato y agentes gelificantes para cada especie de orquídea.

Los protocolos de encapsulación disponibles se encuentran optimizados para laboratorios de alto nivel que tengan como objetivo la conservación del germoplasma vegetal; sin embargo, es importante que distintos laboratorios de investigación adopten esta práctica con el fin de ampliar las investigaciones y recursos en el tema, a fin de generar un mayor desarrollo de la técnica y un impacto significativo en la conservación de tejidos vegetales. Por esto, se espera que los resultados obtenidos en investigaciones planteadas en esta revisión permitan continuar la investigación sobre la encapsulación de embriones en otros laboratorios de cultivo de tejidos vegetales (CTV) de la región y el país.

## REFERENCIAS

- Apolo Moreno, K. (2021). Evaluación de procedimientos en la conservación y germinación in vitro de semillas de la orquídea *Epidendrum nocturnum* (Jacq). Guayaquil: Universidad Agraria del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrarias.
- Arditti, J. (1982). Introduction, North American terrestrial orchids. En *Orchid biology. II. Reviews and perspectives. Orchid seed germination and seedling culture – a manual* (pp. 245-293). Nueva York: Cornell University Press.
- Arditti, J., y Ghani, A. K. A. (2000). Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *The New Phytologist*, 145(3), 367-421. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x>
- Avendaño-Romero, G., López-Malo, A., y Paolu, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 87-96.
- Banerjee S., Singh S., Pandey H., Pandey P., y Rahman, L. U. (2012). Conservation and storage of *Curcuma amada* Roxb. synseeds on Luffa sponge matrix and rapid analysis of the converted plantlets. *Industrial Crops and Products*, 36, 383-388. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.10.031>
- Baskaran, P., Kumari, A., y Van Staden, J. (2014). Embryogenesis and synthetic seed production in *Mondia whitei*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (pctoc)*, 121(1), 205-214. doi:10.1007/s11240-014-0695-x
- Bekheet, S. A. (2017). Encapsulation of date palm somatic embryos: Synthetic seeds. En J. Al-Khayri et al. (Eds.), *Date Palm Biotechnology Protocols Volume II. Methods in Molecular Biology*, vol 1638. New York: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7159-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7159-6_7)
- Bektaş, E., y Sökmen, A. (2016). In vitro seed germination, plantlet growth, tuberization, and synthetic seed production of *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq. *Turkish Journal of Botany*, 40, 584-594. <https://doi.org/10.3906/bot-1512-13>
- Bhattacharyya, P., Kumar, V., y Van Staden, J. (2018). In vitro encapsulation based short term storage and assessment of genetic homogeneity in regenerated *Ansellia africana* (Leopard orchid) using gene targeted molecular markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (pctoc)*, 133(2), 299-310. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1382-0>
- Bonilla, M., Mancipe, C., y Aguirre, A. (2015). Conservación in vitro: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1). <https://doi.org/10.22490/21456453.1264>
- Calderón Gómez, B. (2020). Encapsulamiento in vitro de yemas auxiliares de *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken (laurel) como alternativa de manejo, provincia de los Ríos. *Quevedo. UTEQ* 54 p.

- Calderón-Sáenz E. (2006). Libro Rojo de Plantas de Colombia [vol. 3: Orquídeas, primera parte; Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia]. Bogotá: Instituto Alexander von Humboldt - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.
- Chávez, H., Mosquera, A., y Otero, J. (2014). Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronómica*, 64(2), 125. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.42976>
- Corrie, S., y Tandon, P. (1993). Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall. through high frequency conversion of encapsulated protocorm under in vivo and in vitro conditions. *Indian Journal of Experimental Biology (ijeb)*, 31, 61-64.
- Da Silva JAT. (2012). Production of synseed for hybrid *Cymbidium* using protocorm-like bodies. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 20, 135-146. <https://doi.org/10.2478/v10290-012-0023-7>
- Díaz, L. (2015). Criopreservación de yemas axilares de patata (*Solanum tuberosum* L.) por el método de encapsulación-deshidratación. Navarra: Universidad Pública de Navarra.
- Ekinci H., Çiftçi Y. Ö., y Nadarajan J. (2019) Medium- and long-term conservation of ornamental plants using synthetic seed technology. En M. Faisal, & A. Alatar (Eds.), *Synthetic Seeds*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_11)
- Engelmann, F. (1991). In vitro conservation of tropical plant germplasm — a review. *Euphytica*, 57, 227-243. <https://doi.org/10.1007/BF00039669>
- Faisal, M., y Alatar, A. A. (Eds.). (2019). *Synthetic seeds* (1.<sup>a</sup> ed.). Springer, Cham, <https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0>.
