

EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA CRIOCONSERVACIÓN EN SEMILLAS DE GUACHAPELÍ (*PSEUDOSAMANEA GUACHAPELE*) COMO ESTRATEGIA EN LA CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD ECOLÓGICA

Holanda Teresa Vivas Saltos, Julio Abel Loureiro Salabarría, María Fernanda Pincay Cantos, Laura Gema Mendoza Cedeño

¹Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” Carrera de Ingeniería Ambiental, Campus Politécnico Sitio El Limón vía a la Pastora. Calceta, Manabí, Ecuador. Email: teresavivas_saltos@outlook.com, julioabelloureiro@gmail.com, fer_nanda-83@hotmail.com, lageme@gmail.com

Resumen

La investigación tuvo como objetivo evaluar la técnica crioconservación en semillas de (*Pseudosamanea guachapele*), para la conservación de diversidad ecológica. Para ello se desarrolló un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) a la muestra de semillas recolectadas y seleccionadas en la microcuenca del río Carrizal, Provincia de Manabí, Ecuador, específicamente en tres zonas dentro de los límites de las comunidades: Balsa en Medio, Julián y Severino, donde se dividió en dos bloques; semillas crioconservadas (N₂L) y semillas no crioconservadas (-N₂L). Se aplicaron cinco tratamientos con cinco réplicas para cada uno, donde se varió porcentaje de humedad (% humedad) mediante la exposición a sílica gel y agua estéril en intervalos de tiempos de 8 y 12 horas. Los tratamientos se identificaron como: T1 (7,0 % humedad expuestos 8h a sílica gel), T2 (5,9 % humedad expuestos 12h a sílica gel), T3 (11,3 % humedad expuestos 8h en agua estéril), T4 (13,8 % humedad expuestos 12h en agua estéril) y T5 (9,15 % de humedad en estado natural). Los experimentos de laboratorio se evaluaron con las variables respuestas; % de germinación y % de conversión en plantas dando como resultados en los ensayos de laboratorio al T5 sometido a N₂L, con mejores respuestas al presentar 70 % de germinación y 70 % de conversión en plantas. Los resultados obtenidos sugieren a la crioconservación como técnica eficaz, para la conservación de las semillas ortodoxas y garantizar así la diversidad ecológica.

Palabras claves: crioconservación, dinitrógeno líquido, germinación, conversión en plantas

ABSTRAC

The objective of the research was to evaluate the technique of cryopreservation in seeds of (*Pseudosamanea guachapele*), for the conservation of ecological diversity. For this, a Design of Completely Randomized Blocks (DBCA) was developed for the sample of seeds collected and selected in the microbasin of the Carrizal River, Province of Manabí, Ecuador, specifically in three zones within the limits of the communities: Balsa en Medio, Julián and Severino, where it was divided into two blocks; Cryopreserved seeds (N2L) and non-cryopreserved seeds (-N2L). Five treatments were applied with five repetitions for each one, where the humidity percentage (humidity%) was varied by exposure to silica gel and sterile water at intervals of 8 and 12 hours. The treatments were identified as: T1 (7.0% moisture exposed 8h to silica gel), T2 (5.9% humidity exposed 12h to silica gel), T3 (11.3% humidity exposed 8h in water) sterile), T4 (13.8% humidity exposed 12h in sterile water) and T5 (9.15% humidity in natural state). Laboratory experiments were evaluated with variable responses; % germination and % conversion in plants that give results in laboratory tests to T5 subjected to N2L, with better responses to present 70% germination and 70% conversion in plants. The results obtained suggest that cryopreservation is an effective technique for the conservation of orthodox seeds and, therefore, guarantees ecological diversity

Keywords: cryopreservation, liquid dinitrogen, germination, conversion into plants

Introducción

Los recursos forestales a nivel mundial han sufrido cambios acelerados de deterioro y destrucción por diferentes presiones antropogénicas. Entre las presiones más comunes que han contribuido a esta situación podemos encontrar; el aumento acelerado de población, cambios en el uso de suelos y la extracción de madera entre otros recursos naturales para numerosas aplicaciones.

