



**UNIVERSIDAD DE SANCTI SPÍRITUS**

**"JOSÉ MARTÍ PÉREZ"**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA**



**EFFECTO DE LA CRIOCONSERVACIÓN SOBRE LA GERMINACIÓN DE  
SEMILLAS DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO *NICOTIANA***

**TRABAJO DE DIPLOMA**

**Autor:** Pedro Rubén Concepción Arteaga

**Tutor:** Lic. Juan Luis Pérez Rodríguez

**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 Spíritus 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, las semillas de ambas especies se sometieron a los ensayos de germinación. Las semillas de SS96 crioconservadas tuvieron similar Potencia germinativa (PG) que las de la misma especie conservadas a 5<sup>0</sup>C. Sin embargo, las semillas de NE43 crioconservadas tuvieron PG significativamente superior a las conservadas a 5<sup>0</sup>C; comportamiento asociado al rompimiento de la dormición ocasionado por la exposición al NL. Así mismo, las semillas de SS96 conservadas a 5<sup>0</sup>C presentaron mayor vigor que las de la misma especie crioconservadas por igual periodo. De igual forma, las semillas de NE43 conservadas a 5<sup>0</sup>C, a pesar de tener menor PG, germinaron con mayor vigor que las de la misma especie crioconservadas. Tales resultados sugieren que las semillas crioconservadas de ambas especies sufren mayores daños en el almacenamiento que las conservadas a 5<sup>0</sup>C. Este deterioro pudiera estar dado por las condiciones con que fueron almacenadas las semillas.

**Palabras claves:** *Nicotiana*, crioconservación, vigor, germinación, dormancia.

## **Abstract**

This work has as objective to determine the effect of cryopreservation on the vigor and germination power of seeds of two species of the *Nicotiana* genus; *Nicotiana tabacum* cv Linnaeus Sancti Spiritus 96 (SS96) and *Nicotiana megalosiphon* Heurck & Mueller (NE43). 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. After this period, the seeds of both species were subjected to germination tests. SS96 seeds cryopreserved were similarly PG that the same species stored at 5<sup>0</sup>C. However, those of cryopreserved NE43 had PG significantly higher than maintained at 5<sup>0</sup>C; behavior associated with the breaking of dormancy caused by exposure to LN. Likewise, SS96 seeds stored at 5<sup>0</sup>C showed greater vigor than the same species cryopreserved for the

same period. Similarly, NE43 seeds stored at 5 °C, despite having lower PG, germinated more vigorously than those of the same species cryopreserved. Such results suggest that cryopreserved seeds of both species suffer greater damage than the storage conserved at 5 °C. This deterioration could be given by the conditions that were stored seeds.

**Keywords:** *Nicotiana*, cryopreservation, vigor, germination, dormancy.

## Introducción

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
PROBLEMA CIENTÍFICO	2
HIPÓTESIS	2
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
<b>2. Revisión Bibliográfica</b>	<b>4</b>
2.1. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DEL GÉNERO <i>NICOTIANA</i>	4
2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	4
2.3. IMPORTANCIA DEL GENERO <i>NICOTIANA</i>	5
2.4. RECURSOS FITOGENÉTICOS	7
2.5. MODALIDADES DE LA CONSERVACIÓN	8
2.5.1. <i>Conservación in situ</i>	8
2.5.2. <i>Conservación ex situ</i>	9
2.6. BANCOS DE GERMOPLASMAS	9
2.6.1. <i>Bancos de semillas</i>	10
2.7. LA SEMILLA	11
2.7.1. <i>Clasificación de las semillas</i>	12
2.7.2. <i>Fases de la germinación</i>	13
2.7.3. <i>Factores que afectan la germinación</i>	14
2.7.4. <i>Dormancia o latencia de las semillas</i>	16
2.8. CRIOCONSERVACIÓN DE SEMILLAS ORTODOXAS	17
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>20</b>
3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO Y ESPECIES SELECCIONADAS	20
3.2. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA SEMILLA	20
3.3. CONSERVACIÓN	20
3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS SEMILLAS	21
3.5. ENSAYOS DE GERMINACIÓN	21
3.5.1. <i>Potencia germinativa (PG)</i>	21
3.5.2. <i>Tiempo medio de germinación (TMG)</i>	22
3.5.3. <i>Velocidad de germinación (T<sub>50</sub>)</i>	22
3.5.4. <i>Valor Pico (VP)</i>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.5.5. <i>Valor de Germinación Media Diaria (GMD)</i>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.5.6. <i>Vigor de germinación (VG)</i>	22
3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	23
<b>4. Resultados y Discusión</b>	<b>24</b>
4.1. EFECTO DE LA TÉCNICA DE CONSERVACIÓN SOBRE EL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN ACUMULADO POR DÍAS (PGA) Y EL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN (PG)	24
4.2. EFECTO DE LA TÉCNICA DE CONSERVACIÓN SOBRE PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL VIGOR DE LAS SEMILLAS	26
4.2.1. <i>Análisis de estadísticos simples</i>	26
4.2.2. <i>Análisis gráfico de la cantidad de semillas germinadas por día</i>	28
4.2.3. <i>Análisis de parámetros relacionados con el vigor de las semillas</i>	29
4.3. VALORACIÓN ECONÓMICA	32
<b>5. Conclusiones</b>	<b>35</b>

*Introducción*

<b>6. Recomendaciones .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>37</b>

## **1. Introducción**

La estrategia de crear bancos de germoplasma ha permitido conservar el patrimonio genético vegetal y, por tanto, la variabilidad genética de cada especie y género, lo que constituye fundamento esencial de los programas de mejoramiento genético y de selección de genotipos (Hidalgo, 2003). En Cuba, 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.*, 2009).

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. Los resultados obtenidos en diferentes trabajos indican que la criopreservación puede ser utilizada en semillas de numerosas plantas cultivadas (Stanwood, 1981), incluyendo *Nicotiana tabacum* L. (Walters *et al.*, 2004).

Las técnicas de criopreservación 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 (Pritchard, 1995); bajo estas condiciones, se postulan longevidades extremadamente largas.

Los bancos de criopreservación de semillas ortodoxas constituyen una alternativa a los bancos de semillas convencionales. No obstante, la influencia de numerosos factores debe ser evaluada antes de utilizar la criopreservación como estrategia segura para almacenar semillas del género *Nicotiana*. (Walters *et al.*, 2004). En el marco de una metodología para la criopreservación de semillas de especies del género *Nicotiana* es necesario evaluar los daños provocados por la exposición a temperaturas criogénicas y su influencia en los procesos de germinación y desarrollo de las plantas regeneradas (Harding, 2004).

Las bajas temperaturas inducen estrés oxidativo a través de la formación de radicales libres los que pueden dañar en plantas susceptibles a las bajas temperaturas las membranas celulares y perturbar la conformación de las diferentes macromoléculas,

entre ellas el ADN (Dietz, 2003). La habilidad de las células de la planta para sobrevivir bajo estas condiciones dependen de su capacidad de incrementar la actividad de su sistema antioxidante (Revilla *et al.*, 2005).

Una vía para evaluar la estabilidad genética y fenotípica podría ser la regeneración, a partir del germoplasma crioconservado, de plantas de calidad lo que confirmaría que las muestras pueden almacenarse bajo estas condiciones (Berjak *et al.*, 2011). Los daños a nivel de genoma afectan al fenotipo, aunque las plantas están sujetas a mutaciones y/o deleciones en regiones no codificantes que pueden ser indetectables fenotípicamente (Harding, 2004; Engelmann y Rao, 2012).

Engelmann (2009), realizó estudios de estabilidad genética en relación con la crioconservación con material cultivado *in vitro* y no observó modificaciones a nivel fenotípico que pudieran ser atribuidas a esta técnica de conservación. En trabajos recientes Cejas *et al.*, (2012), en semillas de *Phaseolus vulgaris* L, durante los estados iniciales de la germinación, no observaron cambios fenotípicos visibles en plántulas obtenidas a partir de semillas crioconservadas. Sin embargo, encontraron un decrecimiento en el contenido de proteínas y fenoles y un incremento del contenido de aldehídos en el tallo y un decrecimiento del contenido de fenoles en las raíces. No obstante, apreciaron que los efectos de la crioconservación de la semilla disminuían con el crecimiento de la plántula.

