

EVALUACIÓN PRELIMINAR PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE
SEMILLAS DE *Gmelina arborea* Roxb. (VERBENACEAE) UTILIZANDO
EL MÉTODO DE CONGELAMIENTO RÁPIDO POR INMERSIÓN
DIRECTA EN NITRÓGENO LÍQUIDO

Alfredo Alberto Arrieta Arrieta

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
para optar al título de

Biólogo

Sandra Constantino Chuaira, Bióloga M. Sc
Directora

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGIA
Bogotá, D. C.
Enero de 2010

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

EVALUACIÓN PRELIMINAR PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE
SEMILLAS DE *Gmelina arborea* Roxb. (VERBENACEAE) UTILIZANDO
EL MÉTODO DE CONGELAMIENTO RÁPIDO POR INMERSIÓN
DIRECTA EN NITRÓGENO LÍQUIDO

Alfredo Alberto Arrieta Arrieta

Sandra Constantino, Bióloga M. Sc.
Directora

María del Pilar Márquez, Bióloga M. Sc.
Jurado

EVALUACIÓN PRELIMINAR PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE
SEMILLAS DE *Gmelina arborea* Roxb. (VERBENACEAE) UTILIZANDO
EL MÉTODO DE CONGELAMIENTO RÁPIDO POR INMERSIÓN
DIRECTA EN NITRÓGENO LÍQUIDO

Alfredo Alberto Arrieta Arrieta

APROBADO

Ingrid Schuler, Bióloga PhD
Decana Académica

Andrea Forero, Bióloga
Directora de Carrera

A mi padre Alfredo José, mi madre Marina,
mis hermanas Marynés y Ángela María.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Biotecnología Vegetal, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Pontificia Universidad Javeriana, por todo el apoyo logístico y financiero.

Sandra Constantino Chuaire, por sus importantes lecciones para la ciencia y la vida.

Fabio Guacaneme por su orientación en el análisis estadístico.

Weimar Hernando Sandoval Rivera y Stephanie Rojas Morales por sus valiosos comentarios y consejos tanto en el laboratorio como fuera de él.

Nixon Germán Pérez Torres, quien me señaló este proyecto y siempre estuvo atento de las fechas determinantes.

Rafael Arrieta por su guía, opiniones y disposición.

Mi madre Marina de Arrieta por su aliento y compañía durante la escritura de este proyecto.

Mi hermana Ángela María Arrieta por su ayuda con las figuras.

Te agradezco a ti Bellita por despertarme muy a tu modo del letargo en el que estaba.

Por último y no menos importante...a Dios, a quien debo acercarme mucho más.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 SEMILLAS	4
2.2 MELINA (<i>Gmelina arborea</i>) – VERBENACEAE	5
2.3 CRIOCONSERVACIÓN	7
2.4 TEST DE TETRAZOLIO	13
2.4 ESTUDIOS PRELIMINARES RELACIONADOS	14
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	18
3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	18
3.2 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	18
3.3 HIPÓTESIS	18
3.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	19
4. OBJETIVOS	20
4.1 OBJETIVO GENERAL	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 ESTUDIOS PRELIMINARES	21
5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA	22
5.3 VARIABLES DEL ESTUDIO	22
5.4 MÉTODOS	23
5.4.1 DESECACION DE LAS SEMILLAS	23
5.4.2 CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS SEMILLAS	24
5.4.3 TEST DE GERMINACION DE LAS SEMILLAS	25
5.4.4 PROCEDIMIENTO CON NITROGENO LIQUIDO – 196°C	25
5.4.5 PRUEBA DE VIABILIDAD CON TETRATOLIO 1%	26
5.5 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	27
5.6 ANÁLISIS DE INFORMACIÓN	28

6. RESULTADOS	29
6.1 CAPACIDAD DE GERMINACION (INDICE GC)	29
6.2 TASA DE GERMINACIÓN (ÍNDICE GRI)	33
6.3 VALOR PICO (ÍNDICE PV)	35
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIONES	44
9. RECOMENDACIONES	46
10. REFERENCIAS	47
11. ANEXOS	50
ANEXO A. Formato de recolección de información.	50
ANEXO B. Análisis de varianza de la capacidad de germinación (GC).	51
ANEXO C. Test de Duncan para diferenciar la capacidad de germinación sin y con NL.	51
ANEXO D. Test de Duncan para los diferentes contenidos de humedad.	51
ANEXO E. Test de Duncan entre sin NL a los diferentes días y con NL, con un nivel de significancia del 5%.	52
ANEXO F. Análisis de varianza para la tasa de germinación (Índice GRI).	52
ANEXO G. Test de Duncan para la tasa de germinación en los tres rodales semilleros.	53
ANEXO H. Test de Duncan para diferenciar la tasa de germinación entre los grupos con y sin NL.	53
ANEXO I. Contenidos de humedad a los 0, 4,8 y 12 días.	53
ANEXO J. Test de Duncan para diferenciar el efecto de la interacción en la capacidad de germinación.	54
ANEXO K. Análisis de varianza para el valor pico (PV).	55

ANEXO L. Test de Duncan con un nivel de significancia del 5% para los tres rodales semilleros.	55
ANEXO M. Test de Duncan con un nivel de significancia del 5% para los valores picos.	55
ANEXO N. Test de Duncan para los valores pico del Factor_1.	56
ANEXO O. Test de Duncan para los valores picos de las diversas interacciones.	56
ANEXO P. Análisis de varianza para la prueba de tinción por Tetrazolio.	57
ANEXO Q. Test de Duncan con un nivel de significancia del 5% para las semillas teñidas con Tetrazolio.	57
ANEXO R. Test de Duncan para los valores pico del Factor.	57
ANEXO S. Test de Duncan para viabilidad de semillas.	57
ANEXO T. Fotografías.	58

