



**UNIVERSIDAD DE SANCTI SPÍRITUS**

**"JOSÉ MARTÍ PÉREZ"**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA**



**Título:** Efecto de la crioconservación sobre el fenotipo de plantas de dos especies del género *Nicotiana*

# **TRABAJO DE DIPLOMA**

**Autor:** Boris Luis Pérez Crespo

**Tutores:** Lic. Juan Luis Pérez Rodríguez  
Ing. Yariel F. Veloso Herranz

**Curso:** 2013-2014

**SANCTI SPÍRITUS**

**2014**

## **RESUMEN**

Este trabajo tiene como objetivo determinar el efecto de la crioconservación sobre el fenotipo de dos especies del género *Nicotiana*; *Nicotiana tabacum* Linnaeus cultivar Sancti Spiritus 96 (SS96) y *Nicotiana megalosiphon* Heurck & Mueller (NE43). Una muestra de semillas de cada especie se introdujo en nitrógeno líquido (NL) y la otra en una cámara de refrigeración a 5<sup>0</sup>C; en estas condiciones se conservaron por espacio de un año. Transcurrido este periodo, se sembraron en bandejas de poliestireno expandido en condiciones de cultivo protegido y a los 45 días se trasplantaron al campo. En la fase de semillero las mediciones se realizaron a los 20, 30 y 40 días después de sembradas las semillas (DDS), mientras que en la fase de campo se realizaron cuando cada especie alcanzó el 75% de floración. Para ambas especies, las plántulas obtenidas a partir de semillas crioconservadas sufrieron retardo en su crecimiento en los estadíos iniciales de su desarrollo, reflejado en los valores de los descriptores cuantitativos calculados a los 20 y 30 DDS. Sin embargo, según los valores calculados de la Tasa de crecimiento relativa (TRC), tuvieron una intensidad de crecimiento similar a las obtenidas a partir de semillas conservadas a 5<sup>0</sup>C. Existe la tendencia a que las diferencias mostradas dejen de ser significativas hacia finales de la fase de semillero y desaparecen completamente en la fase de campo.

**Palabras claves:** *Nicotiana*, crioconservación, descriptor, fenotipo

## **Abstract**

This work aims to determine the effect of cryopreservation on the phenotype two species of *Nicotiana*; *Nicotiana tabacum* Linnaeus cv Sancti Spiritus 96 (SS96) and *Nicotiana megalosiphon* Heurck & Mueller (NE43). The seeds of both species were harvested when the capsules became completely carmelitas, sieved and dried up to 8%. A sample of each species was introduced into liquid nitrogen (LN) and the other in a cooling chamber at 5<sup>0</sup>C; again and were stored for about a year. They after this period were sown in polystyrene trays under protected cultivation or tunnels and 45 days were transplanted to the field. In the seedling stage seven quantitative morphological descriptors were determined at 20, 30 and 40 days after sowing seeds (DDS), while only four qualitative descriptors were evaluated at 40DDS; at this stage three growth indices were determined. In phase field measurements and observations were made as each

species reached 75% bloom. Seedlings obtained from cryopreserved seeds for one year suffered growth retardation in the initial stages of its development. However, there is a tendency for these differences are not significant by the end of the seedling stage. In the field phase, comparing morphologically NE43 and SS96 plants derived from cryopreserved and stored seeds by the conventional method, no significant differences were observed.

**Keywords:** *Nicotiana*, cryopreservation, descriptor, phenotype

---

1. INTRODUCCIÓN .....	1
Problema científico .....	3
Objetivo.....	3
Hipótesis .....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. Origen e importancia del cultivo del tabaco .....	4
2.2. Importancia de las especies silvestres del género <i>Nicotiana</i> .....	5
2.3. Recursos fitogenéticos.....	7
2.4. Modalidades de la conservación .....	8
2.4.1. <i>Conservación in situ</i> .....	8
2.4.2. <i>Conservación ex situ</i> .....	9
2.5. Bancos de germoplasmas.....	9
2.5.1. <i>Bancos de semillas</i> .....	10
2.6. Principios de conservación de semillas.....	11
2.7. Crioconservación de semillas ortodoxas .....	12
2.8. Descriptores .....	13
2.6.1. <i>Tipos de descriptores</i> .....	13
2.6.2. <i>Descriptores morfológicos</i> .....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
3.1. Ubicación de los experimentos y especies seleccionadas .....	17
3.2. Recolección y acondicionamiento de la semilla .....	17
3.3. Determinación del contenido de humedad de las semillas.....	17
3.4. Conservación .....	17
3.5. Ensayos de germinación .....	18
3.6. Tratamiento en semillero.....	18
3.7. Trasplante y cultivo.....	19
3.8. Descriptores morfológicos.....	20
3.9. Índices de crecimiento.....	23
3.9.1. <i>Incremento de biomasa (<math>\Delta M</math>)</i> .....	23
3.9.2. <i>Tasa absoluta de crecimiento (TAC)</i> .....	23
3.9.3. <i>Tasa relativa de crecimiento (TRC)</i> .....	23
3.10. Tratamiento estadístico.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1. Efecto de la crioconservación sobre el desarrollo en fase de semillero de plántulas de dos especies del genero <i>Nicotiana</i> obtenidas a partir de semillas crioconservadas y conservas por el método convencional .....	25
4.1.1. <i>Descriptores cualitativos determinados a los 40DDS</i> .....	25
4.1.2. <i>Análisis de estadísticos simples de las variables cuantitativas calculas a los 40DDS</i> .....	25
4.1.3. <i>Comparación morfológica durante el desarrollo en fase de semillero</i> .....	28
4.1.4. <i>Comparación de los Índices de crecimiento entre los 20DDS y los 40DDS</i> .....	30
4.2. Efecto de la crioconservación sobre el desarrollo en fase de campo de plántulas de dos especies del genero <i>Nicotiana</i> obtenidas a partir de semillas crioconservadas y conservas por el método convencional .....	33

4.3. Valoración económica .....	35
5. CONCLUSIONES .....	38
6. RECOMENDACIONES.....	39
3. BIBLIOGRAFÍA.....	40

## **1. Introducción**

El aumento de la población, la industrialización y la extensión de la frontera agrícola contribuyen a la pérdida de la diversidad genética. A ello se suman la adopción de germoplasmas élites y la modificación y/o destrucción de los centros de variabilidad genética. La pérdida de recursos fitogenéticos pone en evidencia la urgente necesidad de conservarlos y usarlos de manera sostenible (Jaramillo y Baena, 2000 y Zhang *et al.*, 2008). Si las tendencias actuales continúan, y se pudieran tomar muchas acciones que mitigarían este resultado, dos de cada tres especies de plantas desaparecerían de la faz de la tierra a finales de este siglo (Guerrant *et al.*, 2004)

En tal sentido, la colección de *Nicotiana*, presente en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco, progresa constantemente con nuevas variedades y especies (Torrecilla, 2011). Conservar a largo plazo la variabilidad genética del género es de vital importancia con el fin de introducir genes de valor en las variedades comerciales (Siva Raju *et al.*, 2008) o reconstruir o reforzar las poblaciones *in situ* (Bacchetta *et al.*, 2008).

Para la conservación a largo plazo por los métodos convencionales las semillas se someten a un secado y almacenamiento adecuado (del 5 al 7 % H. R. y de – 18 a -25 °C). El almacenamiento a corto plazo se realiza en condiciones relativamente menos estrictas: + 5 °C y un control de la humedad circundante de ± 35 % según Engels *et al.* (2007)

Las condiciones de almacenamiento en el Instituto distan mucho de las normadas, las semillas se preservan a 5 °C y humedad relativa superior al 60 %. Bajo tales condiciones es imposible la conservación a largo plazo. Además, no se cuenta con protección eléctrica, por lo cual la viabilidad de la semilla está sujeta a la estabilidad en ese servicio.

Desde la década de los 80, a nivel mundial se han realizado varias investigaciones utilizando la criopreservación como alternativa a los métodos tradicionales de almacenamiento de semillas (Stanwood, 1981; González-Benito *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 2004). Las técnicas de criopreservación utilizan normalmente nitrógeno líquido (–196 °C) debido a su costo relativamente bajo. El objetivo es alcanzar temperaturas inferiores a –130 °C para lograr condiciones de baja energía cinética molecular y una difusión extremadamente lenta, de tal forma que las reacciones químicas se encuentren

prácticamente paralizadas (Pritchard, 1995); bajo estas condiciones, se postulan longevidades extremadamente largas.

En estas circunstancias se evita la necesidad de llevar a cabo controles de viabilidad, responsables de una disminución significativa del número de semillas almacenadas, y disminuyen los riesgos de deterioro genético asociados a los procesos de multiplicación. Otras ventajas de las técnicas de crioconservación son la ausencia de controles de temperatura y humedad durante el almacenamiento, la inexistencia de daños por parásitos y patógenos y, en teoría, una viabilidad indefinida (Iriondo, 2001).

Los bancos de crioconservación de semillas ortodoxas constituyen una alternativa a los bancos de semillas convencionales. Si se adiciona a las anteriores ventajas el hecho de que cada una de ellas propone una reducción de los costos (Pardey *et al.*, 2001) y un aumento considerable de la seguridad de las semillas, la crioconservación se coloca en una posición muy ventajosa si la comparamos con otros métodos de conservación (Iriondo, 2001).

Recientemente, basado en experimentos de almacenamiento llevados durante 10 años y usando la ecuación de viabilidad, Walters *et al.* (2004) pronosticaron una viabilidad de 3,400 años para semillas de lechuga conservadas a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Usando la misma ecuación de viabilidad, estos autores predijeron que la longevidad de las semillas de lechuga guardadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  sería sólo aproximadamente de 46 a 70 años, es decir, 74 veces menos que a temperaturas criogénicas. Por consiguiente, la criopreservación puede ser de gran utilidad para el almacenamiento de las colecciones bases y duplicado en los bancos de germoplasmas de semillas, sin dejar de lado las condiciones clásicas de almacenamiento, útiles para el almacenamiento a corto plazo (colección activa) (Pritchard *et al.*, 2009; Engelmann y Ramanatha Rao, 2012)

No obstante, la influencia de numerosos factores debe ser evaluada antes de utilizar la crioconservación como estrategia segura para almacenar semillas del género *Nicotiana*. (Walters *et al.*, 2004). Se ha informado recientemente el efecto de la crioconservación en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. (Cejas *et al.*, 2012) y de especies silvestres de *Solanum lycopersicum* Mill (Zevallos *et al.*, 2013) sobre parámetros bioquímicos, sobre todo en hojas y raíces, sin embargo estas alteraciones bioquímicas no se han expresado en las evaluaciones morfológicas realizadas.

**Problema científico**

¿Qué efecto tiene la crioconservación sobre el fenotipo de plantas de dos especies del género *Nicotiana*?

**Objetivo**

Determinar el efecto de la crioconservación sobre el fenotipo de plantas de dos especies del género *Nicotiana*.

**Hipótesis**

Si se realiza una comparación morfológica entre plantas de dos especies del género *Nicotiana* obtenidas a partir de semillas crioconservadas y conservadas por el método convencional entonces se puede determinar el efecto de la crioconservación sobre el fenotipo estas plantas.



## **2. Revisión Bibliográfica**

### **2.1. Origen e importancia del cultivo del tabaco**

La mayoría de las investigaciones confirman que esta planta es oriunda de América del Sur (Bolivia-Perú-Ecuador) aunque a la llegada de Colón a Cuba en 1492 se obtuvo la información del “sorprendente hallazgo, de los tizones encendidos, de la costumbre del uso del tabaco”, siendo esta la primera referencia histórica. Ha sido una planta de existencia milenaria, se cosechaba y utilizaba mucho antes de la llegada de los españoles a las tierras de América, fue ampliamente aceptado por ellos, quienes pudieron observar desde su llegada el amplio uso que de esta planta hacían los aborígenes de este lado del mundo (Manso, 2007).

Otros investigadores afirman que llegó a Cuba probablemente traído por los taínos en las últimas migraciones que estos grupos étnicos hicieron desde las costas de Venezuela. Los europeos tuvieron contacto por primera vez con esta planta en las Bahamas y en Cuba, y se percataron del valor que los habitantes de estas tierras daban a los productos de la planta. Con el tiempo, el uso del tabaco se fue expandiendo como un hábito de esparcimiento por las más diversas regiones del mundo y, aunque muchas de las formas de usarlo han quedado olvidadas en el tiempo, el simple hecho de fumar es un legado que queda de los más antiguos pobladores de nuestras tierras (Torrecilla, 2011).