El Guachapelí (*Pseudosamanea guachapele*), es una especie de árbol que se puede encontrar en bosques húmedos y secos desde el sureste de México a través de toda América central hasta Ecuador en América del Sur, aunque su presencia abarca hasta las islas del Caribe. Esta especie, estimada entre las mejores de la región, ha tenido una tasa de aprovechamiento elevado (Cornejo, 2015), por las finas

características de su madera como: compactibilidad, tronco recto, facilidad de manejo, extraordinaria durabilidad, resistencia al agua de mar y a los perforadores.

Para el Ecuador es de vital importancia preservar la biodiversidad forestal en los bosques secos, evitando la pérdida de especies con relevancia ecológica, los programas de plantación y conservación se ven dificultados por el comportamiento.

Los bancos de germoplasma convencionales (*ex situ*) de semillas constituyen una opción sencilla para el almacenamiento de semillas ortodoxas durante largos períodos de tiempo y con un mínimo riesgo de daños genéticos, además de ser el método más eficaz y económico para la conservación de especies vegetales.

La crioconservación según Cardoso *et al.*(2000), es otra de las alternativas utilizadas para la preservación de semillas, la cual está basada en el almacenamiento inferior a -130 °C mediante su inmersión en nitrógeno líquido (N₂L) utilizando ultras bajas temperaturas de (-196 °C). Bajo estas condiciones, se detienen la división celular y la mayoría de los procesos físicos y metabólicos responsables de la pérdida de viabilidad de las semillas con lo que se asegura, en teoría, su conservación indefinidamente.

Este tipo de técnica se ha utilizado para conservar las semillas ortodoxas por su tolerancia a la desecación y presentan numerosas ventajas con respecto a otras técnicas que se utilizan tradicionalmente. Algunas de estas ventajas son la conservación de la estabilidad genética por tiempo indefinido, la reducción de costos al concentrarse la disponibilidad de material y la información asociada al mismo Hine *et al.* (2013).

Por todo lo antes expuesto la investigación tuvo como objetivo evaluar la técnica crioconservación en semillas de Guachapelí (*Pseudosamanea guachapele*) como estrategia en la conservación de la diversidad ecológica.

Materiales y métodos

Ubicación

La investigación se realizó en la microcuenca del río Carrizal, Provincia de Manabí, Ecuador, específicamente en tres zonas dentro de los límites de las comunidades: Balsa en Medio, Julián y Severino.

Metodología

La recolección de semillas fue bajo la metodología sugerida por Martínez (s/f) siguiendo los niveles de organización ecológica, con métodos de conservación *ex situ* y de tipo específico mediante la recolección de vainas maduras *in situ* de árboles de Guachapelí (*Pseudosamanea guachapele*) con buenos fenotipos. La identificación taxonómica y selección de individuos de la especie se realizó *in situ* por los autores y expertos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Las vainas recolectadas se abrieron manualmente para extraer las semillas, las que inmediatamente fueron preparadas para su selección mediante la observación, teniendo en cuenta los criterios de tamaño y conservación, según Villa *et al.* (2007). Se consiguieron identificar 14 individuos de Guachapelí (*Pseudosamanea guachapele*) en las tres zonas preestablecidas dentro de los límites de las comunidades (Balsa en Medio, Julián y Severino) para la obtención de sus frutos.

Se estableció un diseño experimental de bloque completamente al azar (DBCA), a partir de la variación de % de humedad y aplicación o no de la crioconservación a las semillas seleccionadas con un total de cinco tratamientos y cinco réplicas para cada uno siendo un total de 50 unidades experimentales.

Para la experimentación se dividieron las semillas en dos bloques; 1. Semillas crioconservadas (N₂L), 2. Semillas no crioconservadas (-N₂L). La preparación de las semillas para los tratamientos fue por (encapsulamiento/deshidratación/hidratación) propuesta por Abdelnour *et al.* (2007) y modificada por los autores sin utilización de medios de cultivo.