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Proporciones de silica gel utilizadas en diferentes tiempos.	21
Tabla 2. Variables que se tuvieron en cuenta en el ensayo.	22
Tabla 3. Tratamiento para cada rodal semillero.	24
Tabla 4. Porcentaje de germinación promedio sin diferenciación de rodal semillero.	39
Figura 1. Semilla de melina germinadas en papel de filtro humedecido.	6
Figura 2. Semilla teñida con Tetrazolio 1%.	27
Figura 3. Promedio porcentaje de germinación con y sin NL para el rodal semillero La Sierra.	30
Figura 4. Promedio porcentaje de germinación con y sin NL para el rodal semillero Andaluz.	31
Figura 5. Promedio porcentaje de germinación con y sin NL para el rodal semillero Petate.	31
Figura 6. Contenido de humedad (CH) promedio en rodales semilleros Andaluz, Petate y La Sierra.	32
Figura 7. Promedio tasa de Germinación con y sin NL para el rodal semillero La Sierra.	33
Figura 8. Promedio tasa de Germinación con y sin NL para el rodal semillero Andaluz.	34
Figura 9. Promedio tasa de Germinación con y sin NL para el rodal semillero Petate.	34
Figura 10. Promedio valor pico con y sin NL para el rodal semillero La Sierra.	36

Figura 11. Promedio valor pico con y sin NL para el rodal semillero Andaluz.	37
Figura 12. Promedio valor pico con y sin NL para el rodal semillero Petate.	37

RESUMEN

Esta investigación buscó establecer si el método de congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido era aplicable para la crioconservación de tres rodales semilleros de melina, por lo tanto la pregunta de investigación planteada fue ¿Cuál es el efecto en la viabilidad y la germinación que ocasiona la crioconservación por el método de congelamiento rápido a semillas de los rodales semilleros de *Gmelina arborea* Andaluz, Petate y La Sierra?; a partir de la pregunta, se planteó la hipótesis que hacia referencia a que el método de congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido, si afectaría el potencial de germinación y la viabilidad de las semillas de los tres rodales semilleros de melina.

El presente estudio se adelantó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Unidad de Biotecnología Vegetal, Pontificia Universidad Javeriana, ciudad de Bogotá D.C y para su desarrollo se sumergieron semillas de tres grupos de rodales semilleros de 10 gramos cada uno, con diferentes contenidos de humedad; posteriormente previa imbibición por 24 horas, se les realizó un test de germinación en turba por 24 días, para constatar que pese a su ultra desecación continuaban siendo viables y estaban vivas.

Se utilizaron tres rodales semilleros de *Gmelina arborea*: Andaluz, Petate y La Sierra; y las variables medidas fueron: Contenido de Humedad, Índice GC, Índice GRI, Índice GV y Viabilidad; la información recolectada se ordenó en tablas y en gráficas y para las pruebas de hipótesis se hizo análisis de varianza y se aplicó la prueba de Duncan, esto permitió concluir que la utilización del método de inmersión directa en nitrógeno líquido de semillas afecta el porcentaje y velocidad de germinación de las semillas de los tres rodales semilleros de melina.

ABSTRACT

This research establishes if the rapid freezing method by immersion in liquid nitrogen could be standardized for cryopreservation of three melina seed stands. Therefore the research question posed was What is the effect in viability and germination caused for the cryopreservation by the method of rapid freezing in three seed stands of *Gmelina arborea* Andaluz, Petate y La Sierra?; from the question, the hypothesis was, that the rapid freezing method for direct immersion in liquid nitrogen would affect the germination potential and viability of three seed plots of melina.

The present study is advancing in the Laboratory of Plant Tissue, Biotechnology Unit, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C, and for its development three groups of seed stands of 10 grams each were immersed in three different proportions of silica gel at four different times thereafter; after soaking for 24 hours, a germination test was conducted for 24 days, and it was found that despite ultra drying the seed stands remained viable and alive.

The author used three seed stands of *Gmelina arborea*: Andaluz, Petate and La Sierra, and the variables were: Moisture Content, GC Index, GRI index, GV index and viability. The information collected is ordered in tables and graphs for hypothesis testing, a variance analysis and Duncan's test applied, it concluded that the use of the method of immersion in liquid nitrogen affected the seed germination percentage and the speed of seed of the three seed plots of melina.

1. INTRODUCCIÓN

La *Gmelina arborea* Roxb. es una planta forestal exótica nativa del sureste asiático, pertenece a la familia Verbenaceae y se caracteriza por ser una especie de corta vida cuya edad no supera los 30 años. Alcanza hasta 30 metros de altura y entre 60 - 100 centímetros de diámetro. Su principal cualidad es su acelerado crecimiento hasta los 5 o 6 años de haber sido plantada. Cuando alcanza la altura de los ejemplares adultos, su crecimiento se vuelve lento (Obregón Sánchez, 2005).

La especie es de gran interés económico y por su rápido crecimiento se convierte en fuente segura de materia prima para ser usada en diferentes procesos industriales. Su madera es fácil de trabajar, ofreciendo como principal ventaja excelente recepción a los tintes, dejándose matizar para adquirir tonos semejantes a otras especies como el cedro, el roble, el pino, etc., cualidad que le permite ser una madera versátil y una de las mejores opciones para elaborar productos de calidad de mediano o alto valor. Con su madera se pueden elaborar productos primarios o secundarios teniendo así un alto uso industrial y doméstico.

En Colombia existen en promedio 14.000 hectáreas de plantaciones concentradas principalmente en los departamentos de Bolívar, Magdalena, Llanos Orientales, Cundinamarca y otras zonas bajas. La melina es objeto de programas de plantaciones industriales y de reforestación con fines de desarrollo económico y social. Actualmente, Pizano S.A. posee cerca de siete mil hectáreas de melina, en los municipios de Zambrano (Bolívar), El Difícil de Ariguaní, Fundación y San Ángel (Atlántico) y en el municipio de Becerril (Cesar), las cuales hacen parte del programa de mejoramiento de Monterrey Forestal S.A. empresa reforestadora de Pizano S.A. (Obregón Sánchez, 2005).

Una de las principales áreas de trabajo en la potencialización de especies vegetales está dirigido hacia la conservación del material productivo y se está experimentado con la temperatura de almacenamiento y el manejo de la humedad de la semilla; todo material biológico está sujeto al envejecimiento; la estructura y la función de los organismos cambian y se pierde con el tiempo, hasta alcanzar la muerte. Las técnicas de refrigeración permiten retardar el proceso de deterioro, pero la utilización de temperaturas mucho más bajas admite el almacenamiento de organismos vivos en un estado de suspensión animada por periodos extensos (Abdelnour-Esquivel, 2007).