### **Problema científico**

¿Qué efecto tiene la crioconservación sobre la germinación de semillas de dos especies del género *Nicotiana*?

### **Hipótesis**

Si se calculan diferentes parámetros fisiológicos relacionados con el proceso de germinación en semillas de dos especies del género *Nicotiana* crioconservadas y conservadas por el método convencional entonces se puede determinar el efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de ambas especies.

**Objetivo general**

Determinar el efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de dos especies del género *Nicotiana*.

**Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de la crioconservación sobre la Potencia germinativa y el Porcentaje de germinación acumulado en semillas de dos especies del género *Nicotiana*.
2. Determinar el efecto de la crioconservación sobre el vigor de semillas de dos especies del genero *Nicotiana*.

## **2. Revisión Bibliográfica**

### **2.1. Origen y evolución del género *Nicotiana***

El intercambio de genes entre especies, la anfiploidización de híbridos interespecíficos a nivel de género, sección y especie, así como la diferenciación genética al azar debido al aislamiento geográfico y las mutaciones espontáneas, tuvieron un papel importante en la evolución del género *Nicotiana* (Goodspeed, 1954).

Con base en las consideraciones de la deriva continental y la distribución natural de las especies, Uchimaya *et al.* (1977) propusieron que el género se originó aproximadamente 75 a 100 millones de años atrás en el este andino, de donde se dispersaron rápidamente a toda América del Sur, ocupando incluso la costa oeste de los Andes, Centro América, las islas del Caribe, América del Norte, Australia y África. Aproximadamente el 75% de las especies habitan en las Américas y el 25% de ellas viven en Australia, exceptuando la *Nicotiana africana* Merxmüller y Buttler, que es la única de África. Esta especie y las especies australianas de la sección Suaveolentes probablemente llegaron a sus respectivos continentes hace relativamente poco tiempo (Chase *et al.*, 2003).

### **2.2. Clasificación taxonómica**

*Nicotiana*, género nombrado en honor del diplomático francés Jean Nicot, quien llevó plantas a Francia desde Portugal en 1559, cuenta con 76 especies descritas hasta la actualidad y es el quinto más grande en la familia Solanáceas (Knapp *et al.*, 2004).

La primera aproximación de la clasificación actual del género *Nicotiana* la realizó Linnaeus (1753), quién describió algunas especies, pero no fue hasta que Lehmann (1818) le da el tratamiento de género, al incluir en éste 21 especies, entre las que se encontraban las descubiertas en Australia.

Goodspeed (1954) proporciona una investigación detallada de la taxonomía del género, en el que considera como evidencia la morfología, citología, biogeografía, y experimentos de cruzamiento y propone la división de las 60 especies descubiertas hasta esa fecha en 3 subgéneros y 14 secciones. Knapp *et al.* (2004) presentaron una nueva clasificación taxonómica basada en la sistemática del grupo y los resultados de estudios realizados en el genoma nuclear y plastídico de las especies. Además, se

consideraron los requerimientos del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (Greuter *et al.*, 2000) y se adicionaron las especies descubiertas hasta esa fecha (Burbigge, 1961; Ohashi, 1976; Merxmüller y Buttler, 1975; Clarkson y Symon, 1991).

### **2.3. Importancia del género *Nicotiana***

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, 1997). Entre los mayores productores mundiales se encuentra China con (3 210 000 T), Estados Unidos (688 000 T), India (563 000 T), Zimbabwe (215 000 T) e Italia (104 000 T), atendiendo a volúmenes de producción FAO (2009). Cuba, aunque no está considerada entre los primeros productores, 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).

Los cruzamientos interespecíficos han sido utilizados fundamentalmente como una vía para transferir genes de resistencia a las variedades comerciales (Pérez *et al.*, 2008; Mena *et al.*, 2011). Por lo tanto, la importancia de identificar en las especies 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* Linnaeus, *Nicotiana excelsior* Black y *Nicotiana velutina* Wheeler (Valdés *et al.*, 2010). 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 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. Así, 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* (Valdés, 2010). 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 (Japan Tobacco International, 1994).

En los últimos años se ha incrementado el interés en la variabilidad genética que existe en *Nicotiana* (Opperman *et al.*, 2006). El uso de especies del género como bio reactores 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 (Daniell *et al.*, 2001; Horn *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2004).

La nicotina es un alcaloide encontrado en plantas de la familia Solanaceae, especialmente en el género *Nicotiana*, con alta concentración en sus hojas. Constituye hasta cerca del 8 % del peso de la planta en especies como *N. rústica* (Marí y Hondal, 1984). Las propiedades insecticidas de este alcaloide se han comprobado contra la mayoría de los tipos de insectos plagas, pero se usa particularmente para áfidos y orugas. (Silva *et al.*, 2002).

Se ha reportado la actividad antimicrobiana y antifúngica de extractos obtenidos de hojas y flores de las especies. Hojas de *N. paniculata*, en forma de ungüento, se usan como frotación para dolores articulares y reumáticos (Del Pino, 2008). Hojas frescas de *N. glauca* se aplican externamente en tratamiento de dolores de cabeza, cataplasmas en dolores reumáticos, heridas y úlceras, baños de asiento en hemorragias y dolores abdominales. Esta especie no tiene nicotina, posee anabasina, un alcaloide relacionado y se está investigando como posible cura para la adicción a la nicotina. Restos de sus hojas se han encontrado en los sitios arqueológicos correspondientes a la cultura de Nazca (Murphy *et al.*, 2006).

#### **2.4. 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 (Dodds, 1991; Maxted *et al.*, 1997; Zevallo *et al.*, 2013). 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 significa, 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).

## **2.5. Modalidades de la conservación**

### **2.5.1. 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 (Gómez-Campo, 1985; Bacchetta *et al.*, 2008; Nodari y Tomás, 2011). 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 (UNCED, 1992).

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).

### **2.5.2. 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)

### **2.6. 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 (Witt, 1985). 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).

### **2.6.1. 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 (Reid y Miller, 1989; 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)

### **2.7. La semilla**

La semilla es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores. Ésta desempeña una función fundamental en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas, regeneración de los bosques y sucesión ecológica (Rao *et al.*, 2007). Las semillas pueden almacenarse vivas por largos períodos, asegurándose así la preservación de especies y variedades de plantas valiosas (Walters, 2004; van Treuren *et al.*, 2013).

La semilla es una unidad reproductiva compleja, característica de las plantas vasculares superiores, que se forma a partir del óvulo vegetal, generalmente después de la fertilización (Camacho, 1994). Para que la semilla cumpla con su objetivo, es necesario que el embrión se transforme en una plántula, que sea capaz de valerse por sí misma y finalmente convertirse en una planta adulta. Todo ello comprende una serie de procesos metabólicos y morfo genéticos, cuyo resultado final es la germinación de la semilla. La germinación es el reinicio del crecimiento del embrión, paralizado durante las fases finales de la maduración. Los procesos fisiológicos de crecimiento exigen actividades metabólicas aceleradas y la fase inicial de la germinación consiste primariamente en la activación de los procesos por aumento en la humedad y actividad respiratoria de la semilla (Doria, 2010).

La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos que incluye la respiración, síntesis proteica y movilización de reservas. A

su vez, la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la rotura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula (Finch-savage y Leubner-Metzger, 2006). Sin embargo, las semillas de muchas especies son incapaces de germinar, aun cuando presentan condiciones favorables para ello, lo cual se debe a que se encuentran en estado de latencia o dormancia (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008). Por ello, mientras no se den las condiciones adecuadas para la germinación, la semilla se encontrará en estado latente durante un tiempo variable, dependiendo de la especie, hasta que en un momento dado pierda su capacidad de germinar (Chong *et al.*, 2002; Copete *et al.*, 2011).