- Fast, G. (Ed.). (1980). *Orchideenkultur: botanische Grundlagen, Kulturverfahren, Pflanzenbeschreibungen*. Ulmer.
- Gantait, S., Bustam, S., y Sinniah, U. R. (2012). Alginate-encapsulation, short-term storage and plant regeneration from protocorm-like bodies of *Aranda Wan Chark Kuan* 'Blue' × *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. (Orchidaceae). *The Journal of Plant Growth Regulation*, 67, 257-270. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9684-4>
- Gantait, S., y Mitra, M. (2019). Applications of synthetic seed technology for propagation, storage, and conservation of orchid germplasms. En M. Faisal, & A. Alatar (Eds.), *Synthetic Seeds*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_13)
- Gray, D. J., Purohit, A., y Trigiano, R. N. (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(1), 33-61. <https://doi.org/10.1080/07352689109382306>
- Haque, S. M., y Ghosh, B. (2017). Regeneration of cytologically stable plants through dedifferentiation, redifferentiation, and artificial seeds in *Spathoglottis plicata* Blume. (Orchidaceae). *Horticultural Plant Journal*, 3, 199-208. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.10.002>
- Hung, C. D., y Dung, C. D. (2015). Production of chrysanthemum synthetic seeds under non-aseptic conditions for direct transfer to commercial greenhouses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (pctoc)*, 122(3), 639-648. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0797-0>
- Hung, C. D., y Trueman, S. J. (2011). Encapsulation technology for short-term preservation and germplasm distribution of the African mahogany *Khaya senegalensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (pctoc)*, 107, 397-405. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9990-y>
- Ikhlaq, M., Hafiz, I. A., Micheli, M., Ahmad, T., Abbasi, N. A., y Standardi, A. (2010). In vitro storage of synthetic seeds: effect of different storage conditions and intervals on their conversion ability. *African Journal of Biotechnology*, 9, 5712-5721.
- Iqbal, M., Ali, A., Rashid, H., Raja, N., Huma, N., Naveed, Z., Mashwani, Z., Hussain, M., Ejaz, M., y Chaudhry, Z. (2019). Evaluation of sodium alginate and calcium chloride on development of synthetic seeds. *Pakistan Journal of Botany*, 51(5), 1569-1574. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2019-5\(36\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2019-5(36))
- Jain, P., Danwra, K., Sharma, H. P. y Mahato, D. (2018). In vitro tissue culture studies and synthetic seed formation from *Plumbago zeylanica* L. *Indian Journal of Experimental Biology*, 56, 769-773.

- Javed, S. B., Alatar, A. A., Anis, M. y Faisal, M. (2017). Synthetic seeds production and germination studies, for short term storage and long-distance transport of *Erythrina variegata* L.: A multipurpose tree legume. *Industrial Crops and Products*, 105, 41-46. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.053>
- Kaur, R., Sharma, S y Kaur, S. (2019). *Synthetic Seeds: Imminent Technology for Plant Propagation*. Nueva Delhi: Akinik Publications.
- Khan, Md. Imran, N. A., Mohammad A., Abdulrahman A. A. y Mohammad F. (2018). In vitro conservation strategies for the Indian willow (*Salix tetrasperma* Roxb.), a vulnerable tree species via propagation through synthetic seeds. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 17-21. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.002>
- Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, 73(1), 1-25. <https://doi.org/10.1086/332956>
- Knudson, L. (1946). A nutrient for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- Kocak M., Sevindik B., Izgu T., Tutuncu M. y Mendi Y.Y. (2019) Synthetic Seed Production of Flower Bulbs. In: Faisal M., Alatar A. (eds) *Synthetic Seeds*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_12)
- Lal, N. y Singh, M. (2020). Prospects of plant tissue culture in orchid propagation: A review. *Indian Journal of Biology*, 7(2), <http://dx.doi.org/10.21088/ijb.2394.1391.7220.15>
- Lee-Espinosa, H. E., Murguía-González, J., Laguna-Cerda, A., García-Rosas, B., Gámez-Pastrana, M. R., Galindo-Tovar, M. E., Landero-Tórres, I., Iglesias-Andreu, L. y Santana-Buzzy, N. (2009). Encapsulación de embriones somáticos de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* para la producción de semilla sintética. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15, 33-40. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2009.15.047>
- Majumder, M. (2020). Orchid Diversity: Its conservation and sustainable utilization. *Research Interventions and Advancements in Plant Sciences*, p. 131-138.