Para el caso de la semilla de melina calificada como ortodoxa o tolerante a la desecación, puede ser almacenada a temperatura que van entre 3 y 5 °C, un contenido de humedad entre 6 y 10%, empacado en bolsas plásticas selladas dentro de recipientes herméticos (Alegría, 2001).

La criopreservación de semillas con nitrógeno líquido es una posibilidad que se ha venido valorando para tratar de establecer una metodología que permita almacenarlas por un largo tiempo sin que pierdan la viabilidad y puedan ser recuperadas, por lo que con el apoyo de Pizano S.A., el Ministerio de Agricultura y la Pontificia Universidad Javeriana se evaluó un protocolo que se aplicó en semillas de tres rodales semilleros (Andaluz, Petate y La Sierra) de *Gmelina arborea* para su criopreservación. El proceso consistió en la preparación y mantenimiento de un material vegetal en unas condiciones de temperatura ultra baja de - 196 °C, obtenida mediante la inmersión directa en nitrógeno líquido (NL) previa desecación con una proporción de 6.5:1 de sílica gel por tiempos de 0, 4, 8 y 12 días. Posteriormente las semillas fueron puestas a germinar en bandejas con turba por 24 días y se les realizó la prueba de viabilidad con Tetrazolio 1%.

Se planteó como hipótesis que la criopreservación de los tres rodales de semillas de *Gmelina arborea* Andaluz, Petate y La Sierra mediante la utilización del método de

congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido, si afectará el potencial de germinación y la viabilidad de las semillas; el propósito era el de hacer una evaluación de crioconservación para semillas de melina, a través de la metodología de desecación en silica gel con diferentes tiempos de exposición, haciéndose evaluación en las etapas de pre y poscongelamiento en nitrógeno líquido. El desarrollo de esta metodología permitirá conservar este valioso material a largo plazo como copia de seguridad de la colección de campo, así como también reducir los costos de mantenimiento y conservación. Se espera que la descripción de la metodología facilite su adopción y uso en diferentes laboratorios y sea de utilidad para el sector forestal.

2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 SEMILLAS

Están compuestas de uno o varios embriones, reservas nutritivas y una o varias capas protectoras originadas a partir de tegumentos del ovulo, del ovario, de los tejidos de otras partes de la flor e incluso de la inflorescencia (Besnier, 1989).

Copeland & McDonald (1995) indican que la formación de la semilla comienza con la combinación de los gametos masculino y femenino en el proceso de fertilización. Este proceso es muy importante no solamente porque da como resultado la formación de la semilla, sino porque determina el nivel de diversidad genética presente en el cigoto.

Dentro del proceso de supervivencia de las especies, estas cumplen una función fundamental puesto que contienen la información genética y es el principal mecanismo de reproducción, por lo que Schmidt (2000) afirma que es muy importante tener en cuenta la definición de semilla que se usa generalmente con un sentido funcional y significa una unidad de reproducción, por tanto este término involucra a las verdaderas semillas como a los frutos que se utilizan con este fin.

Alegría (2001) clasifica a las semillas en:

- Ortodoxas o tolerantes a la desecación: Mantienen su viabilidad en contenidos de humedad menores al 5%.

- Recalcitrantes o sensibles a la desecación: Pierden viabilidad cuando su contenido de humedad se ubica por debajo de un límite crítico, habitualmente entre un 12 a 30% de acuerdo a la especie.
- Intermedias: Es una tercera categoría donde las semillas presentan conductas de almacenamiento entre las ortodoxas y las recalcitrantes. Estas pueden ser desecadas a niveles de humedad similares a los de las semillas ortodoxas. Sin embargo pueden dañarse cuando se someten a bajas temperaturas y su viabilidad desciende rápidamente durante el almacenamiento.

La misma fuente indica que determinar como se comporta la semilla de una especie es muy importante en programas de almacenamiento a largo plazo; la mayoría de las especies silvestres de las zonas templadas del planeta forman semillas ortodoxas. Las semillas recalcitrantes se encuentran en especies acuáticas, especies con semillas de gran tamaño, especies procedentes de zonas tropicales y algunas especies arbóreas de clima templado.

Abdelnour-Esquivel (2007) afirma que el almacenamiento de semillas ortodoxas permite la conservación de la diversidad genética, lo que es importante para proveer materia prima en programas de mejoramiento, evitar los efectos nocivos de la endogamia, así como en la protección contra riesgos de destrucción por plagas y patógenos.

2.2 MELINA (*Gmelina arborea* Roxb.) - VERBENACEAE

Es una especie nativa del sureste asiático, clasificada como una de las más promisorias para ser utilizada en diferentes procesos industriales y en programas de reforestación; por su rápido crecimiento es una fuente segura y rápida de materia prima. Su distribución natural abarca el nordeste de Pakistán hasta el sudeste de Camboya, India, Sri Lanka y el sur de China; en donde se conoce por los nombres

comunes de so, so-maeo, kumhar, sewan, gumadi, shiva o shivani. En África tropical, Centro y Sur América ha sido introducida con éxito en países como Costa Rica, Colombia, Brasil, Venezuela, Trinidad, Cuba y Belice; en donde recibe los nombres de gmelina, gemelina, melina, yemane, gumhar, gamar o teca blanca.

En Europa es conocida como Kashmir tree, malay beechwood o snapdragon y como white teak en Inglaterra, mai saw o yemani en Birmania y le peuplier d'Afrique en Francia.

Su fuste es corto, de 50 a 80 centímetros de diámetro, su corteza es lisa y escamosa, de color marrón pálido o grisáceo. Cuando se encuentra aislado, presenta fuste cónico, copa amplia, ramas abundantes, gruesas y bajas; en plantaciones densas el fuste es menos cónico y limpio. Sus hojas son simples, grandes, opuestas, tienen forma acorazonada y miden de 10 a 20 centímetros de largo y entre 5 y 18 centímetros de ancho. Los frutos son drupas de color amarillento que contiene de 1 a 4 semillas. Con tratamiento germinativo se puede obtener germinación uniforme entre el 70 y 95 %. (Obregón Sánchez, 2005).