### **2.7.1. Clasificación de las semillas**

Todas las semillas difieren en su tolerancia a la desecación que sigue tras su diseminación. Según este parámetro, las semillas se pueden clasificar en ortodoxas, recalcitrantes e intermedias. Las semillas ortodoxas toleran una deshidratación hasta de 5% en el contenido de humedad; por su parte, las semillas que toleran la deshidratación entre 10% y 12,5% de contenido de humedad se consideran intermedias y las que toleran la deshidratación entre 15% y 50% de humedad se denominan recalcitrantes (Rao *et al.*, 2007).

#### **2.7.1.1. Semillas ortodoxas**

La principal característica fisiológica de las semillas ortodoxas es su gran tolerancia a la deshidratación. Su fase final de maduración está acompañada por deshidratación celular, la cual inicia con la pérdida del suministro vascular de agua de la planta madre a la semilla (Bewley y Black, 1994). En este período las semillas adquieren la tolerancia para ceder a la deshidratación, característica que mejora su viabilidad y el potencial de almacenamiento (Bacchetta *et al.*, 2008). Por tratarse de un método práctico y económico, el almacenamiento de semillas ortodoxas es el preferido para conservar el 90% de los seis millones de accesiones mantenidos en colecciones *ex situ* en todo el mundo. La mayoría de las especies cultivables, incluyendo *N. tabacum* (Walters, 2004), las especies forrajeras, y muchas especies arbóreas producen este tipo de semilla (Rao *et al.*, 2007).

### **2.7.1.2. Semillas recalcitrantes**

Las semillas recalcitrantes no experimentan deshidratación en la planta madre y, sin detener su desarrollo, pasan directamente a la germinación, aun cuando ocurren algunos casos de latencia (Berjak y Pammenter, 2004). Al contrario de las semillas ortodoxas, las semillas recalcitrantes se diseminan en una condición húmeda y metabólicamente activa (Leprince *et al.*, 1993), perdiendo rápidamente su capacidad de germinación al quedar expuestas a condiciones de baja humedad. Adicionalmente, muchas semillas recalcitrantes de origen tropical son sensibles al frío y no pueden ser almacenadas a temperaturas inferiores a 15°C. La sensibilidad a la deshidratación y a temperaturas bajas prolongadas implica limitaciones graves para el almacenamiento comercial a largo plazo de las semilla recalcitrantes (Berjak *et al.*, 2011).

### **2.7.1.3. Semillas intermedias**

Algunas especies, como la palma datilera silvestre *Phoenix reclinata* (Berjack y Pammenter, 2004) producen semillas con características intermedias entre ortodoxas y recalcitrantes (Leprince *et al.*, 1993). La habilidad para germinar de estas semillas depende del grado de tolerancia a la pérdida de agua, al tiempo y las condiciones de almacenamiento (Berjak y Pammenter, 2004). Entre los cultivos indicativos con semillas que pueden presentar conducta de almacenamiento intermedio se encuentra el ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) y *Coffea sp.* (Eira *et al.*, 2006).

## **2.7.2. Fases de la germinación.**

Comprende tres etapas sucesivas que se superponen parcialmente (Koornneef *et al.*, 2002). Las fases son:

*Hidratación:* La absorción de agua es el primer paso para la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria.

*Germinación:* Representa el verdadero proceso en el que se producen las transformaciones metabólicas necesarias para el completo desarrollo de la plántula. En

esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse.

*Crecimiento*: es la última fase de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria.

La duración de cada una de estas fases depende de ciertas propiedades de las semillas: su contenido de compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y oxígeno y a las condiciones del medio, tales como el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, entre otros (Doria, 2010):

Para que la germinación ocurra, deben satisfacerse determinadas condiciones. La semilla debe ser viable, las condiciones ambientales para la germinación deben ser favorables: agua, temperatura, oxígeno y luz, la semilla debe estar libre de dormancia y las condiciones de sanidad deben ser satisfactorias (ausencia de agentes patógenos) (Baskin y Baskin, 2001).

### **2.7.3. Factores que afectan la germinación.**

Se dividen en dos tipos; factores internos y factores externos (Doria, 2010):

#### Factores internos

*Madurez de la semilla*: Cuando ha alcanzado su completo desarrollo tanto desde el punto de vista morfológico como fisiológico. La madurez morfológica se consigue cuando las distintas estructuras de las semillas se han completado, dándose por finalizada cuando el embrión ha alcanzado su máximo desarrollo. Aunque la semilla sea morfológicamente madura, muchas de ellas pueden seguir siendo incapaces de germinar, porque necesitan experimentar aún una serie de transformaciones fisiológicas (Alzugaray *et al.*, 2007).

*Viabilidad de la semilla*: Es el período de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar. Es un período variable y depende del tipo de semilla y las condiciones de almacenamiento. Puede haber semillas que germinen después de decenas o centenas de años (Roos, 1986). Una semilla será más longeva cuando menos activo sea su metabolismo en las condiciones de almacenamiento. Esto a su vez

origina una serie de productos tóxicos, que al acumularse en las semillas produce efectos letales para el embrión (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008).

### Factores externos.

*Humedad:* la absorción de agua es el primer paso y el más importante que tiene lugar durante la germinación, porque para que la semilla recupere su metabolismo es necesaria la rehidratación de sus tejidos. La entrada de agua en el interior de la semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que le rodea. Hasta que emerge la radícula, el agua llega al embrión a través de las paredes celulares de la cubierta seminal, siempre a favor de un gradiente de potencial hídrico. La toma de agua por la semilla es trifásica, con una absorción inicial rápida (fase I) seguida por una fase de meseta (fase II), donde ocurre la germinación. En la fase III se produce un incremento adicional en la toma de agua después de completada la germinación. La toma de agua rápida responde a leyes físicas, y se produce aunque la semilla este muerta (Leubner-Metzger, 2003). Aunque es necesaria la rehidratación para la germinación de las semillas, un exceso de agua actuaría desfavorablemente, pues dificultaría la llegada de oxígeno al embrión (Ramón y Mendoza, 2002).

*Temperatura:* Es un factor decisivo en el proceso de germinación, ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación. Por ello, las semillas solo germinan dentro de un cierto margen de temperatura. La temperatura óptima es aquella donde se alcanza el mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo posible.

*Gases:* La mayor parte de las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado, que permita una adecuada disponibilidad de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. De esta forma, el embrión obtiene la energía imprescindible para mantener sus actividades metabólicas. Para que la germinación tenga éxito, el O<sub>2</sub> disuelto en el agua de imbibición debe poder llegar hasta el embrión (Ramón y Mendoza, 2002).

*Luz:* Un lote de una variedad puede contener semillas que requieran luz para germinar, mientras otras semillas en el mismo lote son indiferentes a este factor (Hutchens, 1999). En variedades fotodormantes de tabaco, que no germinan en la oscuridad, la cubierta y el endospermo permanecen intactos. Sin embargo, cuando la cubierta y el endospermo

son removidos mecánicamente hay una emergencia de la radícula en ausencia de la luz. La ruptura de la fotodormancia y la promoción de la germinación de semillas que requieren luz, es regulada por el sistema de fitocromos (Furuya y Schafer, 1996).

#### **2.7.4. Dormancia o latencia de las semillas.**

La dormancia o latencia es el estado en el cual una semilla viable no germina, aunque se coloque en condiciones de humedad, temperatura y concentración de oxígeno idóneas para hacerlo (Foley, 2001). De ello se deduce que las semillas pueden mantener su viabilidad durante largos períodos de tiempo. Esta es una de las propiedades adaptativas más importantes que poseen los vegetales. Gracias a ello, las semillas sobreviven en condiciones desfavorables y adversas, aunque no indefinidamente (Roos, 1986).

La salida del estado de latencia requiere, en determinados casos, algunos estímulos ambientales, tales como luz o bajas temperaturas. En otros casos, las gruesas cubiertas seminales de las semillas constituyen una barrera impermeable al agua y a los gases o ejercen una resistencia física a la expansión de la radícula, que impide la germinación. La presencia de inhibidores de la germinación es otro de sus condicionantes (Engels y Visser, 2007).