La especie *Nicotiana tabacum* L. ocupa un lugar importante entre las plantas que se cultivan comercialmente con relación a otras plantas en la agricultura. Es una de las rarísimas cosechas que llegan al mercado mundial totalmente en forma de hojas; por sus propiedades, es objeto de constantes ataques encaminados a moderar o interrumpir su uso, pese a lo cual, su consumo se ha incrementado (Marí y Hondal, 1984).

El tabaco es la planta comercial no comestible que mayores extensiones de tierra ocupa a nivel mundial. Concentrando la mayor producción, según estadísticas de la FAO (2009), en países como China con (3 210 000 T), Estados Unidos (688 000 T), India (563 000 T), Zimbabwe (215 000 T) e Italia (104 000 T).

En Cuba, el tabaco ocupa un lugar primordial y es uno de los renglones que más divisas aporta al país. Es una de las plantas que primero se cultivó en nuestra isla y del

cual existe una gran tradición acumulada en cuanto al cultivo, en sus diferentes modalidades (FAO, 2009).

## **2.2. Importancia de las especies silvestres del género *Nicotiana*.**

Lo favorable del género *Nicotiana* para las investigaciones no escapó a la atención de los hibridadores pre Mendeleianos. Kolreuter, fue el primero en realizar sistemáticamente la hibridación en plantas, tuvo éxito al obtener un cruce entre *N. rustica* y *N. paniculada*, descrito en 1761, 100 años antes de que los resultados de Mendel fueran publicados (Stubbe, 1965 y Olby, 1966).

Las investigaciones en tabaco en la segunda mitad del siglo XX estuvieron en una mejor posición que cualquier otra planta de cultivo para tomar provecho de los nuevos avances que venían sucediendo (Sheen, 1977). Esto no solo fue debido a que las células y tejidos del tabaco son relativamente fáciles de cultivar, si no que las técnicas por si mismas se han desarrollado hasta un grado considerable usando especies del género *Nicotiana* (Clarkson, 2005 y Dadejová *et al.*, 2007).

Entre las especies se destacan por su importancia comercial *N. rustica* y *N. tabacum*, siendo esta última a las que pertenecen todas las variedades cultivadas en Cuba y la gran mayoría en otras partes del mundo (Espino, 2009). Debido al alto grado de relación genética entre las variedades cultivadas de tabaco existen preocupaciones sobre el grado de variabilidad genética que permanece dentro de los grupos de germoplasma elites en los cuales se basan las nuevas mejoras en el rendimiento, resistencia a enfermedades, y la calidad de este cultivo de importancia económica (Murphy *et al.* 1987).

Los cruzamientos interespecíficos han sido utilizados fundamentalmente como una vía para transferir genes de resistencia a las variedades comerciales (Pérez *et al.*, 2008). Por lo tanto, la importancia de identificar en las especies consideradas como silvestres aquellas que puedan constituir fuentes de resistencia a las principales plagas que afectan el cultivo se incrementa (Siva Raju *et al.*, 2009 y Valdés *et al.*, 2010).

En la literatura se ha descrito la presencia de genes de resistencia al moho azul *Peronospora hyosciamy* f.sp *tabacina* Adam en las especies *Nicotiana debneyi* Domim, *Nicotiana megalosiphon* Heurck y Mueller, *Nicotina goodspeedii* Wheeler, *Nicotiana*

*rustica* Linneaus, *Nicotiana excelsior* Black y *Nicotiana velutina* Wheeler. De ahí que se haya incorporado en las variedades comerciales genes de algunas de las fuentes mencionadas, las que pueden manifestar diferente tipo de herencia y comportamiento frente al patógeno (Delon *et al.*, 1999).

En Cuba la fuente de resistencia al moho azul más utilizada es la proveniente de *N. debneyi*, que tiene el inconveniente de expresarse después de varias semanas del trasplante y alcanzar el máximo grado de expresión en la etapa de floración. Por esta razón, pueden ocurrir pérdidas por el ataque de este patógeno en la etapa de semillero y primeras semanas de trasplantadas las posturas, si no se toman las medidas necesarias (Espino, 2009). Es así, que en la actualidad se desarrollan proyectos dirigidos a introducir genes de resistencia al moho azul, mediante cruzamientos interespecíficos con *N. megalosiphon*, la cual tiene la ventaja de expresar la resistencia desde la etapa de semillero (Pérez *et al.*, 2008).

Así mismo, se trabaja como principales fuentes de genes de resistencia a la pata prieta, enfermedad causada por el hongo *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* Breda de Haan, las que aportan las especies *Nicotiana plumbaginifolia* Viviani, de herencia monogénica dominante y que sólo confiere resistencia a la raza 0 (Apple, 1962) y *Nicotiana longiflora* Cabanilles que confiere resistencia tanto a la raza 0 como a la 1 (Chacón *et al.*, 2009). La fuente principal de resistencia al Virus del mosaico del tabaco proviene de la especie *Nicotiana glutinosa* Linneaus, de herencia monogénica dominante (Scholthof, 2004).

Varias especies de *Nicotiana* poseen genes de resistencia a plagas que aún no existen en Cuba o son menos frecuentes, por ejemplo, se puede encontrar fuente de resistencia en las especies *N. longiflora* y *N. megalosiphon* al fuego salvaje, enfermedad causada por *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* (Wolf y Foster) Stevens, mientras que al mildiu polvoriento provocado por el hongo *Erysiphe cichoracearum* D.C., se informan como fuentes de resistencia las especies *N. glutinosa* y *N. debneyi*. Esta última también se ha empleado como fuente de resistencia a la pudrición negra de la raíz causada por el hongo *Chalara elegans* Nag Raj and Kendrick (Valdés, 2010).

En los últimos años se ha incrementado el interés en la variabilidad genética que existe en *Nicotiana*. El uso de especies del género para la "agricultura molecular" marca un

avance en este campo emergente el cual brinda una forma más económica, de crear vacunas y medicamentos biotecnológicos complejos, que los sistemas de producción tradicionales; su utilidad comercial requerirá variabilidad genética para facilitar una extracción y producción eficiente (Fischer *et al.*, 2004 y Horn *et al.*, 2004).

Cuba registró recientemente el primer anticuerpo monoclonal recombinante obtenido a partir de hojas de plantas del género *Nicotiana*. Ya se produce a escala industrial la molécula CB-Hep.1, para la producción de la vacuna contra la Hepatitis B, enfermedad que provoca la muerte de casi un millón de personas al año en el mundo (Pujol y Valdés, 2006).

### **2.3. Recursos fitogenéticos**

Los recursos fitogenéticos son la suma de todas las combinaciones de genes resultantes de la evolución de una especie vegetal. Comprenden desde especies silvestres con potencial agrícola hasta genes clonados. El término implica que el material tiene o puede tener valor económico o utilitario, actual o futuro y para ello el hombre debe conocerlos, manejarlos, mantenerlos y utilizarlos racionalmente. La gran riqueza de diversidad genética actualmente disponible encierra potencialidades inmensas, sin embargo, los recursos genéticos no son renovables, son vulnerables; se pueden erosionar y hasta desaparecer (Hidalgo, 1991; Engelmann, 2011).

La percepción de la erosión genética como un problema a escala planetaria no tuvo lugar hasta bien entrado el siglo XX. Las señales de alarma comenzaron a tomarse en serio a mediados de los años sesenta, al descubrirse que el alto ritmo de desplazamiento de variedades primitivas cultivadas por la introducción de nuevos cultivares estaba llevando a un rápido estrechamiento de la base genética de las especies cultivadas. La toma de conciencia de esta situación determinó la puesta en marcha de medidas para la conservación de los recursos fitogenéticos (Khoury *et al.*, 2010).

La reducción de la diversidad trajo, por un lado, menor capacidad de resistencia y adaptación a cambios climáticos y plagas (Gepts, 2006); por el otro, una reducción de las posibilidades de mejora de la productividad a través de mezclas de genes. Ante esta

situación, la conservación de la biodiversidad es estratégica para satisfacer las demandas crecientes de la población mundial (FAO, 2009).

## **2.4. Modalidades de la conservación**

### **2.4.1. Conservación *in situ***

Por conservación *in situ* se entiende la conservación de ecosistemas y sus hábitats naturales, así como el mantenimiento y recuperación de poblaciones en sus medios naturales. En el caso de especies cultivadas o domesticadas, la conservación *in situ* se realiza en los hábitats donde esas especies cultivadas han desarrollado sus propiedades distintivas (Sevilla y Holle, 2004 y Lobo y Medina, 2009).

Al igual que los genes de un organismo se asocian entre ellos a través de múltiples interacciones, los individuos de una especie o de diferentes especies interactúan dentro de un ecosistema (Allendorf *et al.*, 2013). Por ello, cuando se acomete la conservación con el máximo nivel de información —el ecosistema—, no sólo se conservan cada uno de sus componentes, sino también todas sus relaciones recíprocas. Consecuentemente, se considera que la forma más lógica y el método más económico de conservar una entidad biológica es dentro del ecosistema del que forma parte. Idealmente, por tanto, la conservación de los ecosistemas en su hábitat natural, o conservación *in situ*, constituye la manera más apropiada de enfocar la problemática de conservación (Gómez-Campo, 1985; Bacchetta *et al.*, 2008; Nodari y Tomás, 2011).

A menudo, las actividades de conservación *in situ* se encuentran con problemas de aplicación derivados de la necesidad de establecer marcos legales de protección de las áreas y hábitats pertinentes, de conflictos de interés con otras actividades humanas, y de falta de una asignación continuada y a largo plazo de recursos económicos a las instituciones encargadas de las tareas de conservación. A esto cabe añadir, en numerosas ocasiones, la falta de una información básica sobre la biología de las especies a conservar. Este tipo de limitaciones conlleva la necesidad de desarrollar métodos de conservación *ex situ*, o conservación fuera del hábitat natural, que sirvan para complementar las acciones tomadas en los hábitats naturales (Bacchetta *et al.*, 2008; Lobo y Medina, 2009).

#### **2.4.2. Conservación *ex situ***

Los programas de conservación *ex situ* complementan la conservación *in situ* almacenando a largo plazo germoplasma representativo de las poblaciones, permitiendo un mejor conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado, y proporcionando propágulos para su utilización en programas de mejora genética de especies cultivadas (Iriondo, 2001; Lobo y Medina, 2009).

Los métodos de conservación *ex situ* implican la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética de una especie y su mantenimiento fuera de las condiciones naturales en las que la especie ha evolucionado. Las ventajas que proporcionan estos métodos son: control directo sobre el material, fácil accesibilidad y disponibilidad (Iriondo, 2001).

Una vez realizada la recolección del material a conservar, la conservación *ex situ* de especies amenazadas consta de dos elementos esenciales: el almacenamiento o preservación del germoplasma y el desarrollo de métodos que posibiliten su propagación (Engelmann, 2011). No obstante, también deben tenerse presentes otros elementos relevantes tales como la documentación y la caracterización del germoplasma almacenado (Rao *et al.*, 2007). En ocasiones, la reducida disponibilidad del material vegetal es un factor que acompaña a las actividades de conservación, sobre todo en el caso de especies silvestres, conservadas en lugares distantes de los hábitats naturales, de manera que la capacidad de ensayar protocolos y llevar a cabo experimentos con replicación se encuentra a menudo muy limitada (Bacchetta *et al.*, 2008)

#### **2.5. Bancos de germoplasmas**

Los bancos de germoplasma surgen como una respuesta a la necesidad de conservar el patrimonio genético vegetal y, por tanto, la variabilidad genética de cada especie, lo que constituye el fundamento esencial de los programas de mejoramiento en plantas, al poder proporcionar un conjunto de genotipos para los programas de selección y cruzamiento (Frankham *et al.*, 2003; Hidalgo, 2003).

La constatación en la década de los sesenta de que el mundo estaba sufriendo una

importante crisis de diversidad genética en sus cultivos a consecuencia de la sustitución de las variedades tradicionales por cultivares modernos, puso de manifiesto la necesidad de tomar medidas decididas para la conservación de la biodiversidad vegetal y constituyó el catalizador para el establecimiento de los primeros bancos de germoplasma (Bacchetta *et al.*, 2008).