Las semillas son ortodoxas, aladas, aplanadas, de 1.5 a 2 cm de largo y 1 cm de ancho aproximadamente, de color parduzco, como pueden observarse en la figura 1.



Figura 1. Semilla de melina germinadas en papel de filtro humedecido.

Fuente: Alfredo Alberto Arrieta Arrieta. 2008.

Prospera de manera natural entre el nivel del mar y hasta los 1500 metros, crece favorablemente en zonas de bosque seco tropical, bosque húmedo tropical o bosque muy húmedo tropical, en temperaturas que van entre los 24 y 35 grados centígrados; Puede crecer en suelos livianos o pesados, de pH ácido o alcalino, ricos en nutrientes y con buenas condiciones de drenaje y luz.

Es muy importante por la calidad de su madera que puede ser utilizada para la obtención de varas para encofrados, piezas para tornería artesanal e industria, estanquillos para uso agropecuario y vigas para construcción rustica si se cosecha entre los 7 y 15 años; para carpintería, construcción de pilotes, pisos, construcción de ferrocarril, ebanistería si se cosecha entre los 15 y 20 años. (Obregón Sánchez, 2005)

2.3 CRIOCONSERVACIÓN

Abdelnour-Esquivel et al (2007) la definen como el almacenamiento de material vivo de interés en nitrógeno líquido (-196°C), donde las semillas pueden ser acopiadas a largo plazo a diferencia de otras modalidades, sin que pierdan su viabilidad; al suspenderse toda actividad metabólica la semilla no sufre mutaciones, las células no se dividen ni se deterioran por lo que se mantiene la estabilidad genética.

En 1776 Spallanzani fue el primero en reportar el mantenimiento de la movilidad en espermatozoides luego de someterlos a bajas temperaturas. Mantagazza en 1866 inició los bancos para el almacenamiento de esperma humana congelada. En 1949 Polge y colaboradores descubrieron la utilidad del glicerol como agente crioprotector para el material biológico preservado a baja temperatura. El congelamiento de esperma humana fue brevemente reportado por Sherman en 1953 (Oskavukcu, et al., 2002).

El primer reporte de un tejido vegetal expuesto a ultra baja temperatura que sobrevivió, fue hecho por Sakai en 1960. Más de una década después se demostró que

cultivos celulares podrían resistir un congelamiento a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ después de un pretratamiento con Dimetilsulfoxido. La metodología aplicada para este procedimiento fue exitosa y consistía en una desecación lenta y una congelación por inmersión rápida en nitrógeno líquido (Engelmann, 1997).

El principio básico para la conservación de semillas es la limitación de los cambios químicos que son originados por el metabolismo o los procesos de envejecimiento. Se sabe desde hace tiempo que unas condiciones de baja temperatura y bajo contenido en humedad prolongan la longevidad de las semillas. De acuerdo a las reglas de Harrington, existe una relación exponencial entre la longevidad de las semillas, la temperatura y el contenido de humedad de almacenamiento, de manera que la longevidad de una semilla se duplica por cada reducción de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la temperatura y por cada reducción de un 1 % en el contenido de humedad. De acuerdo con este modelo, las semillas conservadas a muy bajas temperaturas y con muy bajos contenidos de humedad deberían mantenerse viables durante milenios. Sin embargo, Vertucci y Roos en 1990 y Ellis et al. en 1990 mostraron que existen límites a los efectos beneficiosos de la desecación sobre la longevidad y que estos límites dependen de la composición química de la semilla. También se ha comprobado que, en contra de lo establecido por las reglas de Harrington, los efectos de la temperatura y el contenido de humedad no son independientes (Alegría, 2001).

La crioconservación se hace en nitrógeno líquido (NL) que es almacenado en tanques especiales tapados y resistentes a las bajas temperaturas, donde no se evapora rápidamente; el NL es incoloro, inodoro y no combustible y se mantiene a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ por lo que el contacto con los tejidos provoca el congelamiento del área.

El NL desplaza el oxígeno del aire, por lo que hay que tener cuidado en su manipulación, que debe hacerse en lugares bien ventilados; debido a la facilidad con que se evapora, se requiere controlar su nivel dentro de los tanques de

almacenamiento, para reponer las pérdidas y mantener estable la temperatura y así asegurar la perfecta conservación del material (AGA, 2003).

Alegría (2001) señala que a la conservación de material vivo a muy bajas temperaturas se le conoce con el nombre de criopreservación. En la criopreservación se persiguen temperaturas inferiores a -130°C para alcanzar unas condiciones de ausencia de agua en estado líquido, baja energía cinética molecular y una difusión extremadamente lenta, y así lograr que las reacciones químicas se encuentren prácticamente paralizadas. Bajo estas condiciones, se postulan longevidades extremadamente largas y sólo limitadas por la acumulación de lesiones genéticas producto de la radiación de fondo. Las técnicas de criopreservación utilizan normalmente nitrógeno líquido (-196°C).

El mismo autor ilustra que los protocolos para el almacenamiento en nitrógeno líquido de semillas ortodoxas fueron establecidos por Stanwood y Baas en 1981. Se ha podido comprobar que las semillas ortodoxas de un gran número de especies son capaces de sobrevivir a la criopreservación en nitrógeno líquido. En algunas especies se han observado roturas de las semillas y agrietamiento de las cubiertas seminales. Sin embargo, un control cuidadoso de la velocidad de enfriamiento, el contenido de humedad de la semilla y la velocidad de descongelación pueden ser cruciales para obviar estos daños. Las semillas pequeñas son las que se adaptan mejor a esta técnica, mientras que las especies con semillas grandes y con alto contenido en lípidos son las más problemáticas. Las semillas se almacenan normalmente en recipientes específicamente diseñados para tal efecto en la fase de vapor del interior de tanques que contienen nitrógeno líquido, aproximadamente a -160°C . El nivel de nitrógeno líquido se vigila periódicamente para mantener las semillas almacenadas a la temperatura de -160°C . Las semillas ortodoxas no suelen requerir un enfriamiento gradual. Sin embargo, cuando el contenido de humedad de las semillas es alto puede resultar necesario una desecación previa de las mismas, ya que el contenido de humedad de las semillas es uno de los factores más importantes para controlar la

respuesta de la semilla a la exposición a nitrógeno líquido. Semillas de numerosas especies que presentan contenidos de humedad entre 4 y 12% pueden ser almacenadas directamente en nitrógeno líquido, sin necesidad de desecación previa ni de un enfriamiento gradual. La descongelación de las semillas crioconservadas se puede llevar a cabo colocándolas directamente a temperatura ambiente al sacarlas de los tanques de crioconservación.