##### **2.7.4.1. Tipos de dormancia**

Baskin y Baskin (2004) desarrollaron un sistema de clasificación basado en 5 tipos generales de dormición:

1. *Fisiológica*. Desarrollo reducido del embrión, que no consigue rebasar el impedimento mecánico de las cubiertas de la semilla (o del fruto).
2. *Morfológica*. Embrión pequeño diferenciado (pero poco desarrollado) o no diferenciado. En este caso el periodo de dormición corresponde al tiempo que el embrión necesita para crecer.
3. *Morfofisiológica*. Combinación de un embrión no desarrollado (o indiferenciado) y fisiológicamente durmiente.
4. *Física*. La cubierta de la semilla (o fruto) posee una capa impermeable que no permite la absorción de agua.

5. *Combinatoria (física + fisiológica)*. Semilla impermeable con embrión fisiológicamente durmiente.

Algunas semillas poseen sistemas de germinación complejos, los cuales implican muchas veces una combinación de los diversos tipos de dormición. Si durante el ensayo de germinación, o después de la siembra, las semillas no durmientes (ya expuestas a un pretratamiento de eliminación de la dormición, son expuestas a condiciones ambientales desfavorables (alta temperatura, anoxia, exceso de agua, etc.), pueden activarse mecanismos fisiológicos de bloqueo de la germinación (Côme y Corbineau, 1992). El resultado son las llamadas “dormiciones inducidas o secundarias”, denominadas así para diferenciarlas de la “dormición primaria” (la que está presente en el momento de la diseminación).

Las semillas sujetas a dormición secundaria prefieren con frecuencia ciclos de temperatura fuertemente variables para germinar, como sucede al final del invierno / inicio de la primavera (noches frías y días calurosos). En estos casos, las siembras tardías que encuentran el terreno demasiado “caliente” pueden provocar dormición secundaria y, por lo tanto, anular la germinación (Bacchetta *et al.*, 2008).

### **2.8. 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; 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; 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).

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1. Ubicación del experimento 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 de ambas especies fueron recolectadas cuando las cápsulas se tornaron completamente carmelitas (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 alcanzar valores entre 5 % y 7 % de humedad en la semilla. El silicagel autoindicador fue renovado cada vez que su color comenzaba a cambiar de azul intenso a rosado o azul pálido, como prueba de que su poder de hidratación se había agotado (Engels y Visser, 2007).

#### **3.3. 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 humedad relativa (HR) superior al 60 % y la otra en tanques con nitrógeno líquido (NL) (velocidad de enfriamiento: 200 °C/min). Pasado 1 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).

### **3.4. 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).

### **3.5. Ensayos de germinación**

Para evitar los daños por imbibición durante el proceso de germinación, 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 con el agua. Bajo estas condiciones, las semillas fueron incubadas 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 a 27±1<sup>0</sup>C con un fotoperiodo de 12 h. En todos los ensayos la emergencia de la radícula fue el criterio para considerar que la germinación de la semilla había tenido lugar (Engels y Visser 2007).

#### **3.5.1. Potencia germinativa (PG)**

La PG se determinó a los 14 días contando el número de semillas germinadas durante ese intervalo de tiempo considerando el total de semillas germinadas (Engels y Visser, 2007).

$$PG = \frac{N}{N_T} \quad \text{Expresada en \%}$$

Donde:

N: número de semillas germinadas a los 14 días

N<sub>T</sub>: número de semillas total de semillas

### 3.5.2. Tiempo medio de germinación (MGT)

El MGT se calcula determinando el número de semillas germinadas cada día, considerando el total de semillas germinadas (Tompsett y Pritchard, 1998):

$$MGT = \frac{\sum n_i \cdot d_i}{N} \quad \text{Expresado en días}$$

Donde:

$n_i$ : número de semillas germinadas en el día  $d$

$d_i$ : número de días desde el inicio del montaje de germinación

$N$ : número total de semillas germinadas al final del ensayo.

### 3.5.3. Velocidad de germinación ( $T_{50}$ )

El  $T_{50}$  es el parámetro más utilizado para determinar la velocidad de germinación. Corresponde al tiempo necesario para obtener el 50% de la Potencia Germinativa del lote (Thanos y Doussi, 1995).

$$T_{50} = \frac{[(N/2) - N_1] \cdot (T_2 - T_1)}{N_2 - N_1} + T_1 \quad \text{Expresado en días}$$

Donde:

$N$ : porcentaje final de semillas germinadas

$N_1$ : porcentaje de semillas germinadas por debajo de  $N/2$

$N_2$ : porcentaje de semillas germinadas por encima de  $N/2$

$T_1$ : número de días que corresponden a  $N_1$

$T_2$ : número de días que corresponden a  $N_2$

### 3.5.4. Vigor de germinación (VG)

El VG relaciona los parámetros Valor pico (VP) y Germinación media diaria (GMD) mediante la expresión siguiente (Bacchetta, 2008):

$$VG = VP \cdot GMD \quad \text{Expresado en días}^{-1}$$

Se define el VP como el porcentaje de germinación en un punto T respecto al número de días necesarios para alcanzar este punto, así pues la expresión matemática para su cálculo es la siguiente:

$$VP = \frac{PG_T}{T} \quad \text{Expresado en días}^{-1}$$

Donde:

PG<sub>T</sub>: porcentaje de germinación a los T días

T: día con mayor número de semillas germinadas

Para su cálculo GMD se emplea la expresión:

$$GMD = \frac{PG_F}{T_E} \quad \text{Expresado en días}^{-1}$$

Donde:

PG<sub>F</sub>: % de germinación al finalizar el ensayo

T<sub>E</sub>: Tiempo de duración del ensayo

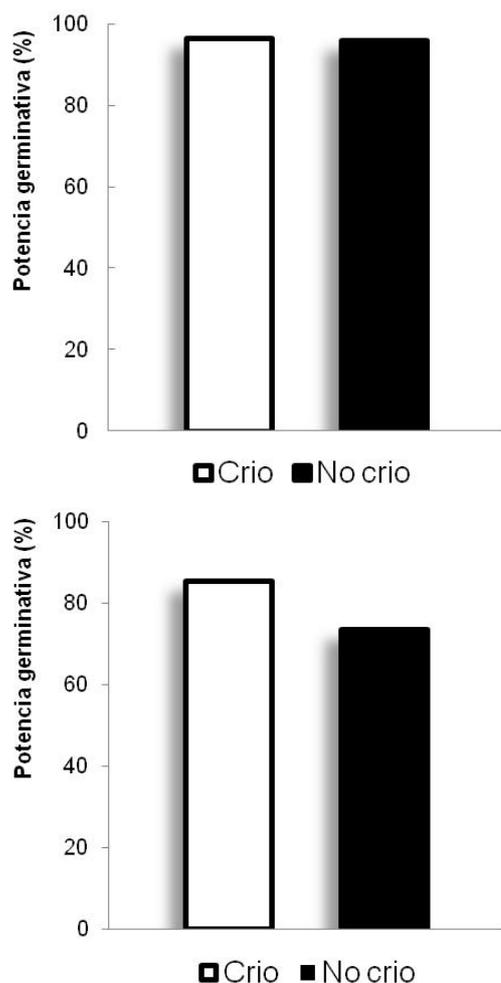
### **3.6. Tratamiento estadístico**

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el *Statistical Package for Social Sciences* (Version 11.5 para Windows, SPSS Inc.). Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (Levene). Se realizaron las pruebas t de Student, ANOVA y Tukey. En algunos casos fue necesaria la transformación de los datos para lograr los supuestos de las pruebas paramétricas realizadas. 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 la Potencia germinativa y el Porcentaje de Germinación Acumulado por días.

La viabilidad de un lote de semillas, no durmientes, hace referencia a su capacidad de germinar en condiciones ambientales favorables. Si una semilla es viable, y no presenta dormición, germinará cuando coloque en las condiciones adecuadas de humedad, luz y



**Figura 1:** Potencia germinativa de la especie A) SS96 y B) NE43. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas. Prueba t,  $p \leq 0.05$ ,  $n = 4$ . Solamente para el procesamiento estadístico los datos se transformaron según  $y' = 2 * \arcsen((y/100)^{0.5})$ .

temperatura. Por ello se acepta que la PG de un lote de semillas es un reflejo directo de su viabilidad (Pérez y Pita, 2001).