De manera sintética, el *germoplasma* puede ser definido como cualquier material capaz de transmitir los caracteres hereditarios de una generación a otra. Se puede afirmar que el germoplasma representa la base física de la transmisión genética, o bien la suma de los genes y de los factores citoplasmáticos que rigen la herencia (Bacchetta *et al.*, 2008).

Al hablar de germoplasma vegetal, puede aludirse a distintas estructuras vegetales (esporas, tejidos o partes de plantas), incluyendo sus células y compuestos con información genética (ADN, ARN, etc.) y, de especial modo, las semillas. Éstas constituyen la estructura más representativa y evolucionada de las plantas superiores para su perpetuación, siendo además el agente de dispersión más frecuente, eficaz y con mayor capacidad de regenerar una planta vascular completa a largo plazo (Rao *et al.*, 2007; Lobo y Medina, 2009).

### **2.5.1. Bancos de semillas**

El almacenamiento del material a conservar en forma de semillas constituye uno de los procedimientos de conservación *ex situ* más válidos y extendidos en la actualidad. Se ha podido comprobar que el almacenamiento de semillas a largo plazo constituye una operación relativamente simple y económica en términos de tecnología, infraestructuras, personal y gastos de mantenimiento (Lobo y Medina, 2009).

Las semillas constituyen el método más eficaz y económico para la conservación *ex situ* de especies vegetales. Por un lado, son unidades adaptadas a la dispersión en el tiempo y, por tanto, capaces en la mayoría de los casos de permanecer viables, de forma natural, durante largos períodos de tiempo (van Treuren *et al.*, 2013). Por otro lado, su pequeño tamaño, unido a la posibilidad de que cada una de ellas posea una constitución genética diferente, asegura la conservación de una gran diversidad genética en un espacio reducido (Iriondo y Pérez, 1999; Rao *et al.*, 2007).

La conservación de semillas posee mayores requerimientos técnicos que las colecciones de plantas. Sin embargo, estas últimas resultan caras en términos de mano de obra y espacio, y sólo permiten el mantenimiento de un número reducido de individuos por especie. Las colecciones de plantas resultan vulnerables frente a desastres naturales como incendios, tornados, plagas y enfermedades (Hunter, 2011). En muchas ocasiones la conservación de semillas puede constituir la única opción disponible cuando los últimos ejemplares de una especie están a punto de desaparecer (Iriondo, 2001). Por ello, entre todos los métodos de conservación, los bancos de semillas son los más utilizados al ser simultáneamente prácticos y económicos (Rao *et al.*, 2007; Hunter, 2011)

## **2.6. Principios de conservación de semillas.**

El principio básico para la conservación de semillas es la limitación de los cambios químicos que son originados por el metabolismo o los procesos de envejecimiento. Se sabe desde hace tiempo que unas condiciones de baja temperatura y bajo contenido en humedad prolongan la longevidad de las semillas. De acuerdo a las reglas de Harrington (Justice y Bass, 1978), existe una relación exponencial entre la longevidad de las semillas, la temperatura y el contenido de humedad de almacenamiento, de manera que la longevidad de una semilla se duplica por cada reducción de 5 °C en la temperatura y por cada reducción de un 1 % en el contenido de humedad. De acuerdo con este modelo, las semillas conservadas a muy bajas temperaturas y con muy bajos contenidos de humedad deberían mantenerse viables durante milenios. Sin embargo, Vertucci y Roos (1990) y Ellis *et al.* (1990) han mostrado que existen límites a los efectos beneficiosos de la desecación sobre la longevidad y que estos límites dependen de la composición química de la semilla.

También se ha comprobado que, en contra de lo establecido por las reglas de Harrington, los efectos de la temperatura y el contenido de humedad no son independientes (Vertucci y Roos, 1993). De todas formas, el uso apropiado de estos dos factores proporciona una vía aceptable para la conservación a largo plazo de muestras de semillas en bancos de germoplasma.



## 2.7. Crioconservación de semillas ortodoxas

Desde la década de los 80, a nivel mundial se han realizado varias investigaciones utilizando la crioconservación como alternativa a los métodos tradicionales de almacenamiento de semillas. Los resultados obtenidos en diferentes trabajos indican que la crioconservación puede ser utilizada en semillas de numerosas plantas cultivadas (Stanwood, 1981; González-Benito *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 2004).

Las técnicas de crioconservación utilizan normalmente nitrógeno líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) debido a su costo relativamente bajo. El objetivo es alcanzar temperaturas inferiores a  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  para lograr condiciones de baja energía cinética molecular y una difusión extremadamente lenta, de tal forma que las reacciones químicas se encuentren prácticamente paralizadas; bajo estas condiciones, se postulan longevidades extremadamente largas (Pritchard, 1995).

En estas circunstancias disminuyen los controles de viabilidad, responsables de una disminución significativa del número de semillas almacenadas, y disminuyen los riesgos de deterioro genético asociados a los procesos de multiplicación. Otras ventajas de las técnicas de crioconservación son la ausencia de controles de temperatura y humedad durante el almacenamiento, la inexistencia de daños por parásitos y patógenos y, en teoría, una viabilidad indefinida (Iriondo, 2001).

Los bancos de crioconservación de semillas ortodoxas constituyen una alternativa a los bancos de semillas convencionales. Si se adiciona a las anteriores ventajas el hecho de que cada una de ellas propone una reducción de los costos (Pardey *et al.*, 2001) y un aumento considerable de la seguridad de las semillas (Walters *et al.*, 2004), la crioconservación se coloca en una posición muy ventajosa si la comparamos con otros métodos de conservación.

A pesar de las ventajas antes citadas existen pocas referencias sobre la crioconservación de semillas del género *Nicotiana*. Touchell y Dixon (1994) solo pudieron regenerar plantas de *Nicotiana occidentalis* Wheeler a partir de la germinación de embriones aislados *in vitro*, al obtener bajos niveles de supervivencia empleando los métodos convencionales. Por otro lado, Walters *et al.* (2004) obtuvieron más de un 85% de germinación en cuatro variedades de *N. tabacum* después de 14 años de exposición a NL, aunque no reportan las condiciones con las que fue crioconservado el material.

Por otro lado, estudios recientes muestran que después de un periodo de almacenamiento, donde no se muestran síntomas en la disminución de la calidad de las semillas, ocurre una rápida declinación de la viabilidad del material crioconservado. La duración de este periodo asintomático está relacionada, más allá de las propiedades intrínsecas de las semillas de cada especie, con el manejo recibido antes de ser crioconservadas (Walters *et al.*, 2004 y Walters *et al.*, 2010).

Las condiciones de cultivo, cosecha y poscosecha, así como la humedad y la temperatura de almacenamiento son factores fundamentales que el operador debe tomar en consideración en el manejo de semillas en un banco de germoplasma (Buitink *et al.*, 2000 y Walters *et al.*, 2010). Se ha postulado que las interacciones entre estos factores contribuyen a la amplia variación de longevidad observada dentro y entre lotes de semillas y especies (Walters 1998 y 2004 y Buitink y Leprince, 2004). Por lo tanto, la influencia de estos factores debe ser evaluada antes de utilizar la crioconservación como estrategia segura para almacenar semillas del género *Nicotiana* (Bailly *et al.*, 2008 y Walters *et al.*, 2010).

## **2.8. Descriptores**

Un descriptor es una característica o atributo cuya expresión es fácil de medir, registrar o evaluar y que hace referencia a la forma, estructura o comportamiento de una accesión. Los descriptores son aplicados en la caracterización y evaluación de las accesiones debido a que ayudan a su diferenciación y a expresar el atributo de manera precisa y uniforme, lo que simplifica la clasificación, el almacenamiento, la recuperación y el uso de los datos (Jaramillo y Baena, 2000).

### **2.6.1. Tipos de descriptores**

De acuerdo a la información que proporcionan los descriptores se clasifican en (Franco e Hidalgo, 2003):

- **De pasaporte.** Proporcionan la información básica que se utiliza para el manejo general de la accesión, incluyendo el registro en el banco de germoplasma y cualquier otra información de identificación, y describen los parámetros que se deben observar cuando se hace la recolección original.

- **De manejo.** Proporcionan las bases para el manejo de las accesiones en el banco de germoplasma y ayudan durante su multiplicación y regeneración; por ej., fechas de multiplicación, cantidades de semillas disponibles, porcentajes de viabilidad.
- **Del sitio y el medio ambiente.** Describen los parámetros específicos del sitio y del ambiente y ayudan en la interpretación de resultados cuando se realizan pruebas de caracterización y evaluación. Se incluyen, también, en esta categoría los descriptores del sitio de recolección del germoplasma; por ej., coordenadas geográficas, características de clima y suelos.
- **De caracterización.** Permiten la discriminación relativamente fácil entre fenotipos. Generalmente son caracteres altamente heredables que pueden ser fácilmente detectados a simple vista y se expresan igualmente en todos los ambientes. Además, pueden incluir un número limitado de caracteres adicionales considerados como deseables por consenso de los usuarios de un cultivo en particular; por ej., colores y formas de tallos, hojas, flores, semillas y frutos.
- **De evaluación.** La expresión de la mayoría de los descriptores de esta categoría depende del medio ambiente y, en consecuencia, se requieren métodos experimentales especiales para su evaluación. La evaluación puede también involucrar métodos complejos de caracterización molecular o bioquímica. En este tipo de descriptores se incluyen caracteres como rendimiento, productividad agronómica, susceptibilidad a estrés y caracteres bioquímicos y citológicos, los cuales generalmente son de mayor interés en el mejoramiento de cultivos.

### **2.6.2. Descriptores morfológicos**

Toda la variabilidad de una especie se almacena en el genoma, es decir, entre los miembros de la población que conforman la especie, y puede o no expresarse en características que permitan ser identificadas. Por tanto, desde el punto de vista de su expresión, la variabilidad contenida en el genoma de una especie puede ser agrupada en dos grandes clases: (1) la que se expresa en características visibles y que conforman el fenotipo, y (2) la que no se expresa en características visibles y que en

general se refiere a los procesos o productos internos de la planta (Franco e Hidalgo, 2003).

En relación con el fenotipo, los caracteres que lo conforman corresponden en su gran mayoría a la descripción morfológica de la planta y su arquitectura. Estos caracteres se denominan descriptores morfológicos y según Franco e Hidalgo (2003) se pueden agrupar de la forma siguiente:

- **Botánicos-taxonómicos:** Corresponden a los caracteres morfológicos que describen e identifican la especie y son comunes a todos los individuos de esa especie. En su gran mayoría estos caracteres tienen una alta heredabilidad y presentan poca variabilidad, aunque en las especies cultivadas con frecuencia se pueden encontrar unos pocos que muestran diferentes grados de variabilidad, especialmente en aquellos de interés particular para el hombre como son el tipo y la forma de la hoja, la forma del fruto y la descripción de la flor.
- **Morfoagronómicos:** Corresponden a los caracteres morfológicos que son relevantes en la utilización de las especies cultivadas. Pueden ser de tipo cualitativo o cuantitativo, e incluyen algunos de los caracteres botánicos-taxonómicos más otros que no necesariamente identifican la especie, pero que son importantes desde el punto de vista de necesidades agronómicas, de mejoramiento genético, y de mercadeo y consumo. A manera de ejemplos de estos caracteres se puede mencionar la forma de las hojas; pigmentaciones en raíz, tallo, hojas y flores; color, forma y brillo en semillas; tamaño, forma y color de frutos; arquitectura de planta expresada en hábito de crecimiento y tipos de ramificación.
- **Evaluativos:** Esta porción de la variabilidad sólo se expresa como respuesta a estímulos ambientales bióticos (plagas y enfermedades) o abióticos (estrés por temperatura, agua, nutrientes). En general, la respuesta se expresa en características de tipo cualitativo.

Los descriptores morfológicos constituyen una herramienta útil en la caracterización del germoplasma vegetal (Anjum, 2011). Los estudios realizados hasta la fecha para discernir entre fenotipos de plantas obtenidas a partir de semillas crioconservadas y no crioconservadas se centran en la determinación y análisis de parámetros bioquímicos y

moleculares y no abordaban con profundidad la caracterización morfológica (Benson, 2008; Engelmann, 2011). Sin embargo, no dejan de reconocer la importancia de este tipo de caracterización, incluso sus ventajas (Cejas *et al.*, 2013).