En estas circunstancias se evita la necesidad de llevar a cabo controles de viabilidad, responsables de una disminución significativa del número de semillas almacenadas, y se soslayan los riesgos de cambio 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. Por ello, los bancos de crioconservación de semillas ortodoxas constituyen una alternativa interesante a los bancos de semillas convencionales, principalmente para muestras de las que no se dispone gran cantidad de semilla y de las que no es factible realizar nuevas recolecciones (Alegría, 2001).

Existen dos tipos de métodos de congelamiento:

- Método de congelamiento lento: También llamado método convencional o clásico de congelamiento que consiste en someter el material a un descenso gradual de temperatura desde -10 °C hasta -30 °C ó -40 °C antes de introducir el material en el NL. Esto puede realizarse bajando la temperatura a saltos térmicos pequeños (1 °C/1 min.), dando lugar a una baja de temperatura aparentemente continua (Westendorp & Encina, 1998).

En el sistema de congelamiento lento, el hielo comienza a formarse desde el exterior hacia el interior celular. El agua sale hacia el exterior desde el citoplasma y la vacuola lo que provoca una diferencia de potencial osmótico que causa un aumento de la

concentración de soluto en el interior celular, esto va en detrimento de la posibilidad de supervivencia de la célula. Desarrollar este sistema requiere un equipo complejo y de gran costo para que controle la disminución gradual y exacta de la temperatura y el tiempo de permanencia del material en cada estadio térmico programado en el protocolo (Villa et al., 2003).

- Sistema de congelamiento rápido: El material vegetal se pasa directamente al NL a -196°C . Ocurre lo contrario al lento, se forma hielo desde el interior celular al exterior. El agua entra y la diferencia de potencial osmótico provocada es menor que en los métodos lentos, por lo que los daños celulares que ocasiona una alta concentración de solutos no son tan críticos (Chaudhury et al., 2003).

El agua líquida es considerada esencial para la estructura y funcionabilidad de las células vivas, y no es de sorprender que la solidificación de esta por congelamiento sea usualmente letal; paradójicamente, el congelamiento de células por largos periodos de tiempo preserva la viabilidad. Este congelamiento puede aminorar o parar algunas reacciones bioquímicas, pero acelera otras. El agua líquida no se halla por debajo de los -130°C y a esta temperatura solo existe el estado físico de cristalización en donde la viscosidad es tan alta ($>10^{13}$ poises) que la difusión es prácticamente insignificante. Más aún a -196°C no existe suficiente energía térmica para realizar reacciones químicas. Las únicas reacciones que puede ocurrir a -196°C son eventos fotosintéticos como la formación de radicales libres (Oskavukcu, et al., 2002).

Teniendo en cuenta que la mayoría de los materiales mantienen su viabilidad si tienen un porcentaje mínimo del agua, la determinación de la tolerancia a la desecación es uno de los aspectos más importantes en la crioconservación (Mandal et al., 2003).

La viabilidad de material biológico preservado a -196°C en NL es independiente de su periodo de almacenamiento. Guardar material biológico en una nevera

convencional es más fácil que almacenarlo en recipientes óptimos para crioconservación, pero a largo término la viabilidad de este material decrece por no encontrarse a una temperatura adecuada, por debajo de los - 130°C (Oskavukcu, et al., 2002).

Las semillas, después de realizar la desecación y teniendo un recipiente adecuado, se pueden introducir directamente en nitrógeno líquido; lo anterior se debe a que generalmente no existe agua libre entre los espacios celulares de las semillas. Existen reportes que muestran que semillas de varias especies sobreviven a la exposición a bajas temperaturas, pero el conocimiento de su fecha máxima de longevidad es limitado debido a que la crioconservación de material vegetal es relativamente reciente (Towill, 2002 en Reed, 2008).

En la evaluación preliminar para la crioconservación se disminuye el contenido de agua del material vegetal, para así reducir los efectos de la formación de hielo en el congelamiento. Para ello el material se deseca parcialmente antes de la congelación; esto se realiza con gel de sílice (silica gel), que elimina un gran porcentaje del agua contenida en las semillas.

El material vegetal utilizado para la crioconservación debe ser seleccionado de plantas sanas y, en el caso de proceder de material de cultivo in vitro, los parámetros de cultivo se deben optimizar antes de ser sometidas, ya que el éxito de éste proceso depende tanto de los tratamientos utilizados antes de someter el material al NL, como de los utilizados una vez recuperado el material del NL (Westendorp & Encina, 1998).

Por lo general los programas de conservación son motivados por amenazas a los recursos naturales, ya sea por una crisis inmediata o por un factor de riesgo potencial para el futuro. Debido a los múltiples beneficios que aportan, tanto al hombre como a las zonas silvestres, los árboles se enfrentan a más amenazas que la mayoría de los

organismos. El almacenamiento de semillas permite la conservación de la diversidad genética, la que es importante para proveer de materia prima en programas de mejoramiento, para evitar los efectos nocivos de la autogamia y en la protección contra riesgos de destrucción por plagas y patógenos (Abdelnour-Esquivel et al., 2007).

La estandarización de un método de crioconservación requiere que el material vegetal inicial sea siempre tomado del mismo estado fisiológico. Las células vegetales son más difíciles de someter con éxito a ultra bajas temperaturas que otras, debido a su estructura sub-celular (Towill, 2002 en Reed, 2008).