La Figura 1 representa gráficamente la PG de las semillas de SS96 y NE43 conservadas por un periodo de un año empleando la crioconservación o el método convencional ( $5^{\circ}\text{C}$ ). De Figura 1 destaca la diferencia significativa entre la PG de las semillas de NE43 crioconservadas (crio) y las conservadas a  $5^{\circ}\text{C}$  (No crio); contradictorio si se compara con los valores obtenidos para SS96 (Figura 1B).

La respuesta a tal comportamiento está en la latencia o dormancia de las semillas de NE43. La vía mediante la cual las semillas dormantes expuestas al nitrógeno líquido germinan pudiera estar relacionado con el papel de señalización de las sustancias reactivas del oxígeno (ROS) (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008). La exposición de la semilla a temperaturas criogénicas provoca una perturbación en la regulación del estado oxidativo de las células, lo cual aumenta la concentración de ROS en su interior (Mittler *et*

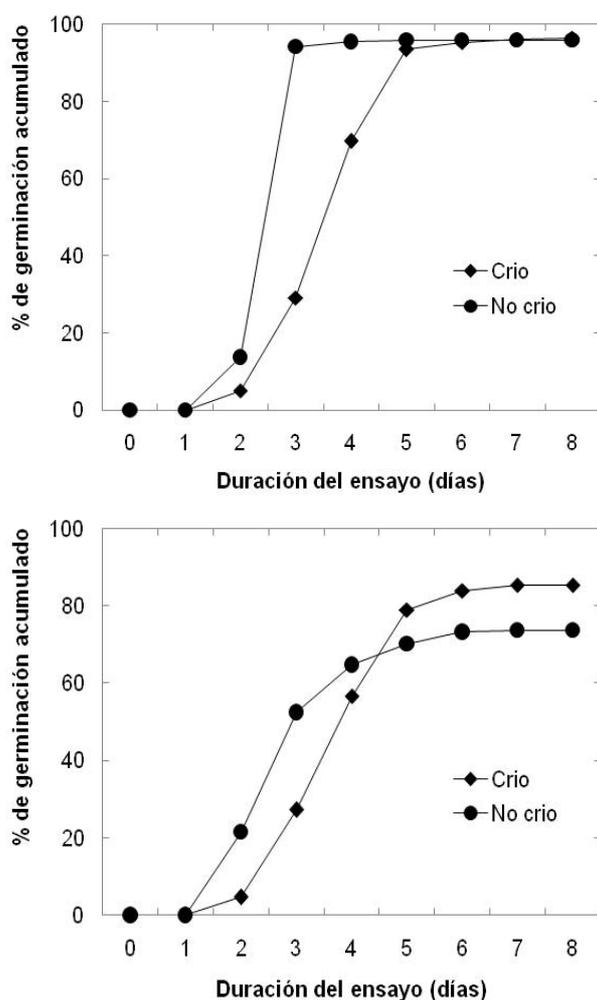
*al.*, 2004). Las ROS están implicadas en la carbonilación de proteínas de reserva, lo cual sugiere una vinculación de ellas con la preparación hacia una movilización de estas proteínas y el comienzo del proceso de germinación (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008; Oracz *et al.*, 2009).

En sentido general, se aprecian mayores valores de PG para los tratamientos que implican semillas de SS96, relacionado, de igual forma, al fenómeno de dormancia de la especie NE43. Al quedar viables semillas de esta especie al finalizar el ensayo disminuye la PG, a pesar del procedimiento aplicado para romper la dormancia. Por otro

lado, esta especie crece de forma silvestre en hábitats muy diferentes a las condiciones de regeneración desarrolladas en el banco de germoplasma (Knapp *et al.*, 2004). Tal dificultad pudiera traer consigo cierta diferencia en la calidad de las semillas, reflejada la PG alcanzada.

El PGA al final del ensayo tiene un comportamiento similar a la PG (Figura 2). Al concluir el proceso de germinación en el ensayo antes de los 14 días establecidos para el cálculo de PG (Engels y Visser, 2007) ambos parámetros en este ensayo coinciden. Sin embargo, el PGA cuantifica la cantidad de semillas germinadas cada día, por lo que su análisis puede brindar mayor información que la PG.

Durante el segundo, tercer y cuarto día del ensayo las semillas de SS96 No crio muestran una PGA significativamente superior que las SS96 Crio (Figura 2A),



**Figura 2:** Porcentaje de germinación acumulada por días de la especie A) SS96 y B) NE43. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey,  $p \leq 0.05$ ,  $n = 4$ ).

como consecuencia de un mayor número de semillas germinadas. Este resultado pudiera estar relacionado con un mayor vigor de las semillas no crioconservadas a pesar de tener un valor de PG semejante.

Sin embargo, al comparar la germinación de los tratamientos que implican a la especie NE43 con los ya analizados para la SS96, los resultados se muestran aparentemente contradictorios. Durante el segundo y tercer día del ensayo el PGA de NE43 No crio es superior a la mostrada por NE43 Crio. Sin embargo hacia el cuarto día ambos tratamientos alcanzan un PGA similar y a partir del quinto día del ensayo el PGA de NE43 Crio se significativamente superior a NE43 No crio, comportamiento que se mantiene hasta concluir el estudio. Otra vez la respuesta está en la latencia o dormancia de las semillas de NE43. Sin embargo gráficamente se hace imposible llegar a una conclusión con respecto al vigor de las semillas de ambos tratamientos.

#### **4.2. Efecto de la crioconservación sobre el vigor de las semillas**

Para un lote o muestra de semillas, el PG hace referencia a su capacidad de germinar en condiciones ambientales favorables mientras que el vigor se define como el conjunto de propiedades que determinan el nivel de actividad y capacidad de las semillas durante la germinación y posterior emergencia de las plántulas (Pérez y Pita, 2001).

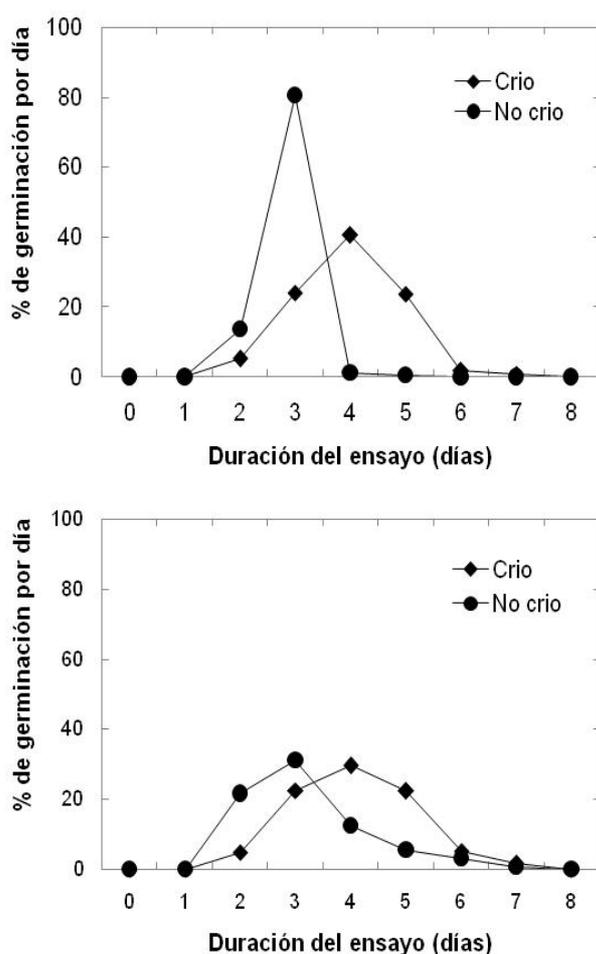
##### **4.2.1. Análisis de estadísticos simples**

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

Las Tablas 1A y 1B muestra 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. 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





**Figura 3:** Cantidad de semillas germinadas por día en los cuatro tratamientos estudiados durante los ocho días del ensayo de germinación. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas. Solo aparecen las letras de significación calculadas para el día tres del ensayo. ANOVA bifactorial,  $p \leq 0.05$ ,  $n = 4$ ). Solamente para el procesamiento estadístico, los datos se transformaron según  $y' = 2 * \arcsen((y/100)^{0.5})$ .

tercer día del ensayo. Sin embargo, las semillas SS96 Crio germinan más lentamente alcanzando un máximo de porcentaje de germinación al cuarto día (40,5%), significativamente inferior que el alcanzado por las semillas SS96 No crio. La especie NE43 muestra un comportamiento similar aunque el máxima germinación alcanzada en un día durante el ensayo fue similar para ambos tratamientos.

El sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada pueden usarse para comparar si las muestras provienen de distribuciones normales. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar las pruebas que comparan las desviaciones estándar (Johnson y Bhattacharyya, 2010). En este caso, ambos valores de sesgo estandarizado y curtosis estandarizadas se encuentran dentro del rango esperado lo que sugiere una distribución normal de los datos.

#### 4.2.2. Análisis de la cantidad de semillas germinadas por día

Al graficar la cantidad de semillas que germinan (Porcentaje de germinación) por cada día se obtiene información valiosa sobre el desarrollo del proceso de germinación (Figura 3). Hacia el cuarto día del ensayo las semillas de SS96 No crio han germinado casi en su totalidad alcanzando un máximo de porcentaje de germinación de 80.5% al

La no uniformidad en la germinación se asocia a diferentes factores; entre ellos la pérdida de vigor (Bacchetta *et al.*, 2008; Rajjou *et al.*, 2012), y este a su vez a la exposición de la semilla a diferentes estrés, tanto abiótico como biótico (Zhang *et al.*, 2012; Cokkizgin, 2013). De esta forma, la disminución del vigor observada de las semillas crioconservadas de ambas especie pudiera estar relaciona con daños sufridos durante el almacenamiento como consecuencia de la interacción con el NL

#### 4.2.3. Análisis de parámetros relacionados con el vigor de las semillas

Con el objetivo de lograr una completa caracterización del proceso de germinación durante el ensayo de germinación se calcularon, además de la PG y el PGA, tres parámetros adicionales (Tablas 2A y 2B).

El vigor de un lote de semillas es el resultado de la interacción de toda una serie de características de las semillas como pueden ser constitución genética, condiciones ambientales y nutricionales a que ha estado sometida la planta madre, grado de madurez, grado de deterioro y envejecimiento, etc. (Pérez y Pita, 2001). Cuando una de estas características alcanza valores extremos, la disminución del vigor de la semilla suele provocar entonces la pérdida de su PG (Walters *et al.*, 2010). Así, al comparar muestras provenientes de un mismo lote sometidas a condiciones de almacenamiento diferentes, el vigor de cada muestra es inversamente proporcional a los daños sufridos en el almacenamiento

**Tabla 2:** Parámetros relacionados con el proceso de germinación para la especie A: SS96; B: NE43.

#### A

Tratamiento	MGT	T <sub>50</sub>	VG
SS96 Crio	3.97b	4.52b	122.22b
SS96 No Crio	2.88a	2.51a	321.92a

#### B

Tratamiento	MGT	T <sub>50</sub>	VG
NE43 Crio	4.06b	6.13b	78.63b
NE43 No Crio	3.17a	3.62a	94.60a

MGT: Media de germinación en el tiempo

VG: Vigor germinativo

T<sub>50</sub>: Velocidad de germinación

\* Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas. Prueba t, p≤0.05, n = 4).

Las Tabla 2A y 2B muestra los valores de los parámetros de germinación calculados para cada uno de los cuatro tratamientos evaluados en el estudio. Los parámetros MGT,  $T_{50}$  y VG, están directamente relacionados con el vigor de las semillas aunque de forma diferente, atendiendo a su propia definición (ver Materiales y Métodos). Tanto MGT como  $T_{50}$  son inversamente proporcionales al vigor de una muestra o lote de semillas dado. Además, mientras que  $T_{50}$  y VG están fuertemente relacionados con la capacidad germinativa de una muestra de semillas en un intervalo de tiempo, MGT brinda una medida del vigor de las semillas independiente de la capacidad germinativa. Así, todos los parámetros fueron significativamente superiores al comparar No crio con Crio en ambas especies, lo que sugiere nuevamente un mayor deterioro o daños durante el almacenamiento en NL.

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 en el escrito. 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.

Los resultados de este trabajo muestran una disminución del vigor para las semillas crioconservadas (Tablas 2A y 2B) en concordancia con lo reportado en la literatura para otros cultivos (Cejas *et al.*, 2012; Kholina y Voronkova, 2012; Zevallos *et al.*, 2013). No

obstante, los efectos de la crioconservación sobre los parámetros de germinación de las especies de *Nicotiana* evaluadas en este estudio sugieren un efecto mucho más marcado que lo reportado en otros cultivos.

Más allá de las diferencias propias de cada cultivo, de las condiciones brindadas a las semillas antes y después de la crioconservación y del periodo de exposición a las temperaturas criogénicas (2 semanas vs 1 año en este estudio), este trabajo profundiza en la caracterización del proceso de germinación. Para ello emplea diferentes parámetros fisiológicos, de amplio uso en la literatura científica (Bailly *et al.*, 2001; Bacchetta *et al.*, 2008; Kholina y Voronkova, 2012). Los estudios similares efectuados hasta la fecha se centraban en la determinación y análisis de parámetros bioquímicos y no abordaban con profundidad el proceso de germinación desde el punto de vista fisiológico, escapando a los objetivos de tales estudios los resultados aquí obtenidos.

Está bien establecido que muchas especies de plantas durante su ciclo de vida están sujetas a diferentes estrés ambientales. El estrés altera el metabolismo de la planta y, como consecuencia, su crecimiento y desarrollo (Gao *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2011). Es indudable que la exposición de las semillas a temperaturas criogénicas constituye un estrés (Cejas *et al.*, 2012; Zevallos *et al.*, 2013), que afecta en mayor o en menor grado el metabolismo de las células que componen la semilla. La magnitud de la afectación dependen, entre otros factores, del cultivo, el tiempo de exposición y las condiciones brindadas a la semilla, antes y durante el almacenamiento (Walters *et al.*, 2010).

Sin embargo, no se puede obviar las ventajas potenciales de la conservación a temperaturas cercanas a los  $-196^{\circ}\text{C}$  (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. La muerte o la pérdida de la viabilidad y el vigor en las semillas ortodoxas ocurren cuando el contenido de agua en la semilla es

muy alto (Kaviani, 2011).

El contenido de agua, unido a la fisiología de la semilla y la temperatura de almacenamiento, determinan el grado de movilidad molecular en el citoplasma, que a su vez, gobierna la ocurrencia y proporción de las reacciones metabólicas (Walters, 1998). En el citoplasma de las células de semillas ortodoxas, al disminuir su contenido de agua, ocurre la vitrificación (Buitink y Leprince, 2004). El estado vitreo posee características similares a las de un sólido, como son la disminución del movimiento molecular, pero con las propiedades de un líquido. El estado vitreo es, además, estabilizado por las interacciones entre las diferentes moléculas que componen el citoplasma, principalmente los enlaces por puentes de hidrógenos formados por oligosacáridos y moléculas de agua (Folkert *et al.*, 2001; Buitink y Leprince, 2004). Debido a que la viscosidad del citoplasma al vitrificar es extremadamente alta, se evita la fusión entre sistemas de membranas y cambios conformacionales en las proteínas, además, se reduce considerablemente la velocidad de las reacciones de envejecimiento y la formación de cristales de hielo, que por su forma, dañan las membranas y paredes celulares (Walters, 1998; Buitink y Leprince, 2004; Kaviani, 2011) .Es así, que para utilizar la crioconservación como una herramienta que permita conservar el género *Nicotiana* a largo plazo, en futuros estudios debe ser evaluado, entre otros aspectos, el efecto del porcentaje de humedad en la longevidad de la semilla crioconservada.