- Manokari, M., Latha, R., Priyadarshini, S., Jogam, P. y Shekhawat, M. S. (2020). Short-term cold storage of encapsulated somatic embryos and retrieval of plantlets in grey orchid (*Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. ex G. Don. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 144, 171-183. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01899-y>
- Maqsood, M., Khusrau, M., Mujib, A. y Kaloo, Z. A. (2021) Synthetic seed technology in some ornamental and medicinal plants: An overview. En I. Siddique (Eds.), *Propagation and Genetic Manipulation of Plants*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7736-9\\_](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7736-9_)
- Martínez, I., M. (2001). Conservación de recursos fitogenéticos. Centro de Recursos Fitogenéticos (CRFI Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Hojas divulgadoras, Núm. 2114. [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_2001\\_2114.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_2001_2114.pdf)
- Mercado, S., Caleño, J., y Rozo, L. (2020). Improvement of the methodology of the tetrazolium test using different pretreatments in seeds of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae). *Journal of Seed Science*, 42, e202042013. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v42231028>
- Merritt, D. J., Hay, F. R., Swarts, N. D., Sommerville, K. D. y Dixon, K. W. (2014). Ex situ Conservation and Cryopreservation of Orchid Germplasm. *International Journal of Plant Sciences*, 175(1), 46-58. <https://doi.org/10.1086/673370>
- Ministerio del Ambiente (2015a). Plan para el estudio y la conservación de las orquídeas en Colombia. Bogotá: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible & Universidad Nacional de Colombia.
- Ministerio del Ambiente (2015b). Colombia, país con mayor número de especies de orquídeas en el mundo. <http://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/1772-colombia-pais-con-mayor-numero-de-especies-de-orquideas-en-el-mundo>
- Mohanty, P., Nongkling, P., Das, M. C., Kumaria, S. y Tandon, P. (2013). Short-term storage of alginate-encapsulated protocorm-like bodies of *Dendrobium nobile* Lindl.: an endangered medicinal orchid from North-east India. *Biotech*, 3(3), 235-239. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0090-4>
- Morales, J. (2012). Propagación in vitro de *Bletia purpurea* Lam para la producción de semillas sintéticas. Jalisco: Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco.

- Mudasir, M., Wani, K.P., Chatto, M.A. y Ummyiah, H.M. (2017). Synthetic Seed Technology. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 662-674. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2017.611.079>
- Nagananda, G. S., Satishchandra, N. y Rajath, S. (2011) Regeneration of encapsulated protocorm like bodies of medicinally important vulnerable orchid *Flickingeria nodosa* (Dalz.) Seidenf. *International Journal of Botany*, 7, 310-313.
- Nandini, B. y Giridhar, P. (2019). Insight view of topical trends on synthetic seeds of rare and endangered plant species and its future prospects. En M. Faisal, & A. Alatar (Eds.), *Synthetic Seeds*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_5)
- Nongdam, P. (2016). Development of Synthetic Seed Technology in Plants and its Applications: A Review. *International Journal of Current Science*, 19(4): E 86-101.
- Orejuela, J. (2010). La conservación de orquídeas en Colombia y un caso en proceso en la cuenca del río Cali, municipio de Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colombia. *El Hombre y la Máquina*, 35, 53-66.
- Pech Chable, S. (2017). Producción de semillas sintéticas mediante la encapsulación de embriones cigóticos de *Musa* (plátano). Mérida: Centro de Investigación Científica de Yucatán (cicy).
- Pérez, B., Castañeda, S. (2016). Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para la conservación ex situ. *Biotecnología Vegetal*, 16, 143-151.