2.4 TEST DE TETRAZOLIO

Es un test que se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenadas, particularmente deshidrogenasas del ácido málico que reduce la sal de Tetrazolio en los tejidos vivos de las semillas, donde los iones de H^+ son transferidos para la referida sal. Cuando la semilla es inmersa en la solución de Tetrazolio, ocurre una reacción de reducción en las células vivas resultando en la formación de un compuesto rojo, no difusible, conocido como trifenilformazán, indicando que hay actividad respiratoria en las mitocondrias y, consecuentemente, que el tejido es viable (vivo). Los tejidos muertos (no viables) no reaccionan con la solución conservando su color natural. Se trata de un test que a través de la observación de la coloración obtenida en las diferentes partes de la semilla permite determinar la presencia, la localización y la naturaleza de las alteraciones en los tejidos de la semilla, permitiendo frecuentemente identificar las causas de la pérdida de la viabilidad y del vigor (Russi et al., 2007).

2.5 ESTUDIOS PRELIMINARES RELACIONADOS

La Red Internacional para el Mejoramiento de Banano y Plátano (INIBAP) financió en 2003 una investigación en el área de la crioconservación de plátano con nitrógeno líquido (-196 °C); esta se llevó a cabo en la Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica, y las técnicas desarrolladas se utilizan actualmente para la crioconservación rutinaria de las accesiones mantenidas por INIBAP (Panis, 2009).

Las técnicas de crioconservación pueden ser aplicables a cualquier tipo de tejido vegetal que tenga potencial de regeneración, estas han sido desarrolladas para más de 112 especies de plantas diferentes, cultivadas de maneras diversas, incluyendo suspensiones celulares, callos, ápices, embriones somáticos y cigóticos. Sin embargo, el uso habitual de la crioconservación aún se restringe casi exclusivamente para la conservación de líneas de células en laboratorios de investigación (Engelmann 1997).

Otro estudio, en batata, ha probado diversas técnicas de crioconservación con resultados muy variables. El método de la gota congelada y el de encapsulación – deshidratación – vitrificación ha sido aplicado en ápices de plántulas in vitro obteniendo resultados promisorios (Pennycooke & Towill, 2000, 2001). El método de encapsulación - deshidratación, por otro lado, ha sido probado únicamente en embriones somáticos observándose un efecto de genotipo como así también una interacción significativa entre genotipo y pretratamiento en la sobrevivencia del explante. Así mismo, no existen reportes del empleo de éste método en ápices caulinares de plántulas in vitro, las cuales presentan la ventaja de una mayor estabilidad genética (Blakesley et al., 1995, Bhatti et al., 1997).

En CORPOICA se han llevado a cabo estudios preliminares para desarrollar e implementar un protocolo de crioconservación para embriones cigóticos de palma de aceite (*Elaeis guineensis Jacq.*), como alternativa para complementar la conservación de genotipos de palma ante las dificultades que se presentan en la colección de campo

en la actualidad. Se evaluaron las etapas de pre y poscongelación de embriones cigóticos con la metodología de desecación en silica gel a diferentes tiempos de exposición (2, 2,5 y 3 h), seguido de un congelamiento rápido y una etapa de recuperación en un medio de cultivo. Todos los tratamientos de crioconservación fueron evaluados con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, con una temperatura media de 28 °C. Previamente se determinó el estado de desarrollo adecuado de los embriones para crioconservar. Además, se realizó la prueba de viabilidad con Tetrazolio para embriones desnudos como un control inicial del rodal semillero solicitado. Se logró establecer un protocolo de crioconservación a partir de embriones cigóticos desnudos de palma, el cual permitió obtener plántulas de embriones congelados en nitrógeno líquido (Rivera et al., 2008)

Experimentando con la técnica de crioconservación en semillas de varias especies recalcitrantes, Abdelnour-Esquivel (2007) encontró que estas sobrevivían al congelamiento en nitrógeno líquido y eran capaces de germinar y formar una nueva planta en condiciones in vitro. Para la crioconservación de especies forestales arbóreas se trabajó en la crioconservación de frutos y semillas de melina (*Gmelina arborea*), teca (*Tectona grandis*), pilón (*Hyeronima alchorneoides*), cenízaro (*Pithecellobium saman*) y madero negro (*Gliricidia sepium*) utilizando la técnica de desecación y congelamiento rápido en nitrógeno líquido. Los frutos recibieron un tratamiento previo a la congelación con 10 mgL⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) o el lijado del endocarpo duro. Los frutos de melina (endocarpo más semilla) fueron incubados en agua o en una solución de 10 mgL⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) durante 30 minutos. Para la crioconservación, los frutos fueron deshidratados en el flujo de aire de una cámara de transferencia de flujo laminar por varios periodos de tiempo (0 a 36 horas). Al final de cada periodo de deshidratación, se tomaron muestras para determinar el contenido de humedad de las semillas. El congelamiento se realizó envolviendo grupos de cinco semillas en papel de aluminio e introduciéndolos rápidamente a un criotermostato que contenía nitrógeno líquido (NL, -196°C). Para los ensayos de crioconservación de teca y pilón y para cenízaro y madero negro, los

frutos y semillas fueron deshidratados utilizando una cámara de desecación que contenía silica gel y ventilación, hasta que alcanzaron porcentajes de humedad aproximadamente del 8%. En los frutos de teca y pilón, que al igual que melina presentan un endocarpio duro, se efectuó un lijado del endocarpio (papel lija # 100) y posteriormente se incubaron en la solución de 10 mg/l de GA₃ por una hora antes del congelamiento. El congelamiento de los frutos y semillas se efectuó por inmersión directa en el NL. Después de una hora en almacenamiento, los materiales se sacaron del nitrógeno líquido y se dejaron descongelar por media hora a temperatura ambiente. Pasado este periodo, los materiales se llevaron al invernadero, donde fueron sembrados directamente en el sustrato de germinación (suelo y granza de arroz, 1:1) y se aplicó riego diariamente. La sobrevivencia se evaluó después de 6 a 8 semanas, con base en el porcentaje de semillas germinadas. Para los frutos de melina se presentaron porcentajes de humedad que variaron del 14,1% al 7,3% después de periodos de deshidratación de 0 a 36 horas y los frutos mostraron porcentajes de germinación de alrededor del 50%, excepto cuando los frutos presentaron un 9,3% de humedad, en donde la germinación fue del 70%. Cuando los frutos se incubaron en GA₃, se observó un incremento en el porcentaje de germinación, y alcanzaron porcentajes del 86% al 63% dependiendo del contenido de humedad. Cuando los frutos fueron congelados en NL sin haber recibido el tratamiento previo con GA₃, se observaron porcentajes de germinación similares a aquellos que presentaron los frutos tratados con GA₃ y sin congelar, lo que pareció indicar que en estos casos el rango de humedad que presentaban los frutos de melina en el momento del congelamiento fue adecuado. Una situación similar se observó al comparar la germinación de frutos incubados en el regulador del crecimiento. Aquellos frutos que presentaban contenidos de humedad del 9,7% mostraron un 83% y un 90% de germinación en los tratamientos sin NL y congelados en NL respectivamente; mientras que los frutos que presentaban un 8,3% de humedad mostraron un 63% y un 76% de germinación, respectivamente. El GA₃ es un regulador de crecimiento conocido por estimular la germinación de las semillas de muchas especies y, de acuerdo con los resultados que se obtuvieron, melina no es una excepción. Por otra parte, la deshidratación de los