Existen varios estudios en el cultivo *in vitro* donde se informan afectaciones en el material después de la crioconservación (Fukai *et al.*, 1994; Medina *et al.*, 2007; Benson, 2008; Engelmann, 2011). Sin embargo, existe poca información relacionada con es tema en la crioconservación de semillas (Cejas *et al.*, 2012; Zevallos *et al.*, 2013). No obstante, en el marco de una metodología para la crioconservación a largo plazo del género *Nicotiana* se hace necesario verificar que la estabilidad genética del material no ha sido alterada antes de usar la crioconservación como técnica para la conservación a largo plazo (Engelmann, 2011)

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1. Ubicación de los experimentos y especies seleccionadas**

La investigación se realizó en la Estación Experimental del Tabaco de Cabaiguán, Sancti Spíritus, perteneciente al Instituto de Investigaciones del Tabaco de Cuba en la campaña tabacalera 2013-2014. Para la realización del estudio se seleccionaron las especies *Nicotiana tabacum* Linnaeus cultivar Sancti Spíritus 96 (SS96), de amplia aceptación entre campesinos y empresas de la región central del país y *Nicotiana megalosiphon* Heurck & Mueller (NE43) utilizada en diferentes programas de mejoramiento atendiendo a su resistencia al moho azul (*Peronospora hyosciamy* f.sp *tabacina* Adam) y a la Pata prieta, enfermedad causada por el hongo *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae* (Pérez *et al.*, 2008).

#### **3.2. Recolección y acondicionamiento de la semilla**

Las semillas fueron de ambas especies fueron recolectadas cuando las cápsulas se tornaron completamente carmelitas (aproximadamente 35 días después de la antesis para SS96 y 18 días después de la antesis para NE43). Posteriormente, se trasladaron al laboratorio donde se secaron a temperatura ambiente y a humedad relativa (HR) 50 % por un periodo de siete días. Pasado este tiempo las semillas se separaron de sus cápsulas, se tamizaron y se introdujeron en desecadoras de vidrio cerradas herméticamente a temperatura ambiente, con silicagel autoindicador en proporción 1:3 (masa de semillas: masa silicagel autoindicador) como agente desecante hasta un 7 % de humedad (base masa fresca). El silicagel autoindicador fue renovado cada vez que su color comenzaba a cambiar de azul intenso a azul pálido o rosado, como prueba de que su poder de hidratación se había agotado (Engels *et al.*, 2007).

#### **3.3. Determinación del contenido de humedad de las semillas**

Los ensayos de humedad se realizaron a 103 °C durante 4 h utilizando 3 repeticiones de 0.5 g cada una y el contenido de humedad se expresó en porcentaje de masa fresca (ISTA, 2005).

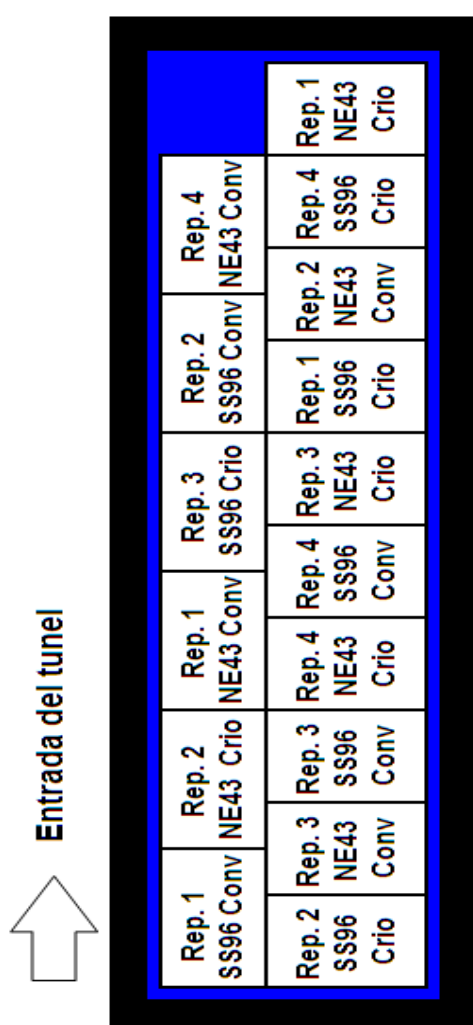
#### **3.4. Conservación**

Muestras de semillas de cada accesión se colocaron en crioviales de 1.5 mL de

capacidad. Una muestra se introdujo directamente en una cámara de refrigeración a 5 °C y HR superior al 60 % y la otra en tanques con nitrógeno líquido (NL) (velocidad de enfriamiento: 200 °C/min). Pasado un año, los crioviales se retiraron y se dejó que la temperatura de las semillas estuviera en equilibrio con la temperatura ambiente (25°C - 27 °C).

### 3.5. Ensayos de germinación

Para evitar los daños por imbibición, las semillas secas se humidificaron en una desecadora de vidrio con H<sub>2</sub>O en su interior, evitando el contacto directo de las semillas



**Figura 1:** Diseño experimental en fase de semillero.

con el agua. Bajo estas condiciones se incubaron durante el tiempo necesario para alcanzar un contenido de humedad superior al 10 %.

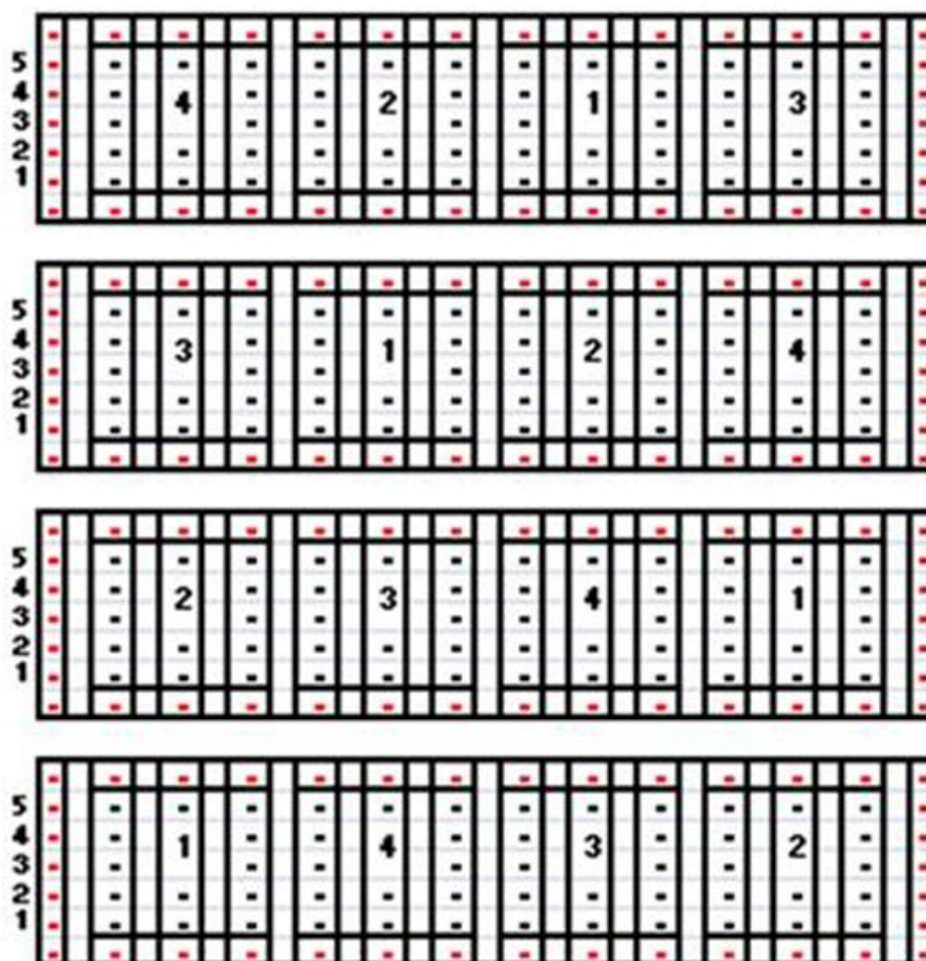
Los ensayos de germinación se realizaron utilizando cuatro repeticiones de 100 semillas cada una. Las semillas se colocaron en placas Petri sobre dos discos de papel de filtro previamente humedecidos con agua destilada. La incubación se realizó durante 14 días a temperatura ambiente con un fotoperiodo de 12 h. A los siete días se determinó la Energía Germinativa (EG) y a los 14 días la Potencia Germinativa (PG). En todos los ensayos la emergencia de la radícula fue el criterio para considerar que la germinación de la semilla había tenido lugar (Engels *et al.*, 2007).

### 3.6. Tratamiento en semillero

Las semillas de cada accesión, tanto las crioconservadas como las conservadas a 5 °C, se sembraron en bandejas de poliestireno expandido, con 264 alvéolos que contenían sustrato orgánico con la siguiente composición: 70% (V/V) de

cachaza, 15% (V/V) de cáscara de arroz y 15% (V/V) de zeolita (Hernández *et al.*, 2004), basado en la tecnología de bandejas flotantes según García y Andino (2002). Las bandejas se colocaron en condiciones de cultivo protegido o túneles, siguiendo un diseño completamente aleatorio con cuatro réplicas (Figura 1).

### 3.7. Trasplante y cultivo



**Figura 2:** Diseño experimental para la fase de campo. Cuatro réplicas para cada tratamiento distribuidas al azar. Cada parcela está constituida por 15 plantas útiles. En rojo aparecen los bordes o marginales, 1) SS96 Crio, 2) SS96 No crio, 3) NE43 Crio, 4) NE43 No crio

Pasados 45 días, las plantas de cada accesión se trasplantaron al campo sobre suelo pardo sialítico carbonatado (Hernández *et al.*, 1999), con cuatro réplicas distribuidas al



azar para cada tratamiento (Figura 2). La distancia de plantación fue de 30 cm entre plantas y 180 cm entre hileras y la fertilización, riego y cuidados fitosanitarios se realizó según lo establecido por el instructivo técnico del cultivo descrito por MINAG (1988).

### 3.8. Descriptores morfológicos

En la fase de semillero las mediciones y observaciones se realizaron a los 20, 30 y 40 días después de sembradas las semillas (DDS), para lo cual se seleccionaron por cada día de evaluación 10 plantas al azar por cada réplica, obviando en la selección las plantas sembradas en el borde de cada bandeja (marginales) (Figura 1). En la fase de campo las mediciones y observaciones se realizaron cuando cada especie alcanzaba el 75 % de floración, siguiendo la metodología de Torrecilla *et al.* (2012).

En la fase de semillero los descriptores morfológicos cuantitativos (Tabla 1) se determinaron para cada día de evaluación según la metodología descrita por Torrecilla *et al.* (2012), mientras que los descriptores morfológicos cualitativos (Tabla 2) solo se determinaron para los 40 DDS, siguiendo, de igual forma, la metodología descrita por este autor.