Las semillas se dividieron en cinco grupos, de los cuales en dos de ellos las semillas fueron sometidas a deshidratación a temperatura controlada de 28 °C en frascos de vidrio previamente rotulados expuestos a sílica gel y herméticamente selladas en intervalos de tiempos de 8 y 12 horas, específicamente siendo; T1 (7,0 % humedad expuestos 8h a sílica gel) y T2 (5,9 % humedad expuestos 12h a sílica gel). Otros dos grupos de semillas fueron expuestos a un proceso de hidratación introducidas en frascos de vidrio con agua estéril y sellados herméticamente donde las semillas estuvieron durante 8 y 12 horas a temperatura controlada de 28 °C, representados por; T3 (11,3 % humedad expuestos 8h en agua estéril) y T4 (13,8 % humedad expuestos 12h en agua estéril).

Al último grupo de semillas no se aplicó ningún pretratamiento manteniéndose así el % de humedad en estado natural como se muestra, T5 (9,15 % de humedad en estado natural). El control de los porcentajes de humedad requeridos en cada uno de los tratamientos se realizó mediante medidor de humedad en semillas Kett PM600.

Para someter las semillas a crioconservación, se colocaron en criotubos de polipropileno de 5 ml con los % de humedad determinados y estos fueron sumergidos directamente en el contenedor de nitrógeno líquido (N₂L) a -196 °C. Tras 48 horas los criotubos se sacaron de los contenedores y se dejó que las semillas alcanzaran el equilibrio a temperatura ambiente entre (25-28 °C).

Las variables respuestas observadas para el análisis estadístico fueron % de germinación y % de conversión en plantas, estos se desarrollaron siguiendo lo propuesto por Cardoso *et al* (2000) y modificada por los autores, donde se realizaron 5 tratamientos con 5 réplicas de 12 semillas para cada bloques siendo un total de 50 unidades experimentales. Las semillas se colocaron en placas Petri de vidrio de 9 cm de diámetro con sus respectivos % de humedad a temperaturas ambiente a 28 °C, sobre dos discos de papel filtro, previamente humedecidos con 20 ml de agua estéril. El tiempo de incubación fue de 10 días con un control sobre la iluminación de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. El estudio estadístico se realizó en el software SPSS versión 21, haciendo análisis de varianza y aplicando la prueba de Tukey con un 5% de probabilidad.

Resultados y discusión

El **Cuadro 1** refleja los resultados de números de frutos y semillas recolectadas de Guachapelí (*Pseudosamanea guachapele*), en las comunidades (Balsa en medio, Julián y Severino).

Cuadro 1. Resultados de recolección de semillas recolectadas de Guachapelí (*Pseudosamanea guachapele*) en cada zona muestreada

Individuos muestreados	Zonas muestreadas			Totales (Unidades)
	Balsa en medio	Julián	Severino	
Total de Árboles	4	5	5	14

Árboles	2	3	2	7
Seleccionados				
Total de Vainas	101	100	104	305
Total de Semillas	716	715	704	2135

Fuente: Propia de los autores

Como se aprecia en el Cuadro 1, en las tres zonas muestreadas en la investigación se lograron seleccionar solo 7 individuos de Guachapelí, (*Pseudosamanea guachapele*). Se recolectaron de ellos un total de 305 vainas de buen aspecto y en estado de total madurez. Estos fueron transportados al laboratorio aportando un total de 2135 semillas de las cuales fueron seleccionadas 600 para su experimentación.

El **Cuadro 2**, muestra las medias de resultados de ensayos para la variable % de germinación para los cinco tratamientos establecidos por bloque (semillas crioconservadas (N₂L) y no crioconservadas (-N₂L).

Cuadro 2. Resultados de ensayos de laboratorio % de germinación de Guachapelí, (*Pseudosamanea guachapele*).