- Pond, S. y Cameron, S. (2017). Artificial Seeds. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 419–427. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394807-6.00227-6>
- Pradhan, S., Tiruwa, B., Ray Subedee, B. y Pant, B. (2014). In vitro germination and propagation of a threatened medicinal orchid, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. through artificial seed. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedical*, 4(12), 971-976. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0369>
- Puspitaningtyas, D. M. y Handini, E. (2020). Ex-situ conservation of *Cymbidium finlaysonianum* by seed storage. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(8). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210813>
- Qahtan, A. A., Abdel-Salam, E. M., Alatar, A. A., Wang, Q. C. y Faisal, M. (2019). An introduction to synthetic seeds: Production, techniques, and applications. En M. Faisal, & A. Alatar (Eds.), *Synthetic Seeds*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_1)
- Quito, A. y Yunga, A. (2019). Técnica de encapsulamiento de embriones en alginato de sodio para la germinación de: *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa*, provincia Azuay. Cuenca: Universidad de Cuenca. <https://core.ac.uk/download/pdf/288578492.pdf>
- Reddy, M., Murthy, K. y Pullaiah, T. (2012). Synthetic seeds: A review in agriculture and forestry. *African Journal of Biotechnology*, 11(78), 14254-14275. <https://doi.org/10.5897/AJB12.770>
- Redenbaugh, K. y Ruzin, S. E. (1989). Artificial seed production and forestry. En *Applications of Biotechnology in Forestry and Horticulture* (pp. 57-71). Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1321-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1321-2_6)
- Rihan, H., Kareem, F., El-Mahrouk, M. y Fuller, M. (2017). Artificial Seeds (Principle, Aspects and Applications). *Agronomy*, 7(4), 71. <https://doi.org/10.3390/agronomy7040071>
- Rittirat, S. y Klačheed, S. (2018). Synthetic Seeds of Endangered Medicinal Orchid Species, *Dendrobium crumenatum* Sw. Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Thailand. Volume 6 Number 1, January 2018.
- Roura Cadena, A. (2010). Aplicación de la técnica de encapsulación-deshidratación en la criopreservación de protocormos de *Oncidium Stenotis*. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Sede Sangolquí. <https://doi.org/10.15517/lank.v1i13.18298>
- Saiprasad G. (2001). Artificial seeds and their applications. Division of Biotechnology, Indian Institute of Horticulture Science, Bangalore. *Resonance – Journal of Science Education*, May 2001; pp. 39-47. <https://doi.org/10.15517/lank.v1i13.18298>
- Salazar, S. y Vega, N. (2017). Asymbiotic seed germination and in vitro propagation of *Cattleya trianae* Linden & Reichb.f. (Orchidaceae). *Acta Agron.*, 66(4), 544-548. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n4.63597>

- Salazar, S. y Botello, E. (2020). Effect of the medium composition on the asymbiotic germination and in vitro development of the *Laeliocattleya* hybrid. *South African Journal of Botany*, 135, 80-60. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.011>
- Salazar, S., Botello, H. y Quintero, J. (2019). Efecto de pretatamientos en la prueba de tetrazolio en semillas de *Epidendrum barbaricum* Hágsater & Dodson. *Acta Agronómica*, 68(4), 306-311. <https://doi.org/10.15446/acag.v68n4.79619>
- Salazar, S. y Quintero Rojas, J. (2020a). Optimization of the tetrazolium test in three species of orchids of the Andean Forest. *Australian J. Crop Sci*, 14(5), 822-830. <https://doi.org/10.21475/ajcs.20.14.05>. p.2276
- Salazar, S. Quintero, J. y Bustos, V. (2020b). Implementación de la prueba de tetrazolio en las semillas de *Raphanus sativus* L. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 15(2), 7-15. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3831>
- Salazar, S. A., Botello, E. y Quintero, J. (2020c). Optimización de la prueba de tetrazolio para evaluar la viabilidad en semillas de *Solanum lycopersicum* L. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(3), 1-12. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol21\\_num3\\_art:1344](https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1344)
- Salma, U., Kundu, S., Ali, M. N. y Mandal, N. (2019). Somatic embryogenesis-mediated plant regeneration of *Eclipta alba* (L.) Hassk. and its conservation through synthetic seed technology. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(6). <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2898-6>
- Sánchez, N. y Jiménez, V. (2010). Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Revista Agronomía Mesoamericana*, 21(1), 193-205. Costa Rica. <https://doi.org/10.15517/am.v21i1.11836>
- Sankari, A., Priya, R. S. y Savitha, B. K. (2020). Synthetic Seed Production Technology. *Biotica Research Today*, 2(7), 573-577. <https://www.bioticainternational.com/ojs/index.php/bioretoday/article/view/288>.