**Tabla 1:** Descriptores morfológicos cuantitativos determinados en la fase de semillero

No	Descriptor	Siglas descriptor	U/M*	Instrumento de medición	Precisión
1	Diámetro del tallo	DT	mm	pie de rey	±0.01 mm
2	Altura de la planta	AP	mm	regla graduada	±0.1mm
3	No hojas	NH	u	por conteo	--
4	Largo de la hoja mayor	LH	mm	regla graduada	±0.1mm
5	Ancho de la hoja mayor	AH	mm	regla graduada	±0.1mm
6	Masa fresca planta	MF	g	balanza analítica	±0.1mg
7	Masa seca planta	MS	g	balanza analítica	±0.1mg

\*U/M: Unidad de medida

**Tabla 2:** Descriptores morfológicos cualitativos determinados en la fase de semillero

No	Descriptor	Siglas descriptor	Estados del descriptor
1	Color de la hoja	CH	verde oscuro verde verde claro verde amarillo amarillo
2	Forma de la base de la hoja	FBH	sésil peciolada
3	Superficie de la hoja	SH	poco onduladas medianamente onduladas onduladas muy onduladas lisa
4	Color del tallo	CT	verde oscuro verde verde claro verde amarillo

En la fase de campo se seleccionaron por cada día de evaluación 10 plantas al azar por cada réplica, obviando en la selección las plantas sembradas en el borde de cada parcela (marginales) (Figura 2). Tanto los descriptores morfológicos cualitativos (Tabla 3) como los cuantitativos (Tabla 4) se determinaron según la metodología descrita por Torrecilla *et al.* (2012),

**Tabla 3:** Descriptores morfológicos cualitativos determinados en la fase de campo

No	Descriptor	Siglas descriptor	Estados del descriptor	Siglas estados del descriptor
1	Color de la flor	CF	rojo oscuro rojo rosado blanco morado verde amarillo	RO R RB B M VA
2	Forma de la corola	FC	seccionada medianamente seccionada no seccionada	S MS NS

<b>3</b>	<b>Forma del tubo de la corola</b>	FTC	bien manifiesto poco manifiesto no manifiesto	BM PM NM
<b>4</b>	<b>Relación estambre-estigma</b>	EE	estigma corto normal estigma largo	C N L
<b>5</b>	<b>Color de la hoja</b>	CH	verde oscuro verde verde claro verde amarillo amarillo	VO V VC VA A
<b>6</b>	<b>Forma de la base de la hoja</b>	FBH	sésiles pecioladas	S P
<b>7</b>	<b>Superficie de la hoja</b>	SH	poco onduladas medianamente onduladas onduladas muy onduladas lisa	PO MO O MMO L
<b>8</b>	<b>Hábito de la planta</b>	HP	cilíndrica cónica elipsoidal oval cónica inversa	CL C E O CI

**Tabla 4:** Descriptores morfológicos cuantitativos determinados en la fase de campo

No	Siglas descriptor	Descriptor	U/M*	Instrumento de medición	Precisión
1	LF	Longitud de la flor	cm	regla graduada	±0.01cm
2	AF	Ancho de la flor	cm	regla graduada	±0.01cm
3	DPF	Días para florecer	días	por conteo	--
4	DT	Diámetro del tallo	cm	pie de rey	±0.001 cm
5	LH	Longitud de la hoja	cm	regla graduada	±0.01cm
6	AH	Ancho de la hoja	cm	regla graduada	±0.01cm
7	MFH	Masa fresca de la hoja	g	balanza analítica	±0.0001g
8	MSH	Masa seca de la hoja	g	balanza analítica	±0.0001g
9	LC	Longitud de la cápsula	cm	pie de rey	±0.001 cm
10	AC	Ancho de la cápsula	cm	pie de rey	±0.001 cm
11	MFC	Masa fresca de la cápsula	g	balanza analítica	±0.0001g
12	MSC	Masa seca de la cápsula	g	balanza analítica	±0.0001g
13	DP	Diámetro de la planta	cm	regla graduada	±0.01cm
14	AP	Altura de la planta con inflorescencia	cm	regla graduada	±0.01cm

\*U/M: Unidad de medida

### **3.9. Índices de crecimiento**

El cálculo de los índices crecimiento se realizó a partir de la dinámica del crecimiento entre los 20 y 40 días posteriores a la siembra.

#### **3.9.1. Incremento de biomasa ( $\Delta M$ )**

$$\Delta M = M_{40} - M_{20} \quad \text{Expresada en g}$$

Donde:

$M_{40}$ : masa seca de la planta tomada a los 40 DDS expresada en g.

$M_{20}$ : masa seca de la planta tomada a los 20 DDS expresada en g.

#### **3.9.2. Tasa absoluta de crecimiento (TAC)**

$$\text{TAC} = \frac{M_{40} - M_{20}}{T_{40} - T_{20}} \quad \text{Expresada en g} \cdot \text{días}^{-1}$$

Donde:

$M_{40}$ : masa seca de la planta tomada a los 40 DDS expresada en g.

$M_{20}$ : masa seca de la planta tomada a los 20 DDS expresada en g.

$T_{40}-T_{20}$ : intervalo de tiempo transcurrido entre la medición inicial, 20 DDS, y la final, 40 DDS

#### **3.9.3. Tasa relativa de crecimiento (TRC)**

Expresa cantidad de masa seca producida por unidad de masa seca presente por unidad de tiempo.

$$\text{TRC} = \frac{2 \cdot (M_{40} - M_{20})}{(M_{40} + M_{20}) \cdot (T_{40} - T_{20})} \quad \text{Expresada en g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$$

Donde:

$M_{40}$ : masa seca de la planta tomada a los 40 DDS expresada en g.

$M_{20}$ : masa seca de la planta tomada a los 20 DDS expresada en g.

T<sub>40</sub>-T<sub>20</sub>: intervalo de tiempo transcurrido entre la medición inicial, 20 DDS, y la final, 40 DDS

### **3.10. Tratamiento estadístico**

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el *Statistical Package for Social Sciences* (versión 11.5 para *Windows*, SPSS Inc.). Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos (prueba de Komolgorov Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene). Para la comparación morfológica en los diferentes estados se empleó una Prueba t ( $p \leq 0.05$ ). Con el objetivo de lograr los supuestos de las pruebas paramétricas realizadas las variables cuantitativas discretas fueron transformadas según  $y' = \sqrt{y}$ . Cada tabla y figura de la sección Resultados y Discusión describe el tratamiento estadístico específico ejecutado.

#### 4. Resultados y discusión

##### 4.1. Efecto de la crioconservación sobre el desarrollo en fase de semillero de plántulas de dos especies del género *Nicotiana* obtenidas a partir de semillas crioconservadas y conservas por el método convencional

###### 4.1.1. Descriptores cualitativos determinados a los 40DDS

Los descriptores cualitativos tienen aceptable heredabilidad, no son muy afectados por los cambios del medio ambiente y su medición resulta relativamente fácil. Al evaluar los diferentes estados de los descriptores determinados a los 40 DDS no se observaron diferencias al comparar el resultado proveniente de las plántulas obtenidas a partir de semillas crioconservadas por espacio de un año (Crio) y las conservadas a 5 °C por igual periodo (No crio) (Tabla 5). Los diferentes estados de los descriptores cualitativos determinados coinciden completamente con los referidos por otros autores para estas especies (Torrecilla, 2013)

**Tabla 5:** Descriptores morfológicos cualitativos determinados a los 40 DDS para cada uno de los tratamientos evaluados

Tratamiento	Forma del ápice	Color de la hoja	Ondulaciones de la hoja	Forma de la base de la hoja	Color del tallo
<b>SS96 Crio</b>	Poco agudo	Verde	Poco ondulada	Sésil	Verde claro
<b>SS96 No Crio</b>	Poco agudo	Verde	Poco ondulada	Sésil	Verde claro
<b>NE43 Crio</b>	Muy agudo	Verde Claro	Medianamente ondulada	Peciolada	Verde claro
<b>NE43 No Crio</b>	Muy agudo	Verde Claro	Medianamente ondulada	Peciolada	Verde claro

###### 4.1.2. Análisis de estadísticos simples de las variables cuantitativas calculas a los 40DDS

El análisis de estadísticos simples permite estimar y describir el comportamiento de los diferentes tratamientos en relación con cada descriptor cuantitativo determinado. Estos análisis proporcionan una idea general de la variabilidad del germoplasma y permiten inmediatamente detectar datos no esperados y errores de medición en el ingreso de datos, entre otros.

**Tabla 6:** Estadístico simples calculados a los descriptores determinados a los 40 DDS. A: SS96; B: NE43.**A**

Estadísticos	Diámetro Tallo	Altura Planta	Largo Hoja	Ancho Hoja	Masa Fresca	Masa Seca
Promedio	2.67	111.14	121.13	55.23	2.6181	0.13053
Desviación Estándar	0.2725	24.4780	20.4329	9.3049	0.9634	0.0490
Coefficiente de Variación	10.19%	22.02%	16.87%	16.85%	36.80%	37.55%
Mínimo	2.00	47.20	66.00	32.00	0.8520	0.0419
Máximo	3.15	158.40	168.00	78.00	4.8186	0.2457
Sesgo Estandarizado	-1.31629	-0.64082	0.13688	0.1523	1.8442	1.8484
Curtosis Estandarizada	-1.11161	-0.14632	0.0385	0.073	-0.8837	-1.0373

**B**

Estadísticos	Diámetro Tallo	Altura Planta	Largo Hoja	Ancho Hoja	Masa Fresca	Masa Seca
Media	2.52	143.13	139.79	43.34	2.4844	0.1537
Desviación Estándar	0.2403	27.4809	11.5897	5.5801	0.6602	0.0426
Coefficiente de Variación	9.54%	19.20%	8.29%	12.88%	26.58%	27.72%
Mínimo	1.95	81.00	115.00	31.00	0.8596	0.0573
Máximo	3.00	197.00	170.00	56.00	4.0998	0.2502
Sesgo Estandarizado	-0.6402	-0.7494	0.3292	0.2061	0.3211	0.4747
Curtosis Estandarizada	-0.3648	-0.7030	-0.2933	-0.9990	0.1084	-0.0921

Las Tablas 6A y 6B muestran siete de los estadísticos simples más comunes en el análisis estadístico de recursos fitogenéticos (Franco e Hidalgo, 2003), calculados para cada accesión evaluada en el estudio, independiente de la técnica de conservación. Con dichos estadísticos se obtiene información útil que permite inferir varios resultados e interrogantes claves. De especial interés resultan en este caso el Coeficiente de Variación (CV), el Sesgo Estandarizado y la Curtosis Estandarizada.

El CV es una medida relativa de variación que define más intrínsecamente la magnitud de la variabilidad de los parámetros estudiados debido a que es independiente de las unidades de medida. Facilita la comparación de la variabilidad de una misma característica en dos grupos o de parámetros medidos sobre un mismo grupo (Johnson y Bhattacharyya, 2010).

El mayor CV para ambas especies lo presentan los datos de MF y MS, lo cual se refleja

en las diferencias apreciables entre los valores máximo y mínimo de estos descriptores y en su Deviación Estándar. Otro descriptor de amplia variación dentro del estudio en ambas especies es Altura de la Planta, el cual al estar directamente relacionado con MF y MS podría ser la fuente principal de variabilidad de estos últimos.

**Tabla 7:** Matriz de correlación simple entre seis de las variables cuantitativas determinadas a los 40 DDS. A: SS96; B: NE43. En letra cursiva aparece el coeficiente de correlación y en rojo el nivel de significación (Análisis multivariado  $p \geq 0.05$ )

**A**

	DT	AP	LH	AH	MF	MS
DT						
AP	<i>0.3804</i> <b>0.0005</b>					
LH	<i>0.5148</i> <b>0.0000</b>	<i>0.6830</i> <b>0.0000</b>				
AH	<i>0.4834</i> <b>0.0000</b>	<i>0.6703</i> <b>0.0000</b>	<i>0.8779</i> <b>0.0000</b>			
MF	<i>0.5397</i> <b>0.0000</b>	<i>0.7592</i> <b>0.0000</b>	<i>0.9003</i> <b>0.0000</b>	<i>0.8626</i> <b>0.0000</b>		
MS	<i>0.5235</i> <b>0.0000</b>	<i>0.7593</i> <b>0.0000</b>	<i>0.8922</i> <b>0.0000</b>	<i>0.8604</i> <b>0.0000</b>	<i>0.9953</i> <b>0.0000</b>	
	DT	AP	LH	AH	MF	MS

**B**

	DT	AP	LH	AH	MF	MS
DT						
AP	<i>0.3747</i> <b>0.0006</b>					
LH	<i>0.2503</i> <b>0.0251</b>	<i>0.4397</i> <b>0.0000</b>				
AH	<i>0.1505</i> <b>0.1827</b>	<i>0.3042</i> <b>0.0061</b>	<i>0.5903</i> <b>0.0000</b>			
MF	<i>0.4354</i> <b>0.0001</b>	<i>0.6244</i> <b>0.0000</b>	<i>0.5514</i> <b>0.0000</b>	<i>0.6624</i> <b>0.0000</b>		
MS	<i>0.4220</i> <b>0.0001</b>	<i>0.5920</i> <b>0.0000</b>	<i>0.5329</i> <b>0.0000</b>	<i>0.6124</i> <b>0.0000</b>	<i>0.9564</i> <b>0.0000</b>	
	DT	AP	LH	AH	MF	MS

Las Tablas 7A y 7B presentan los coeficientes de correlación como una matriz para ambas especies, independiente de la técnica de conservación. Los coeficientes de correlación miden la fuerza de la relación lineal entre dos columnas en una escala de -1



a +1. Entre mayor sea el valor absoluto de la correlación, más fuerte es la relación lineal entre las dos variables (Johnson y Bhattacharyya, 2010). Al tomar valores inferiores a 0.05 todos los descriptores determinados en el estudio muestran correlaciones altamente significativas y al ser los coeficientes de correlación mayores que cero, todas las correlaciones son positivas, como era de esperar según los descriptores determinados.