Tratamientos	Bloque	
	% de germinación (N ₂ L)	% de germinación (-N ₂ L)
T1	50,2	40,25
T2	30,75	40,0
T3	60,25	30,75
T4	60,50	50,75
T5	70,00	40,20

Fuente: Propia de los autores

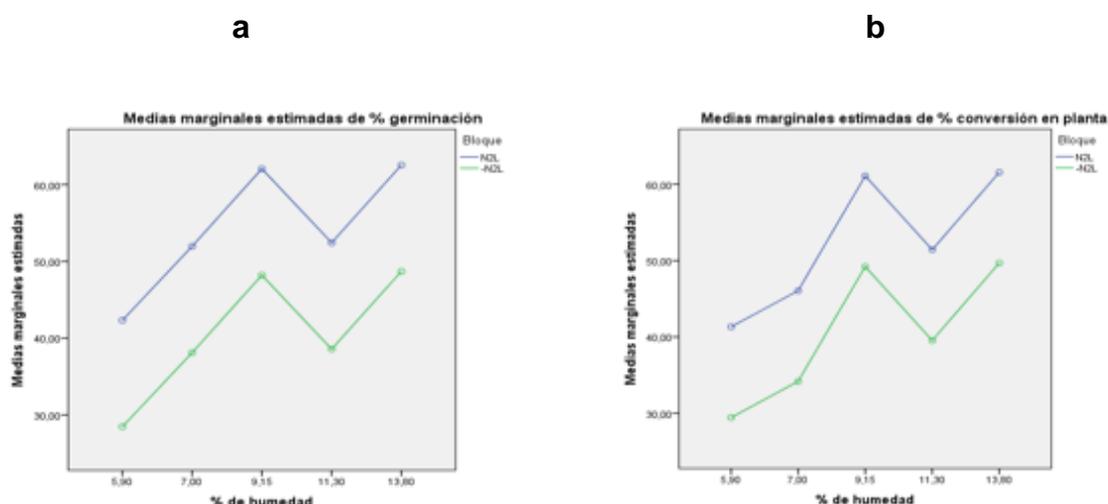
El **Cuadro 3**, muestra las medias de resultados de ensayos para la variable % de conversión en plantas para los cinco tratamientos establecidos por bloque (semillas crioconservadas (N₂L) y no crioconservadas (-N₂L).

Cuadro 3. Resultados de ensayos de laboratorio % de conversión en plantas de Guachapelí, (*Pseudosamanea guachapele*).

Tratamientos	Bloque	
	% conversión en planta (N ₂ L)	% conversión en planta (-N ₂ L)
T1	40,00	40,25
T2	30,75	40,00
T3	60,25	30,75
T4	60,50	50,75
T5	70,00	40,20

Fuente: Propia de los autores

Gráfico 1. Correlación de Tratamientos (% de Humedad) y factor bloque (N₂L; -N₂L) respecto medias marginales estimadas para las variables respuestas a) % de germinación b) % de conversión en plantas



Fuente: Propia de los autores

El análisis estadístico desarrollado fue un modelo lineal general multivariante con un intervalo de confianza de 95 %. Este demostró que la variación del factor % humedad y el factor bloque (N₂L; -N₂L) influyen significativamente sobre los resultados de las variables respuestas (% de germinación y % de conversión en plantas).

Los ensayos de laboratorio con menores resultados para el % de germinación fueron los T2 con semillas crioconservadas (N₂L) y T3 con semillas no crioconservadas (-N₂L), coincidiendo con un valor de 30,75 %. Los tratamientos con resultados superiores fueron para los T5 con semillas crioconservadas (N₂L) y T4 con semillas

no crioconservadas (-N₂L) con valores de (70,00; 50,75) % respectivamente como se observa en el **Cuadro 1 y Gráfico 1 a**.

Los ensayos de laboratorio mostrados en el **Cuadro 2** y representados en el **Gráfico 1 b** evidenciaron menores resultados para el % de conversión en plantas en los T2 con semillas crioconservadas (N₂L) y Trat₃ con semillas no crioconservadas (-N₂L), coincidiendo con un valor de 30,75 %. Los tratamientos con resultados superiores fueron para los T5 con semillas crioconservadas (N₂L) y T4 con semillas no crioconservadas (-N₂L) con valores de (70,00; 50,75) % respectivamente.