#### **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, obligando a 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 3, 4 y 5 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 3:** Comparación de los gastos por concepto de Materias Primas y Materiales del banco de germoplasma y lo previsto para la crioconservación.

Materiales	UM	En el banco (200 accesiones: 5500 plantas x año)			Crioconservación (50 accesiones: 1750 plantas x año)				
		Precio MN	CUC	Cdad	Importe MN	CUC	Cdad	Importe MN	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 4:** Comparación de los gastos por concepto de salario y estimulación del banco de germoplasma y lo previsto para la crioconservación.

Clasificación ocupacional	En el banco			Crioconservación		
	Cantidad	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 5:** 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 5). Al implementar la crioconservación 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 semillas de SS96 crioconservadas tuvieron similar PG y PGA que las de la misma especie conservadas a 5 °C, mientras que las semillas de NE43 crioconservadas tuvieron PG y PGA significativamente superiores a las conservadas por igual periodo a 5 °C.
2. Las semillas de ambas especies conservadas a 5 °C presentaron mayor vigor que las crioconservadas por igual periodo.

## **6. Recomendaciones**

1. Realizar una caracterización morfológica, tanto en semillero como en la fase de campo, que permita determinar la influencia de los daños de la crioconservación en el desarrollo de las plantas.
2. Estimar la estabilidad genética de semillas crioconservadas utilizando Marcadores moleculares de ADN.

## 7. Bibliografía

- Allendorf F. W.; L. Gordon y Sally N. Aitken. Conservation and the genetics of populations. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, p. 587, 2013.
- Alzugaray, C.; N. Carnevale; A. Salinas y R. Pioli. Factores bióticos y abióticos que afectan la calidad de las semillas de *Schinopsis balansae* Engl. y *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. *Rev. Iberoam. Micol*, 24:142-147. 2007.
- 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.
- Bailly, C.; C. Audigier; F. Ladonne; M. H. Wagner; F. Coste; F. Corbineau y D. Côme, Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality, *J. Exp. Bot.* 52: 701–708. 2001.
- Baskin J. M. y C. C. Baskin. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14:1-16. 2004.
- Baskin, C. C. y J. M. Baskin. Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. San Diego: Academic Press, p. 666, 2001.
- Berjak, Patricia; P. Bartels; Erica E. Benson; K. Harding; D. J. Mycock; N.W. Pammenter- Sershen y J. Wesley-Smith. Cryoconservation of South African plant genetic diversity. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant*, 47:65–81. 2011.
- Berjak, Patricia y N. Pammenter. Recalcitrant seeds. En: Benech-Arnold, R. y R. Sánchez (eds.). Handbook of seed physiology. Food Products Press, New York. pp. 305-345. 2004.
- Bewley, J. D. y M. Black. Seeds: physiology of development and germination. Plenum Press, New York. pp 445. 1994.

- 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.
- Burbigge, N. T. The Australian Species of *Nicotiana* L. *Australia Journal of Botanic*, 18 (3): 342-378, 1961.
- Camacho, F. Dormición de semillas: causas y tratamientos. México, DF: Editorial Trillas, 128 p. 1994.
- Cejas, Inaudis; K. Viveas; 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.
- 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.
- Chase, M. W.; Sandra Knapp; A. V. Cox; J. J. Clarkson; Y. Butsko; J. Joseph; V. Savolainen y A. Parokony. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann. Bot.*, 92: 107–127, 2003.
- Chong, C.; B. B. Bible y J. Hak-Yoon. Germination and emergence. En: M. Pessaraki (Ed.). Handbook of plant and crop physiology. 2a. ed. New York: Marcel Dekker Inc, p. 85-146. 2002.
- Clarkson, J. R. y D. E. Symon. *Nicotiana Wutteii* (Solanaceae), a new species from north eastern Queensland with an unusual chromosome number. *Austrobaileya*, 3(3): 389 – 392, 1991.
- Cokkizgin, A. Effects of Hydro and Osmo-Priming on seed Vigor of pea (*Pisum sativum* L). *Agriculture, Forestry and Fisheries*, 2(6): 225-228. 2013.
- Côme, D. y F. Corbineau. Les semences et le froid. In: Come D. Les végétaux & le froid. Hermann Editeur des sciences & des arts, Paris.1992.
- Copete, E.; J. M. Herranz; P. Ferrandis; C. C. Baskin y J. M. Baskin. Physiology, morphology and phenology of seed dormancy break and germination in the endemic

- 
- Iberian species *Narcissus hispanicus* (Amaryllidaceae). *Ann Bot.* 107(6): 1003-1016, 2011.
- Daniell, H.; S. J. Streatfield y K. Wycoff. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.*, 5:219–226, 2001.
- Del Pino, J. D. Acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios de hojas y flores de *Nicotiana paniculata* (tabaco cimarrón), extraídos de las Lomas de Lachay. Tesis para optar por el grado académico de Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Lima, Perú, 2008.
- Dietz, K. J. Plant Peroxidoxins. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 97-103, 2003.
- Dodds, J. H. *In Vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman & Hall, London, 240 pp. 1991.
- Doria, Jessica. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1): 74-85, 2010.
- Eira, M. T. S.; E. A. da Silva; R. de Castro; S. Dussert; Christina Walters; J. D. Bewley y H. W. Hilhorst. Coffee seed physiology. *Braz. J. Plant Physiol.* 18(1): 149-163. 2006.
- El-Maarouf-Bouteau, H. y C. Bailly. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling & Behavior*, 3:175–182. 2008.
- Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant Biodiversity. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant.* 47:5–16; 2011.
- Engelmann, F. Use of Biotechnologies for Conserving Plant Biodiversity. *Acta Horticulturae*, 812: 63-82. 2009.
- Engelmann, F. y V. R. Rao, Major Research Challenges and Directions for Future Research, In: M. N. Normah, H. F. Chin y B. M. Reed, Eds., Conservation of Tropical Plant Species, Springer Verlag, Berlin, 2012.
- 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, p.17-46, 2009.

- Espino, E. Origen y características de las principales variedades cubanas de tabaco negro (*Nicotiana Tabacum* L). Instituto de Investigaciones del Tabaco, La Habana, Cuba, 1997.
- 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).
- Feng C.; M. Lan-Ju; A. Xiao-Long; G. Shun; T. Lin y C. Chen. Lipid Peroxidation and Antioxidant Responses during Seed Germination of *Jatropha curcas*. *Int. J. Agric. Biol.*, 13: 25–30, 2011.
- Finch-savage, W. E. y G. Leubner-Metzger. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171 : 501–523. 2006.
- 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.
- Foley, M. E. Seed dormancy: an update on terminology, physiological genetics, and quantitative trait loci regulating germinability. *Weed Science*, 49:305–317. 2001
- Folkert, A.; F. A. Hoekstra; E. A. Golovina y Julia Buitink. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *TRENDS in Plant Science*. 6 (9): 431-438. 2001
- Franco, T. L. e Hidalgo, R. (eds.). Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p. 2003.
- Frankham, R; J. D. Ballou, y D. A. Briscoe. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge UK. 100 pp. 2003.
- Furuya, M. y E. Schäfer. Photoperception and signaling of induction reactions by different phytochromes. *Trends Plant. Sci.*1:301-307, 1996.
- Gao, S.; C. Ou-yang; L. Tang; J. Zhu; Y. Xu; S. Wang y F. Chen. Growth and antioxidant responses exposed to mercury toxicity. *J. Hazard. Mater.* 182: 591–597. 2010.
- 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.
- Goodspeed, T. H. The genus *Nicotiana*. *Chronica Botánica*. Waltham, Massachusetts,

- 54, 1954.
- Greuter, W.; J. McNeill; F. R. Barrie; H. M. Burdet; V. Demoulin; T. S. Filgueiras; D. H. Nicolson; P. C. Silva; J. E. Skog; P. Trehane; N. J. Turland, y D. L. Hawksworth. International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code) adopted by the Sixteenth International Botanical Congress St. Louis, Missouri, July–August 1999. Koeltz Scientific Books, Königstein, 138, 2000.
- Harding, K. Genetic Integrity of Cryopreserved Plant Cells: A Review. *Cryoletters*, 25(1): 3-22. 2004.
- Hidalgo, R. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. Instituto Nacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia, Boletín técnico No.8, p. 2-26, 2003.
- 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.
- 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.
- Hutchens, T. W. Tobacco seed. Tobacco: Production, chemistry and technology. 66-70, 1999.
- 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. Sitio de la ISTA: <http://www.seedtest.org>.
- Japan Tobacco International. The genus *Nicotiana* Illustrated. Japan Tobacco International, Tokio, p. 75, 1994.
- Johnson, R. A. y G. K. Bhattacharyya. Statistics: Principles and Methods (Sixth edition).