Para la SS96 la correlación entre LH y AH con MF y MS es extremadamente fuerte (> 0.85) (Tabla 7A). Tal resultado sugiere que la hoja, de las estructuras evaluadas, es la que más aporta a la MF y por consiguiente a la MS de SS96. Sin embargo, es otro el comportamiento de la NE43, la correlación entre la AP y la MF y MS es superior al resto (>0.59) lo cual sugiere que la altura de la planta es el descriptor con mayor influencia sobre la MF y MS. Así, las plántulas de SS96 tuvieron un desarrollo foliar superior, de acuerdo con su altura, que las plántulas de NE43. Este es un aspecto, más allá de su fenotipo, que distingue a ambas especies en su desarrollo en semillero.

#### **4.1.3. Comparación morfológica durante el desarrollo en fase de semillero**

Durante el desarrollo de las plántulas de ambas especies en la fase de semillero se observó en los estadíos iniciales diferencias significativas en todos los descriptores evaluados, tanto para la SS96 como para NE43, al comparar las plántulas Crio con las No crio (Tabla 8A y 8B). Es indudable que a los 20DDS las plantas No crio tuvieron un mayor desarrollo que las Crio, en ambas especies. Este resultado es coincidente con el obtenido en Ensayos de germinación en nuestro laboratorio (datos no publicados) donde las semillas Crio mostraron una pérdida de vigor al crioconservarse por espacio de un año.

Las diferencias entre las plántulas No crio y las Crio se mantiene hacia los 30DDS solo para el descriptor MS en el caso de SS96 y para los descriptores MF y MS en el caso de NE43; a los 40DDs solo se muestran diferencias significativas en la especie NE43 en el descriptor MS. Por lo tanto, existe una tendencia a desaparecer las diferencias en los descriptores evaluados hacia finales de la fase de semillero.

**Tabla 8:** Efecto de la técnica de conservación sobre el desarrollo de plántulas de A: SS96 y B: NE43

## A

Descriptores	20			30			40		
	Crio	Ho crio	OCV'	Crio	Ho crio	OCV'	Crio	Ho crio	OCV'
Øtallo	0.80b	0.88a	6.02	2.47a	2.52a	2.46	2.71a	2.64a	0.04
Altura planta	8.10b	9.18a	6.74	42.57a	44.59a	3.77	110.84a	111.43a	0.97
No hojas	5.05b	5.31a	5.49	6.55a	6.68a	1.88	6.80a	6.88a	1.34
Largo hoja mayor	20.65b	24.63a	4.47	83.25a	84.78a	2.79	122.48a	119.78a	2.10
Ancho hoja mayor	14.65b	16.60a	3.08	44.03a	44.60a	2.01	55.33a	55.13a	0.36
Masa fresca planta	0.0924b	0.1326a	4.65	1.1304a	1.2216a	3.21	2.6025a	2.6338a	1.40
Masa seca planta	0.0020b	0.0029a	4.63	0.0466b	0.0503a	3.20	0.1282a	0.1329a	2.84

## B

Descriptores	20			30			40		
	Crio	Ho crio	OCV	Crio	Ho crio	OCV	Crio	Ho crio	OCV
Øtallo	0.63b	0.70a	1.43	1.88a	1.93a	2.05	2.52a	2.52a	0.47
Altura planta	7.83b	10.28a	5.81	57.95a	65.88a	5.65	143.13a	143.13a	3.04
No hojas	6.09b	6.68a	0.00	8.25a	8.38a	0.97	8.58a	8.73a	1.00
Largo hoja mayor	30.33b	38.38a	6.60	117.75a	120.13a	1.01	139.58a	140.00a	0.92
Ancho hoja mayor	14.23b	16.10a	5.45	33.68a	35.03a	1.42	43.55a	43.13a	0.08
Masa fresca planta	0.0916b	0.1391a	9.79	1.2410b	1.4890a	6.70	2.4795a	2.4893a	1.69
Masa seca planta	0.0017b	0.0026a	9.53	0.0546b	0.0710a	6.71	0.1414b	0.1660a	1.69

\* Coeficiente de variación total ("Overall coefficient of variation") = (Desviación estandar/Promedio)\* 100. Para calcular este coeficiente, se comparan los valores de las dos condiciones y se resta al mayor valor el menor.

\*\* Medias con letras iguales no tienen diferencias estadísticamente significativas (Prueba t,  $p > 0.05$ ,  $n = 40$ ). Solamente para el procesamiento estadístico, los datos de No hojas se transformaron según  $y' = \text{SQRT}(y)$

Conclusiones similares se obtienen al evaluar los valores calculados de OCV (Coeficiente de variación total) para cada descriptor. Este estadístico brinda información no solo de si dos juegos de datos tienen diferencias significativas, sino de la magnitud de esta diferencia. Cejas *et al.* (2012), al analizar diferentes parámetros bioquímicos,

proponen una clasificación en tres categorías para OCV. Basado en esta clasificación las diferencia mostradas en los descriptores morfológicos determinados en los tres momentos durante el desarrollo de las plantas en semillero (20, 30 y 40DDS) se clasifica como baja. No obstante, de forma general, se aprecia una disminución de OCV hacia los 40 DDS, lo que también sugiere que las diferencias pronunciadas en los valores de los descriptores en los estados iniciales entre las plántulas No crio y Crio tienden a desaparecer hacia finales de la fase de semillero.

#### **4.1.4. Comparación de los Índices de crecimiento entre los 20DDS y los 40DDS**

El crecimiento es un cambio cuantitativo que incluye aumentos en la longitud, en la masa seca y en la superficie. Estos incrementos pueden deberse a diferentes causas. El incremento en la longitud, al igual que el incremento en la superficie, es fundamentalmente producido por la acción de las sustancias de crecimiento que en última instancia se sintetizan mediante la fotosíntesis y la respiración. El incremento de la masa seca depende del balance existente entre la fotosíntesis y la respiración (Vázquez y Torres, 1995).

**Tabla 9:** Efecto de la técnica de conservación sobre los índices de crecimiento calculados entre los 20DD y los 40DDS, para las especies A: SS96 y B: NE43

<b>A</b>			
<b>Tratamiento</b>	<b><math>\Delta M</math></b>	<b>TAC</b>	<b>TRC</b>
<b>SS96 Crio</b>	0.1262a	0.0063a	0.0964a
<b>SS96 No crio</b>	0.1300a	0.0065a	0.0952a
<b>B</b>			
<b>Tratamiento</b>	<b><math>\Delta M</math></b>	<b>TAC</b>	<b>TRC</b>
<b>NE43 Crio</b>	0.1397b	0.0070b	0.0973 a
<b>NE43 No crio</b>	0.1633a	0.0082a	0.0967 a

\* Medias con letras iguales no tienen diferencias estadísticamente significativas (Prueba t,  $p > 0.05$ ,  $n = 40$ )

La producción de masa seca de la planta se puede expresar como el incremento de masa ( $\Delta M$ ) entre dos intervalos de tiempo, como la producción de masa seca por unidad de tiempo (Tasa absoluta de crecimiento, TAC) y como la producción por masa y por tiempo (Tasa relativa de crecimiento, TRC), entre otras formas (Vázquez y Torres,

1995). Las Tablas 8A y 8B muestran el valor de los Índices de crecimiento antes mencionados calculados para los diferentes tratamientos evaluados en el estudio.

Para la especie NE43 (Tabla 8B), tanto  $\Delta M$  como TAC muestran diferencias significativas al comparar las plántulas No crio con las Crio. Estas diferencias proponen un mayor incremento de masa y un mayor incremento de masa por unidad de tiempo para las plántulas No crio.

Ambos índices, aunque valiosos, tienen como limitante que no expresan la intensidad con que se produce el cambio en una forma correcta, pues en este caso sus valores dependen de la masa seca con que contaban las plantas a los 20DDS. Sin embargo, TRC sí permite una comparación efectiva en la intensidad de crecimiento entre plantas que difieren en su masa. A pesar de las diferencias antes citadas para esta especie en  $\Delta M$  y TAC entre las plantas No crio y Crio, los valores de TRC (Tabla 8B) se muestran estadísticamente semejantes. Tal resultado sugiere una intensidad de crecimiento similar para ambos tratamientos entre los 20DDS y los 40DDS, en concordancia con la tendencia de que al alcanzar los estadios finales de su desarrollo en semillero (40DDS) las diferencias en el crecimiento de las plántulas tienden a desaparecer. Similar razonamiento se puede aplicar a la especie SS96, a pesar de no existir diferencias significativas entre los Índices de crecimiento calculados (Tabla 8A)

Cejas *et al.*, (2012) estudiaron los efectos de la crioconservación sobre varios parámetros en la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Milagro Villaclareño. No observaron ningún cambio fenotípico al comparar las plantas originadas de semillas crioconservadas por dos semanas con las conservadas por igual periodo a 4 °C. Sin embargo, a nivel bioquímico observaron cambios como la disminución del contenido de proteínas y el aumento de la concentración de malondialdehído en el tallo, este último fuerte indicador del estrés oxidativo (Feng *et al.*, 2011; Tang, 2012). Además, detectaron una reducción de la concentración de los compuestos fenólicos en las raíces e identificaron a este órgano como el más afectado al comparar los diferentes parámetros bioquímicos.

Zevallos *et al.*, (2013) observaron a los cinco días de iniciado el ensayo un incremento en la germinación en semillas crioconservadas por dos semanas de la especie silvestre *Solanum lycopersicum* Mill. Estas diferencias se hacen no significativas a los siete días

de haber iniciado el ensayo. No obstante, los autores no proponen una explicación a tal comportamiento. Además, los propios autores observaron efectos significativos en los parámetros bioquímicos debido a la exposición al nitrógeno líquido en diferentes órganos de la planta, siendo más acentuados en la raíz.

En nuestro laboratorio, se observó una disminución del vigor de las semillas Crio al compararlas con las No crio (datos no publicados). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que las diferencias en el vigor mostradas durante el proceso de germinación pudieran ser la causa de las diferencias en los valores de los descriptores morfológicos a los 20DDS. Esta conclusión está en concordancia con los resultados de los índices de crecimiento, al no encontrarse diferencias significativas en la TRC, lo que supone una intensidad de crecimiento similar entre No crio y Crio de ambas especies, independientemente de que a los 20DDS el desarrollo de las plántulas de cada tratamiento fuera desigual.

En el caso particular del cultivo *in vitro*, el estrés producido por las temperaturas criogénicas a los explantes crioconservados puede afectar a las plantas regeneradas (Benson, 2008). Es así, que se hace necesario verificar que la estabilidad genética del material no ha sido alterada antes de usar la técnica para la conservación a largo plazo (Engelmann, 2011)

Existen muy pocos reportes de variación fenotípica debido a crioconservación de los explantes durante el cultivo *in vitro*. Fukai *et al.* (1994) reportaron alteraciones fenotípicas en la coloración de flores de Crisantemo después de la regeneración de 106 ápices crioconservados. De igual forma, Medina *et al.* (2007) encontraron diferencias en el rendimiento de frutos de fresa cuando estudiaron 50 plantas obtenidas de ápices crioconservados.

Para la crioconservación de semillas, esta es la primera vez según nuestro conocimiento que se reportan diferencias fenotípicas entre plantas obtenidas de semillas crioconservadas y no crioconservadas. Los estudios realizados hasta la fecha se centran en la determinación y análisis de parámetros bioquímicos y moleculares y no abordaban con profundidad la caracterización morfológica, aunque no dejan de reconocer la importancia de este tipo de caracterización, incluso sus ventajas (Cejas *et al.*, 2013). Otra de las causas de las diferencias fenotípicas observadas en este estudio,

contradictorio con lo reportado en la literatura, más allá de las propias de cada cultivo, pudieran estar relacionadas con el tiempo de exposición de las semillas al NL. Mientras que en otros estudios los tiempos de exposición no sobrepasan las dos semanas, en el nuestro fue de un año, lo cual trae consigo un mayor deterioro de las semillas conservadas bajo estas condiciones (Cejas *et al.*, 2012; Cejas *et al.*, 2013; Zevallos *et al.*, 2013).