- Santos, M. (2020). Impacto de la biotecnología en la conservación de especies vegetales. *Universitarios Potosinos*; agosto 2020, p. 12-17. Facultad de Ciencias Químicas, UASLP. <http://portal2014.uaslp.mx/Comunicacion-Social/Documents/Divulgacion/Revista/Diecisiete/250/250-03.pdf>
- Saxena A., Shukla M. y Saxena P. (2019) Synthetic Seeds: Relevance to Endangered Germplasm Conservation In Vitro. In: Faisal M., Alatar A. (eds) *Synthetic Seeds*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_2)
- Seaton, P., Kendon, J. P., Pritchard, H. W., Murti Puspitaningtyas, D. y Marks, T. R. (2013). Orchid conservation: the next ten years. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 13(1-2), 93-101. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443/44340043010>
- Sevindik, B., İzgü, T., Tütüncü, M. y Mendi, Y. Y. (2019). Cryopreservation and synthetic seed production in ornamental flower bulbs (geophytes). *Acta Horticulturae*, 1234, 17-28. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2019.1234.3>
- Shaafi, B., Mosavi, S., Abdollahi, M. y Sarikhani, H. (2021). The Optimized Protocols for Production, Adaptation and Keeping of the Produced Artificial Seeds from Encapsulated Lateral Buds in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Agrotechniques in Industrial Crops*, 1(1), 24-35. <https://doi.org/10.22126/etic.2021.6246.1004>
- Shajahan A., Raju C.S., Mehaboob V.M. y Aslam A. (2019) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed Technology of *Curcuma* spp. In: Faisal M., Alatar A. (eds) *Synthetic Seeds*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_17)
- Sharma, P. y Roy, B. (2020). Preparation of synthetic seeds of *Citrus jambhiri* using in vitro regenerated multiple plantlets. *Biotechnology Journal International*, 22-29. <https://doi.org/10.9734/bji/2020/v24i230099>
- Sharma S., Shahzad A. y Teixeira da Silva JA. (2013). Synseed technology—a complete synthesis. *Biotechnol Adv* 31:186–207. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.007>
- Sherif, N. A., Franklin Benjamin, J. H., Senthil Kumar, T. y Rao, M. V. (2017). Somatic embryogenesis, acclimatization and genetic homogeneity assessment of regenerated plantlets of *Anoectochilus elatus* Lindl., an endangered terrestrial jewel orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (pctoc)*, 132(2), 303-316. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1330-134>

- Siew, W. L., Kwok, M. Y., Ong, Y. M., Liew, H. P. y Yew, B. K. (2014). Effective Use of Synthetic Seed Technology in the Regeneration of Dendrobium White Fairy Orchid. *Journal of Ornamental and Horticultural Plant*, 4, 1-7. <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=372956>
- Singh P., Singh K. y Khan, H. (2013). *Agricultural-based Interventions for Sustainable Food Security & Climate Change*, Chapter – 4, Synthetic Seed: A Novel Technology. AkiNik Publications 169, C-11, Sector - 3, Rohini, Delhi-110085, India.
- Soni, V. y Sharma, P. (2017). Encapsulation of Protocorm Like Bodies and in vitro regeneration of *Asparagus racemosus* Willd. *Biotechnological Research*, 3(4), 77-79.
- Suárez Padrón, I. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Córdoba: Fondo Editorial Universidad de Córdoba.
- Sunitibala Devi, Y. y Neelashree, N. (2018). Micropropagation of the monopodial orchid, *Rhynchostylis retusa* (L.). *International Journal of Life Sciences*, 6(1), 181-186
- Tabassum B, Nasir IA, Farooq AM, Rehman Z, Latif Z, Husain T. Viability assessment of in vitro produced synthetic seeds of cucumber. *Afr J Biotechnol* 2010; 9:7026-7032.
- Tissa S. (1992). Artificial seeds. *Biotechnology Advances*, Volume 10, Issue 3, 1992, Pages 379-392 10(3). [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(92\)90301-o](https://doi.org/10.1016/0734-9750(92)90301-o)
- Tripathi, M. (2017). Synthetic seed technology and its applications: a review. *International Journal of Plant Biotechnology*, 3(1), 11-16.
- Vendrame, W. A. (2018). Cryopreservation. *Orchid propagation: From laboratories to greenhouses. Methods and Protocols*, 283-302. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_15)
- Verma, S. y Pathak, P. (2021). Effective use of synthetic seed technology in the regeneration of *Cymbidium aloifolium* using protocorm-like bodies. *Current Science*, 120(3), 570-572.
- Yücesan B. (2019) Synseed: A new trend in seed technology. En M. Faisal & A. Alatar (Eds.), *Synthetic seeds*. Springer: Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_3)