- John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, USA, p. 686, 2010.
- Kaviani, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science*. 5(6):778-800, 2011.
- Kholina, Alla B. y Nina M. Voronkova. Seed Cryopreservation of Some Medicinal Legumes. *Journal of Botany*, 1: 1-7, 2012.
- 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.
- Knapp, Sandra; M. W. Chase y J. J. Clarkson. Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana (Solanaceae)*. *Taxon*, 52: 73–82, 2004.
- Koornneef, M.; L. Bentsink; y H. Hilhorst, Seed dormancy and germination. *Current opinion. Plant Biol*, 5:33-36, 2002.
- Lehmann, J. G. C. *Generis Nicotianarum Historia*. Printed for the author, Hamburgo. 1818.
- Leprince, O.; G. A. Hendry y B. D. McKersie. The mechanism of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 3: 231-246. 1993.
- Leubner-Metzger G. Chapter 12 in "The Biology of Seeds: Recent Research Advances". Nicolás, G.; K. J. Bradford; D. Côme, y H. W. Pritchard (Eds), CABI Publishing, Wallingford, UK, New York, USA, pp. 101-112, 2003.
- Linnaeus, C. *Species Plantarum*. ed. 1, Salvius, Stockholm, 1753.
- 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, p. 36, 1984.
- Maxted, N.; B. V. Ford-Lloyd y J. G. Hawkes. Complementary Conservation Strategies. En: Plant Genetic Conservation. The *In Situ* Approach. Maxted, N., B. V. Ford-Lloyd; J. G. Hawkes ed. Chapman & Hall, London, pp. 15-39. 1997.
- Mena, Ermis C.; M. Díaz y M. Gil. Introducción de la variedad de tabaco Virginia San Luis 22. *CUBATABACO*. 12(2): 31-35.2011
- Merxmüller, H. y K. P. Buttler. Nicotina in der Afrikanischen namibein

- pflzengeographisches und phylogenetisches rätsel. *Mitteilungen der Botanischen Staats-sammlung Muenchen*, 12: 91-104, 1975.
- Mira, Sara; María. E. González-Benito, Lisa M. Hill y Christina Walters. Characterization of volatile production during storage of lettuce (*Lactuca sativa*) seed. *Journal of Experimental Botany*, 61(14):3915–3924, 2010.
- Mittler, R.; S. Vanderauwera; M. Gollery y F. Van Breusegem. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant. Sci.* 9: 490–498, 2004)
- Murphy, N. G.; C. Albin; W. Tai y N. L. Benowitz. Anabasine toxicity from a topical Fol remedy. *Clinicals Pediatrics*, 45(7): 669-671, 2006.
- Nodari, R O y Domingas F Tomás: Agroviodiversidad y desarrollo sostenible: la conservación in situ puede asegurar la seguridad alimentaria. *Biocenosis* 24: 21-29, 2011.
- Ohashi, Y. *Nicotiana kawakamii*: a new species of de genus *Nicotiana*. En 6e Cong. Sc. Int. du Tabac, Tokyo, 1976.
- Opperman, C. H.; S. Lommel; M. Burke; J. Carlson; C. George; S. Gove; S. Graham; T. D. Houfek; S. Kalat; P. C; Little; A. Lumpkin; L. Redman; T. Ross; R. Schaffer; E. Scholl; P. J. Stephens; E. Windham; S. H. Zekanis; N. Lakey; J. Bidell y A. Budiman. Update On The Tobacco Genome Initiative: A Gene Discovery Platform. Town y Country Convention Center january 14-18, 2006.
- Oracz, K.; H. El-Maarouf-Bouteau; I. Kranner; R. Bogatek; F. Corbineau y C. Bailly. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology* 150(1): 494-505, 2009.
- 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.

- Pérez, F. y J. M. Pita. Viabilidad, vigor y conservación de semillas. Hojas Divulgadoras. Núm. 2112-HD. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, 16 pp. 2001.
- 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.
- Rajjou, L.; M. Duval; Karine Gallardo; Julie Catusse; Julia Bally; Claudette Job y D. Job. Seed Germination and Vigor. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:507–33. 2012.
- Ramón, M y C. Mendoza. Efecto del deterioro post-corte sobre la germinación de la semilla asexual de cinco variedades de caña de azúcar. *Rev. Fac. Agron.* 19(4): 264-272. 2002.
- 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. 2007. 165 pp.
- Reid W. V. y K. R. Miller. Keeping Options Alive. The Scientific Basis for Conserving Biodiversity. World Resources Institute, Washington, 128 pp. 1989.
- Revilla P.; A. Butrón; M. E. Cartea; R. A. Malvar y A. Ordás, Breeding for Cold Tolerante, In: M. Ashraf y P. J. C. Harris, Ed., *Abiotic Stresses: Plant Resistance through Breeding and Molecular Approaches*, Food Products Press, New York, pp. 301-400. 2005.
- Roos, E. E. Precepts of successful seed storage. In *Physiology of seed deterioration*. Spec. Pub. 11, ed. M. B. McDonal, Jr. And C. J. Nelson, Crop Science society of America, Madison, WI. pp. 1-25. 1986.
- 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.
- Silva, G.; A. Lagunes; J. C. Rodríguez y D. Rodríguez. Insecticidas vegetales; Una vieja-nueva alternativa en el control de plagas. Manejo Integrado de Plagas (CATIE), 2002.
- Siva Raju, K.; M. Sheshumadhav; C. Chandrasekhararao y 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.
- Tang, A. Desiccation-induced changes in viability, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in *Mimosa elengi* seeds. *African Journal of Biotechnology*, 11(44): 10255-10261, 2012.
- Thanos C. A. y M. A. Doussi. Ecophysiology of seed germination in endemic *Labiates* of Crete. *Israel Journal of Plant Science*, 43: 227-237. 1995.
- Tompsett P. B. y H. W.Pritchard. The effect of chilling and moisture status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanus* L. seed. *Annals of Botany*, 82: 249-261. 1998.
- Torrecilla, G. El banco de germoplasma, una garantía para la conservación del género *Nicotiana*. *Tobacco Irrigation*. 2(1): 17-18, 2011.
- Touchell, D. H. y K. W. Dixon. Cryopreservation for seedbanking of Australian species. *Annals of Botany*, 74: 541-546, 1994.
- Uchiyama, H.; K. Chen y S. G. Wildman. Polypeptide composition of fraction I protein as an aid in the study of plant evolution. *Stadler Genet. Symp.*, 9:83-99. 1977.
- UNCED, 1992. Convention on Biological Diversity. United Nations Conference on Environment and Development, Ginebra.
- Valdés, Marlin 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.
- 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; L. Wheeler y P. C. Stanwood. Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology*. 48: 229-244. 2004.
- Walters, Christina. Optimising seed banking procedures.. En *Seed conservation: Turning science into practice*. (Smith R. D.; J. B. Dickie; S. H. Linington; H. W.

- Pritchard y R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido. 725-743. 2003.
- Walters, Christina. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci. Res.* 8: 223–244. 1998.
- Witt, S. Biotechnology and Genetic Diversity. California Agricultural Lands Project, San Francisco. 145pp. 1985.
- 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, M; Z. Wang; L. Yuan; C. Yin; J. Cheng; L. Wang; J. Huang y H. Zhang. Osmopriming improves tomato seed vigor under aging and salinity stress. *African Journal of Biotechnology*, 11(23): 6305-6311, 2012.