#### 4.2. Efecto de la crioconservación sobre el desarrollo en fase de campo de plántulas de dos especies del género *Nicotiana* obtenidas a partir de semillas crioconservadas y conservas por el método convencional

Al igual que en la fase de semillero, en la fase de campo, se realizó una comparación morfológica entre plantas de SS96 y NE43 obtenidas de semillas crioconservadas y conservadas a 5 °C, en ambos casos por periodo de un año. Para ello se determinaron ocho descriptores cualitativos (Tabla 9) y 14 cuantitativos (Tabla 10), siguiendo la metodología descrita por Torrecilla *et al.* (2012)

**Tabla 10:** Descriptores morfológicos cualitativos determinados en la fase de campo para cada uno de los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Color de la flor	Forma de la corola	Forma del tubo de la corola	E/E*	Color de la hoja	Forma de la base de la hoja	Ond. de la hoja	Hábito de la planta
<b>SS96 Crio</b>	RB**	MS	PM	N	V	S	MO	E
<b>SS96 No crio</b>	RB	MS	PM	N	V	S	MO	E
<b>NE43 Crio</b>	B	S	NM	N	VO	S	MO	CI
<b>NE43 No crio</b>	B	S	NM	N	VO	S	MO	CI

\* E/E: Relación Estambre-Estigma

\*\*RB: rosado; B: Blanco; MS: Medianamente seccionada; S: Seccionada; PM: Poco manifiesto; NM: No manifiesto; N: Normal; V: Verde; VO: Verde oscuro; S: Sésil; MO: Medianamente ondulada; E: Elipsoidal; CI: Cónica inversa

Al igual que en la fase de semillero no se mostraron diferencias entre los descriptores cualitativos evaluados. Resultado similar se obtuvo al determinar los descriptores cuantitativos. Estos resultados están en concordancia con los resultados alcanzados en

la fase de semillero (ver 4.1), al mantenerse la tendencia de las diferencias encontradas en los estados iniciales en semillero (20DDS) desaparecer en los estadios finales de esa fase, al no mostrarse en la fase de planta adulta (campo).

**Tabla 11:** Descriptores morfológicos cuantitativos determinados en la fase de campo para cada uno de los tratamientos evaluados.

Órgano	Descriptor	SS96 Crio	SS96 No crio	NE43 Crio	NE43 No crio
Flor	Longitud (cm)	6.57 a	6.54 a	8.90 a	8.89 a
	Ancho (cm)	2.72 a	2.68 a	3.13 a	3.11 a
	DPF (días)*	62.18 a	61.23 a	50.88 a	49.63 a
Hoja	Largo (cm)	43.11 a	43.69 a	22.47 a	22.90 a
	Ancho (cm)	24.38 a	24.55 a	8.51 a	9.04 a
	Masa fresca (g)	103.14 a	106.23 a	8.67a	9.03a
	Masa seca (g)	14.08 a	14.10 a	1.18 a	1.14 a
Tallo	Diámetro (cm)	1.91 a	1.93 a	0.90 a	0.91 a
Cápsula	Largo (cm)	2.12 a	2.06 a	1.15 a	1.17 a
	Ancho (cm)	1.40 a	1.43 a	0.52 a	0.53 a
	Masa fresca (g)	3.72 a	3.83 a	0.52 a	0.50 a
	Masa seca (g)	1.10 a	1.12 a	0.20 a	0.19 a
Planta	Diámetro (cm)	75.82 a	76.30 a	59.74 a	59.87 a
	Altura (cm)	129.68 a	130.70 a	102.38 a	101.82 a

\* DPF: Días para florecer

\*\* Medias con letras iguales no tienen diferencias estadísticamente significativas (Prueba t,  $p > 0.05$ ,  $n = 40$ ). Solamente para el procesamiento estadístico, los datos de DPF se transformaron según  $y' = \text{SQRT}(y)$

Como conclusión, las plántulas obtenidas de semillas crioconservadas por un año mostraron retardo en el crecimiento al compararlas con las conservadas a 5 °C por igual periodo, aunque estas diferencias tienden a desaparecer hacia finales de la fase de semillero y ya no son perceptibles en la fase de campo. No obstante, no se pueden obviar las ventajas potenciales de la conservación a temperaturas cercanas a los -196 °C (ISTA. 2005). Bajo estas condiciones y almacenando las semillas en condiciones óptimas, se postulan longevidades extremadamente largas producto de una baja energía cinética molecular y una difusión extremadamente lenta, de forma tal que las reacciones químicas, relacionadas con el envejecimiento y el deterioro de las semillas (Mira *et al.*, 2010), se encuentren prácticamente paralizadas; (Pritchard, 1995).

La mayoría de las células de las plantas tienen elevada cantidad de agua y son sensibles al congelamiento. El contenido de agua es el factor que más afecta la viabilidad del germoplasma almacenado en NL (Kaviani, 2011). Por lo tanto, para utilizar la crioconservación como una herramienta que permita conservar el género *Nicotiana* a largo plazo, en futuros estudios debe ser evaluado el efecto del porcentaje de humedad en la longevidad de la semilla crioconservada.

En el contexto de la conservación de recursos fitogenéticos y desde el punto de vista agrónomo el efecto de la crioconservación sobre la viabilidad, vigor y estabilidad genética del material crioconservado debe ser comprobado, al elaborar una metodología o procedimiento para la crioconservación del género *Nicotiana*

#### **4.3. Valoración económica**

Las condiciones de almacenamiento en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco distan mucho de las normadas (ISTA 2005), las semillas se preservan a 5 °C y humedad relativa superior al 60 %. Tales condiciones de almacenamiento provocan una disminución en la longevidad de la semilla, por lo que los curadores del banco han tomado esquemas de regeneración de las semillas acordes a las condiciones de almacenamiento.

Los bancos de crioconservación de semillas ortodoxas constituyen una alternativa a los bancos de semillas convencionales. Una longevidad mayor de la semilla provoca un impacto directo en la reducción de los costos de almacenamiento del banco de germoplasma (Walters, 2003), sobre todo al ampliar los ciclos de regeneración, factor que influye de forma determinante (Pardey *et al.*, 2001).

En las Tablas 12, 13 y 14 se muestran los resultados que se podrían alcanzar de implementarse la crioconservación en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco. Para ello se tuvieron en cuenta los principales factores que inciden en los costos de mantenimiento actualmente y los determinantes en la forma de conservación futura. El ciclo de regeneración actual es de cinco años y el previsto, a partir de referencias en la literatura sobre longevidad de semillas crioconservadas del género *Nicotiana* (Walters *et al.*, 2004), sería de 20 años.



**Tabla 12:** Comparación de los gastos por concepto de Materias Primas y Materiales del banco de germoplasma y lo previsto para la crioconservación.

Materiales	UM	Precio		Cdad	En el banco (200 accesiones: 5500 plantas x año)		Cdad	Crioconservación (50 accesiones: 1750 plantas x año)	
		MN	CUC		Importe MN	Importe CUC		Importe MN	Importe CUC
Papel	Paq.	0.33	3.62	3	0.99	10.86	2	0.66	7.24
Posturas	millar	20.00	0.00	40	800.00	0.00	10	200.00	0.00
Fertilizantes	Kg	0.38	0.00	204	77.52	0.00	60	22.80	0.00
Pesticidas	Kg	8.20	0.00	2	16.40	0.00	1	8.20	0.00
Diesel	L	0.00	0.99	312	0.00	308.88	80	0.00	79.20
Bolsas de tela	u	3.44	0.48	1200	4128.00	576.00	300	1032.00	144.00
Nitrógeno Líquido	L	0.75	0.00	0	0.00	0.00	120	90.00	0.00
Electricidad	KW	0.21	0.00	1139	239.19	0.00	0	0.00	0.00
Papel de filtro	cajas	45.30	0.00	16	724.80	0.00	4	181.20	0.00
Tarjetas	u	0.20	0.00	2400	480.00	0.00	600	120.00	0.00
Cordel	rollos	30.00	0.00	1	30.00	0.00	0	0.00	0.00
Hilo de ensartar	rollos	18.00	0.00	1	18.00	0.00	0	0.00	0.00
<b>Total</b>					<b>6514.90</b>	<b>895.74</b>		<b>1654.86</b>	<b>230.44</b>

**Tabla 13:** Comparación de los gastos por concepto de salario y estimulación del banco de germoplasma y lo previsto para la crioconservación.

Clasificación ocupacional	Cantidad	En el banco		Crioconservación		
		MN	CUC	Cantidad	MN	CUC
Investigadores	3	14316.00	548.60	1	7320.00	280.51
Técnicos	4	10350.00	396.62	1	4500.00	172.44
Obreros agrícolas	3	13680.00	524.23	1	4560.00	174.74
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>38346.00</b>	<b>1469.45</b>	<b>3</b>	<b>16380.00</b>	<b>627.70</b>

**Tabla 14:** Comparación de los gastos totales del banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco y lo previsto para la crioconservación.

Técnica de Conservación	MN	CUC
En el banco	44860.90	2365.19
Crioconservación	18034.86	858.14
<b>Ahorro al crioconservar</b>	<b>26826.04</b>	<b>1507.05</b>

La reducción de gastos por los conceptos previstos, tanto en CUP como en CUC, para un año de funcionamiento del banco es apreciable (ver Tabla 14). Al implementar la criopreservación como método de conservación, la regeneración de las accesiones se reduciría de 200 por año hasta 50 por año, con el consecuente ahorro de productos químicos y materiales. Además, al reducir el número de plantas a sembrar en cada año disminuye considerablemente la mano de obra empleada (de 10 a 3) y por consiguiente, el salario.

**5. Conclusiones**

1. Las plántulas obtenidas a partir de semillas crioconservadas por un año sufrieron retardo en su crecimiento en los estadios iniciales de su desarrollo (20 y 30 DDS). Sin embargo, existe una tendencia a que tales diferencias dejen de ser significativas hacia finales de la fase de semillero (40 DDS).
2. No se apreciaron diferencias significativas en la fase de campo al comparar morfológicamente plantas de SS96 y NE43 obtenidas a partir de semillas crioconservadas y conservas por el método convencional

**6. Recomendaciones**

1. Establecer procedimientos en la semillas de *Nicotiana* que permitan reducir la afectación por las bajas temperaturas propias de la crioconservación y aumentar su longevidad.
2. Estimar la integridad genética de semillas crioconservadas utilizando Marcadores moleculares de ADN.

### 3. Bibliografía

- Anjum, S. A.; X. Xie; L. Wang; M. F. Saleem; C. Man and W. Lei. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9): 2026-2032, 2011.
- Allendorf F. W.; L. Gordon and Sally N. Aitken: Conservation and the genetics of populations. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 2013, p. 587
- Apple, J.L. Transfer of resistance to black shank (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* from *Nicotiana plumbaginifolia* to *Nicotiana tabacum*. *Phytopatology*, 52(1): 351-354, 1962.
- Bacchetta G.; A. Bueno; G. Fenu; B. Jiménez-Alfaro; E. Mattana; B. Piotto y M. Virevaire (eds). Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias / La Caixa. 378 pp. 2008.
- Bailly C.; H. El-Maarouf-Bouteau y F. Corbineau. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biologies*. 331: 806–814. 2008.
- Benson, Erica. “Cryopreservation of Phytodiversity: A Critical Appraisal of Theory & Practice,” *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27(3): 141-219, 2008.
- Buitink, J. y O. Leprince. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state, *Cryobiology*. 48: 215–228. 2004.
- Buitink, Julia.; O. Leprince; M. A. Hemminga y F. A. Hoekstra. Molecular mobility in the cytoplasm: an approach to describe and predict lifespan of dry germplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97(5): 2385–2390. 2000.
- Cejas, Inaudis; K. Vives; T. Laudat; J. González-Olmedo; F. Engelmann, M. E. Martínez-Montero y J. C. Lorenzo. Effects of Cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. Seeds on Early Stages of Germination, *Plant Cell Reports*, 31(11), 2065-2073. 2012.
- Cejas, Inaudis; R. Méndez; A. Villalobos; F. Palau; C. Aragón; F. Engelmann; D. Carputo; R. Aversano; M. E. Martínez y J. C. Lorenzo. Phenotypic and Molecular Characterization of *Phaseolus vulgaris* Plants from Non-Cryopreserved and Cryopreserved Seeds. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 844-849, 2013.