El **Gráfico 1 (a y b)** revelaron comportamientos similares en los dos bloques para cada uno de los tratamientos en relación a las variables analizadas. Por otra parte, se observó mejores resultados para las respuestas de ambas variables en el bloque de semillas crioconservadas (N₂L), coincidiendo con lo expuesto por Nassif (2002), que al trabajar con especies forestales observó una baja germinación en semillas no congeladas y un incremento considerablemente en la germinación de las congeladas.

Los T5 y T4 en el bloque de semillas crioconservadas (N₂L) mostrados en los **Cuadro 1; Cuadro 2 y Gráfico 1 (a y b)** se obtuvieron resultados sobresalientes e idénticos para % de germinación y % de conversión en plantas con valores de (70,00; 60,50) % respectivamente, corroborando lo expuesto por Da Costa *et al* (2003) quien obtuvo un aumento del rendimiento de estas variables con la disminución de la temperatura.

Finalmente, se escogió al Trat₅ en el bloque de semillas crioconservadas (N₂L), como el más efectivo, por no utilizar ninguna técnica en la variación de humedad y por tanto ser más competitivo económicamente, además de garantizar el almacenamiento para este tipo de semillas por tiempos indefinidos a estas condiciones de temperatura con % de humedad en su estado natural garantizando la conservación de diversidad ecológica.

Conclusiones

De los resultados obtenidos de ensayos de laboratorio para las semillas de Guachapelí (*Pseudosamanea guachapele*), se obtuvo que el tratamiento menos efectivo en las variables % germinación y % conversión en planta fue el T2 con 5,9 % de humedad con la aplicación de (N₂L) estudiados. Esto demostró que este tipo

de semillas no deben ser sometidas a deshidratación provocando el cese de la división celular y la mayoría de los procesos físicos y metabólicos, responsables de la viabilidad de las semillas.

El tratamiento menos efectivo en las variables % germinación y % conversión en planta fue el T3 con 11,3 % humedad expuestos 8h en agua estéril sin la aplicación de (-N₂L). Esto demostró que este tipo de semillas no deben ser sometidas a deshidratación provocando el cese de la división celular y la mayoría de los procesos físicos y metabólicos, responsables de la viabilidad de las semillas.

El mejor tratamiento fue el de semillas crioconservadas (N₂L) específicamente el T5 con 9,15 % de humedad en estado natural, este mostró las mejores respuestas con respecto a las variables en estudio con; 70,00 % de germinación y 70,00 % de conversión en planta. Esto indicó que semillas ortodoxas con estas características pueden ser almacenadas en congelación con % de humedad en su estado natural y así garantizar en bancos de germoplasma la conservación de diversidad ecológica.

Bibliografía

- Abdelnour-Esquivel, A., Rojas, G., & Alfaro, U. (2007). Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en marcha*, 98-103.
- Cardoso Almeida, F. d., Pita Villamil, J. M., & Gomes de Gouveia, J. P. (2000). EFECTO DE LA CRIOCONSERVACIÓN SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande*, 67-71.
- Cornejo, X. (2015). Las especies emblemáticas de flora y fauna de la ciudad de Guayaquil y de la provincia del Guayas, Ecuador. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales* , 56-71.
- Da Costa Nunes, E., Benson, E. E., Oltamari, A. C., Sibila Araujo, P., Righetto Moser, J., & Viana, A. M. (2003). In vitro conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, 838-848.
- Hine Gómez, A., Vargas Castillo, P., & Abdelnour Esquivel, A. (2013). Crioconservación de semillas de teca (*Tectona grandis* L.f). *Agronomía Costarricense* , 51-60.
- Martín Martínez, I. (s/f). Hojas Divulgadoras. Núm 2114 HD. *Conservación de Recursos Fitogenéticos*. Madrid., España: LG. SALJEN S.L.
- Nassif Salomão, A. (2002). Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 133-138.

Villa, A., Jiménez, P., Valbuena, R., Bastidas, S., & Núñez, V. (2007). Estudio preliminar para el establecimiento de un protocolo de crioconservación para palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Agronomía Colombiana*, 215-223.