tejidos evitó la formación de cristales de hielo que pudieran romper o desestabilizar las membranas durante el congelamiento y descongelamiento de los materiales, lo que permitió una mayor sobrevivencia (Abdelnour-Esquivel et al., 2007).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Establecer si en el método de congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido se pueden identificar parámetros útiles para el congelamiento (crioconservación) que permitan realizar una evaluación preliminar para la crioconservación de semillas en tres rodales semilleros de melina (Andaluz, Petate y La Sierra) como una alternativa al almacenamiento en refrigeradores a 4°C.

3.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto en la viabilidad y la germinación que ocasiona la crioconservación por el método de congelamiento rápido a semillas de los rodales semilleros de *Gmelina arborea* Andaluz, Petate y La Sierra?

3.3 HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Hipótesis de trabajo: La crioconservación de los rodales semilleros de *Gmelina arborea* Andaluz, Petate y La Sierra mediante la utilización del método de congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido, si afectará el potencial de germinación y/o la viabilidad de las semillas.

Hipótesis nula: La crioconservación de de los rodales semilleros de *Gmelina arborea* Andaluz, Petate y La Sierra mediante la utilización del método de congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido, no afectará el potencial de germinación y/o la viabilidad de las semillas.

3.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La mayoría de las técnicas de crioconservación se han desarrollado con materiales costosos por la infraestructura que se requiere en un laboratorio y por el alto precio de los equipos.

La experimentación con semillas de *Gmelina arborea* no solo muestran el potencial de la técnica de crioconservación para el almacenamiento de esta y otras semillas de especies arbóreas, sino también que las facilidades de un laboratorio de cultivo de tejidos o cualquier otro similar, no son necesarias para establecer este tipo de colecciones.

La crioconservación de semillas de *Gmelina arborea* por el método de congelamiento rápido es un procedimiento expedito y sencillo, que reduce sustancialmente el esfuerzo y los costos que representan el mantenimiento de colecciones de germoplasma vegetal in vivo o in vitro, evitando los riesgos fitopatológicos y fisiológicos que aparecen en el sostenimiento de los bancos de germoplasma vegetales. Se puede utilizar la crioconservación como alternativa a las técnicas tradicionales de almacenamiento de semillas de *Gmelina arborea* previendo fallas de funcionalidad en los otros sistemas de preservación, teniendo copias extras o duplicado de las semillas en crioconservación.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la crioconservación por el método de congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido, en semillas de diferentes rodales semilleros de *Gmelina arborea* Andaluz, Petate y La Sierra.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de diferentes contenidos de humedad sobre la respuesta germinativa para semillas de los rodales semilleros de *Gmelina arborea* Andaluz, Petate y La Sierra.
- Determinar el contenido mínimo de humedad para semillas de los rodales semilleros de *Gmelina arborea* Andaluz, Petate y La Sierra en el que continúan siendo viables.
- Proponer un protocolo preliminar para la crioconservación de semillas de melina (*Gmelina arborea*).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ESTUDIOS PRELIMINARES

En la estandarización de un procedimiento para la crioconservación de semillas de melina (*Gmelina arborea* Roxb.) según el método de congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido, se utilizaron previamente tres proporciones diferentes de silica gel en tres grupos de semillas de 10 gramos cada una, en cuatro tiempos diferentes, siendo 0 días el control, como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Proporciones de silica gel utilizadas en diferentes tiempos.

	12 DIAS	8 DIAS	4 DIAS	0 DIAS
Proporción Semillas 13:1 silica gel(g)	Contenido de humedad< 3%	Contenido de humedad< 4%	Contenido de humedad< 4%	Contenido de humedad> 12%
Proporción Semillas 6.5:1 silica gel(g)	Contenido de humedad< 5%	Contenido de humedad< 6%	Contenido de humedad< 7%	Contenido de humedad> 12%
Proporción Semillas 4:1 silica gel(g)	Contenido de humedad< 8%	Contenido de humedad< 10%	Contenido de humedad< 12%	Contenido de humedad> 12%

Los estudios preliminares mostraron que la sobrevivencia disminuyó al aumentar el tiempo de desecación. Se escogió la proporción 6.5:1 haciendo mediciones a los 0, 4, 8 y 12 días, para continuar con el trabajo, ya que presentaba las mejores condiciones para la sobrevivencia de las semillas por el contenido de humedad obtenido.

Se le realizó a las semillas un test de germinación en turba por 24 días, para constatar que pese a su ultra desecación continuaban vivas.

Las semillas no fueron escarificadas debido a que en ensayos preliminares realizados en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Pontificia Universidad Javeriana mostraron que no había diferencia significativa entre estas y las que son escarificadas.

5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA

Para el presente estudio se utilizaron semillas de tres rodales de semilleros de *Gmelina arborea* mantenidas a 4°C en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Pontificia Universidad Javeriana: Andaluz, Petate y La Sierra. Las semillas de los tres rodales semilleros fueron suministrados por Pizano S.A.

5.3 VARIABLES DEL ESTUDIO

En la tabla 2 se observan las variables medidas en el ensayo que se diferencian en variables independientes y variables dependientes.

Tabla 2. Variables que se tuvieron en cuenta en el ensayo.