- Chacón, O.; I. Hernández; R. Portieles; Y. López; M. Pujol y O. Borrás-Hidalgo. Identification of defense-related genes in tobacco responding to black shank disease. *Plant Science*, 177 (3): 175-180, 2009.
- Clarkson, J. J. ; K. Y. Lim; A. Kovarik; M. W. Chase; Sandra Knapp y A. R. Leitch. Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (Solanaceae). *New Phytologist*, 168: 241–252, 2005.
- Dadejová, M.; K. Y. Lim; K. Soucková-Skalická; R. Matyášek; M. A. Grandbastien; A. Leitch y A. Kovařík. Transcription activity of rRNA genes correlates with a tendency towards intergenomic homogenization in *Nicotiana* allotetraploids. *New Phytologist*, 174: 658–668, 2007.
- Delon, R.; C. Poisson; J. C. Bardon y P. Taillurat. Les Nicotianées en Collection à L'Institut du Tabac de Bergerac. 3ra ed., 83, Ed. Seita, Bergerac, Francia, 1999.
- Ellis R. H.; T. D. Hong; E. H. Roberts y K. L. TAO. Low moisture limits to relations between seed longevity and moisture. *Annals of Botany*, 65: 493-504. 1990.
- Engelmann, F. Use of Biotechnologies for the Conservation of Plant Biodiversity, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41(7):5-16. 2011.
- Engelmann, F. y V. Ramanatha Rao. Major research challenges and directions for future research. In: Conservation of tropical plant species. Springer, Berlin, Germany, 2012. (in press)
- Engels, J. M. M. y L. Visser, (eds). Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma. Manuales para Banco de Germoplasmas No. 6. Bioversity Internacional, Roma, Italia. 2007.
- Espino, E. Guía para el cultivo del tabaco. Ed. AGRINFOR, Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 17-46, 2009.
- FAO. 2009. Conferencia del Director General de la FAO, 19 de Junio 2009. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/fileadmin/>. (Consultado: 20 de Junio, 2009).
- Fischer, R.; E. Stoger; S. Schillberg; P. Christou y R. M. Twyman. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 7:152–158. 2004.
- Frankham, R; Ballou, J.D. y Briscoe, D.A. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 100 pp. 2003.

- Fukai, S.; M. Goi y M. Tanaka, "The Chimeric Structure of the Apical Dome of Chrysanthemum (*Dendran-thema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) Is Affected by Cryopreservation," *Scientia Horticulturae*, 57(4): 347-351, 1994.
- Gepts, P. Plant Genetic Resources Conservation and Utilization: The Accomplishments and Future of a Societal Insurance Policy. *Crop Sci*, 46: 2278–2292. 2006.
- Gómez-Campo, C. A strategy for seed banking in botanic gardens: some policy considerations. En: *Botanic Gardens and the World Conservation Strategy*. Academic Press, London, pp. 151-160. 1987.
- González-Benito, María Elena; J. M. Iriondo y F. Pérez-García, Seed cryopreservation: an alternative method for the conservation of Spanish endemics. *Seed Science and Technology*. 26: 257-262. 1998.
- Guerrant, E. O. ; K. Havens y M. Maunder. *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Island Press, Washington, U.S.A, 2004.
- Hidalgo, R. Conservación *ex situ*. Técnicas para el manejo y uso de los recursos genéticos vegetales. Instituto Nacional de Investigaciones agropecuarias. Ecuador, 71-87, 1991.
- Hidalgo, R. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. Instituto Nacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia, Boletín técnico No.8, 2-26, 2003.
- Horn, M. E. ; S. L. Woodard y J. A. Howard. Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Rep.*, 22:711– 720, 2004.
- Hunter, D. Adaptación al cambio global. En: *Parientes silvestres de los cultivos: manual para la conservación in situ*. Hunter D y V Heywood, eds. Bioersivity International, Roma, Italia. 381-402. 2011.
- Iriondo J. .M. y C. Pérez,. Propagation from Seeds and Seed Preservation. En: *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 46-57. 1999.
- Iriondo, J. M. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 6 (1):5-22. 2001.
- ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Edición 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza.

- Jaramillo, S y M. Baena. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de recursos filogenéticos. Instituto Internacional de recursos Filogenéticos, 7 -10, Cali, Colombia, 2000.
- Johnson, R. A. y G. K. Bhattacharyya. Statistics: Principles and Methods (Sixth edition). John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, USA, 686p, 2010.
- Justice O. L. y L. N. Bass. Principles and practices of seed storage. USDA Handb. 506. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 289 pp. 1978.
- Khoury, C.; Brigitte Laliberte y L. Guarino. Trends in *ex situ* conservation of plant genetic resources: a review of global crop and regional conservation strategies. *Genet Resour Crop Evol*, 57:625–639. 2010
- Lobo, M. y Clara I. Medina. Conservación de recursos genéticos de la agrobiodiversidad como apoyo al desarrollo de sistemas de producción sostenibles. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 10(1), 33-42. 2009.
- Marí, J. A. y L. N. Hondal. El cultivo del tabaco en Cuba. Ed. Pueblo y Educación, 36, 1984.
- Medina, J. J. ; I. Clavero-Ramírez; María Elena González-Benito, J. Gálvez-Farfán, J. M. López-Aranda and C. Soria. Field Performance Characterization of Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) Plants Derived from Cryopre-served Apices. *Scientia Horticulturae*, 113(1): 28-32. 2007.
- MINAG, 1988. Ministerio de la Agricultura, Dirección Nacional de Tabaco. Instructivo técnico del cultivo del Tabaco, t.2, CIDA. La Habana.
- Murphy, J. P. ; T. S. Cox; R. C. Ruffy y D. M. Rodgers. A representation of the pedigree relationships among flue-cured tobacco cultivars. *Tob. Sci.*, 31:70–75, 1987.
- Nodari, R. O. y D. F. Tomás: Agroviodiversidad y desarrollo sostenible: la conservación *in situ* puede asegurar la seguridad alimentaria. *Biocenosis*, 24: 21-29, 2011.
- Olby, R. C. Origins of Mendelism. Schocken Books, New York, 1966.
- Pardey, P. G. ; B. Koo; B. D. Wright; M. E. van Dusen; B. Akovm y S. Taba. Costing the *ex situ* conservation of genetic resources: maize and wheat at CIMMYT. *Crop Science*. 41(4): 1286-1299. 2001.
- Pérez, E.; H. García; M. Castro; N. Reyes; A. Rojas; X. Xiqués y C. González. Caracterización morfoagronómica, citogenéticas y genético-bioquímicas de híbridos



interespecíficos de *Nicotiana tabacum* L. x *Nicotiana megalosiphon* Heurck y Mueller. III Congreso Venezolano de Mejoramiento Genético y Biotecnología Agrícola, Venezuela, 2008

Pritchard H. W. Cryopreservation of Seeds. En: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 38. J. G. Day and M. R. McLellan, (eds.). Humana Press Inc., Totowa, NJ, 133-144. 1995.

Pritchard, H. W.; S. Ashmore; P. Berjak; F. Engelmann; María Elena González-Benito; D. Z. Li; J. Nadarajan; B. Panis; V. Pence y Christina Walters. Storage stability and the biophysics of preservation. En: *Proceedings of Plant conservation for the next decade: a celebration of Kew's 250th anniversary*, Royal Botanic Garden Kew, London, UK, 2009.

Pujol, M. y R. Valdés. Desarrollo y empleo a escala industrial de una tecnología para la producción del anticuerpo monoclonal recombinante CB Hep 1 a partir de plantas. 2006.

<http://www.academiaciencias.cu/paginas/presentacion/reconocimientos/premios.asp?idp=1119&nsecc=Ciencias%20Biom%E9dicas>. (consultado 12/11/2011).

Rao, N. K. ; J. Hanson; M. E. Dulloo; K. Ghosh; D. Novell y M. Larinde. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. *Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8*. Bioversity International, Roma, Italia. 165 pp. 2007.

Scholthof, K. B. G. Tobacco Mosaic Virus: A Model System for Plant Biology. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42: 13-34, 2004.

Sevilla, R y M. Holle. Recursos genéticos vegetales. 1ra edición. Ediciones Torre Azul SAC. Perú. 445 p. 2004.

Sheen, S. J. Genetic engineering with tobacco protoplasts. Sixth International Tobacco Science Congress proceedings, Tokyo, 75-80. 1977.

Siva Raju, K.; M. S. Madhav; R. K. Sharma; T. G. K Murthy y T. Mohapatra. Genetic polymorphism of Indian tobacco types as revealed by amplified fragment length polymorphism. *Curr. Sci*, 94 (5): 633-639. 2008.

Siva Raju, K., M. Sheshumadhav, C. Chandrasekhararao and T. G. K. Murphy. Molecular diversity in genus *Nicotiana* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA. *Indian Journal of Biotechnology*, 8:61-66, 2009.

- Stanwood, P. C. y L. N. Bass. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Science and Technology*. 9: 423-437.1981.
- Stubbe, H. History of genetics from prehistoric times to The rediscovery of Mendel,s laws. Massachusetts Institute of Technology Press, Cambridge, 1965
- Torrecilla, G. El banco de germoplasma, una garantía para la conservación del género *Nicotiana*. *Tobacco Irrigation*. 2(1): 17-18, 2011.
- Torrecilla, G. Informe anual de proyecto. Instituto de Investigaciones del Tabaco. 2013
- Torrecilla, G; Mileidy Cabrera y J. L Pérez-Rodríguez Principales descriptores para la caracterización morfoagronómica del género *Nicotiana*. *CUBATABACO*, 13(2): 23-32. 2012.
- Touchell, D. H. y K. W. Dixon. Cryopreservation for seedbanking of Australian species. *Annals of Botany*, 74: 541-546, 1994.
- Valdés, M. I. Caracterización de la variabilidad genética en una colección de especies del Banco de Germoplasma del género *Nicotiana L.* en Cuba. Tesis en opción del grado científico de doctor en ciencias biológicas. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, 2010.
- Valdés, M. I.; Y. Hernández; A. Vázquez; D. Piñeiro y L. González-Pérez. Diversidad genética de especies silvestres del género *Nicotiana* II: Caracterización molecular mediante marcadores RAPD. *Protección Vegetal*, 25(3): 166-173, 2010.
- van Treuren, R.; E. C. de Groot y T. J. L. van Hintum. Preservation of seed viability during 25 years of storage under standard genebank conditions. *Genet Resour Crop Evol*, 60:1407–1421.2013
- Vázquez, Edith y S. Torres. Fisiología vegetal. López, R. (ed). Editorial Pueblo y Educación. 452p. 1995
- Vertucci Christina y E. E. Roos. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology* 94:1019-1023. 1990.
- Vertucci Christina y E. E. Roos. Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperatura on optimal moisture levels. *Seed Science Research*, 3: 201-213. 1993.
- Walters Christina; D. Ballesteros, y V. A. Vertucci. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. *Plant Science*, 179: 565–573, 2010.

- Walters, Christina. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci. Res.* 8: 223–244. 1998.
- Walters, Christina; L. Wheeler y P. C. Stanwood. Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology*, 48: 229–244. 2004.
- Zevallos, B.; Inaudis Cejas; R. C. Rodríguez; Lourdes Yabor; C. Aragón; J. González; F. Engelmann; M. E. Martínez y J. C. Lorenzo. Biochemical characterization of Ecuadorian wild *Solanum lycopersicum* Mill. Plants produced from non-cryopreserved and cryopreserved seeds. *CryoLetters*, 34 (4): 413-421. 2013.
- Zhang, H. Y.; X. Z. Liu; C. S. He y Y.M. Yang. Genetic Diversity among flue-cured tobacco cultivars based on RAPD and AFLP markers. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 51(6): 1097-1101. 2008.