VARIABLES PARA SEMILLAS DE MELINA			
VARIABLE	DEFINICION	INDICADOR	TIPO DE VARIABLE
Rodal semillero	Grupos de semillas suministradas por Pizano S.A.	Denominación por la empresa	Independientes
Tiempo en silica gel	Exposición en silica gel.	Días	
Nitrógeno Líquido	Crioconservante.	Con (presencia) Sin (ausencia)	
Contenido de Humedad	Cantidad de agua que la semilla posee en el momento de ser medido.	%	
Índice GC	Semillas germinadas al final de la prueba con respecto a las puestas a germinar.	%	

Índice GRI	Velocidad de germinación de acuerdo con el total de número de semillas que germinan en un intervalo de tiempo.	Velocidad	Dependientes
Índice GV	Cociente derivado de la división del porcentaje de germinación entre el número de días.	Cociente	
Viabilidad	Intervalo de vida de una semilla, en el cual al ser sometidas a la prueba de Tetrazolio 1% tiñen de rojo.	# de semillas viables	

5.4 MÉTODOS

El estudio se adelantó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Unidad de Biotecnología Vegetal, Pontificia Universidad Javeriana, ciudad de Bogotá D.C.

La totalidad de las semillas fueron previamente tratadas con fungicida en el sitio de recolección ubicado en una finca de Pizano S.A. en inmediaciones del municipio de Zambrano; al llegar a Bogotá los rodales semilleros fueron almacenados en neveras a 4°C para su protección y cuidado; Anexo T fotografías.

5.4.1 DESECACIÓN DE LAS SEMILLAS

Antes de iniciar el proceso en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, las semillas fueron tratadas con Vitavax al 3%. Posteriormente, los tres rodales de las semillas de *Gmelina arborea* se organizaron en grupos de 15 semillas para cada uno,

se colocaron en sobres de papel Kraft (unidad experimental) con tres repeticiones y fueron introducidas en desecador de vidrio con silica gel en proporción 6.5:1 (semillas: silica gel (g)) por intervalos de tiempo de 0 días, 4 días, 8 días y 12 días.

5.4.2 CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS SEMILLAS

Para determinar el contenido de humedad en las semillas de melina (*Gmelina arborea*) se colocaron 10 unidades por cada rodal semillero en un horno eléctrico de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Javeriana, a una temperatura de 130 °C por espacio de ocho horas. Pasado este tiempo, se tomaron por cada uno de los tres rodales semilleros, cinco muestras de diez semillas cada una, para determinar el contenido de humedad. Los resultados de estas pruebas se promediaron para obtener un único resultado de contenido de humedad para cada rodal semillero. La tabla 3 señala el seguimiento realizado al procedimiento.

Tabla 3. Tratamiento para cada rodal semillero.

	RODAL	0 DIAS	4 DIAS	8 DIAS	12 DIAS
SIN NL	Andaluz	X	X	X	X
	Petate	X	X	X	X
	La Sierra	X	X	X	X
CON NL	Andaluz	X	X	X	X
	Petate	X	X	X	X
	La Sierra	X	X	X	X

El contenido de humedad se determino según recomendación ISTA (2005) mediante la fórmula:

$$\% H = \frac{(M_2 - M_3)}{(M_2 - M_1)} * 100,$$

En la cual: M_1 = Peso del recipiente (g), M_2 = peso del recipiente + contenido de la semilla (g) antes del secado (horno eléctrico 130°C por 8 h), M_3 = peso del recipiente + contenido después del secado (g).

5.4.3 TEST DE GERMINACION DE LAS SEMILLAS

De los diferentes periodos, de 0, 4, 8 y 12 días, se sembraron semillas de cada rodal semillero deshidratado en bandejas de germinación con turba y se observaron por 24 días, siendo 0 días en silica gel el control para este tratamiento de secado. Lo anterior con el fin de evaluar su capacidad germinativa. Las ocho bandejas de germinación utilizadas con sus respectivas tapas, fueron lavadas y tratadas con Vitavax 3% antes de depositar la turba humedecida en ellas. Posteriormente se dispusieron en una habitación con temperatura promedio día de 28°C, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, regadas con 1 litro de agua el primer día y con 0.5 litros el día 12.

A partir del sexto día de sembradas las semillas de los tres rodales semilleros de *Gmelina arborea* se hicieron observaciones para reportar la germinación de semillas y desde allí cada dos días hasta el final de la prueba el día 24.

5.4.4 PROCEDIMIENTO CON NITROGENO LIQUIDO – 196°C

Calculado el porcentaje de humedad promedio y verificada la germinación de las semillas desecadas en cada tratamiento, se procedió a realizar el congelamiento por inmersión directa en nitrógeno líquido, depositando grupos de cinco semillas por cada una de las tres repeticiones para cada tratamiento: 0 días, 4 días, 8 días y 12 días en silica gel. Las semillas se envolvieron en papel aluminio y se introdujeron inmediatamente en una nevera de icopor que contenía nitrógeno líquido a -196°C. Estas semillas se sumergieron por espacio de dos horas en el nitrógeno líquido y

después se descongelaron rápidamente al baño de María por espacio de 90 segundos a una temperatura de 37°C.

Las semillas descongeladas se sembraron en turba dispuesta en bandejas, para determinar si germinaban o no después de ser sometidas al NL.

5.4.5 PRUEBA DE VIABILIDAD CON TETRATOLIO 1%

El test de Tetrazolio ha mostrado ser una alternativa promisorio por la confiabilidad y rapidez en la determinación de viabilidad y del vigor de la semilla.

Las semillas de los tres rodales sumergidas en nitrógeno líquido que no germinaron en las bandejas con turba al cabo de los 24 días, fueron sometidas a la prueba de sal de Tetrazolio (2, 3, 5 -Tripheny l-2 HTetrazolium chloride, TTC) para determinar su viabilidad. Esta prueba muestra una coloración rojiza señal de la presencia de tejidos vivos en el embrión, siguiendo instrucciones de la International Seed Testing Association (ISTA, 1992), que recomienda utilizar una concentración del 1% de sal e incubando la semilla en oscuridad a 28 °C, durante 24 horas en oscuridad.

Se determinó la viabilidad de los embriones mediante verificación de la actividad respiratoria, ver figura 2.

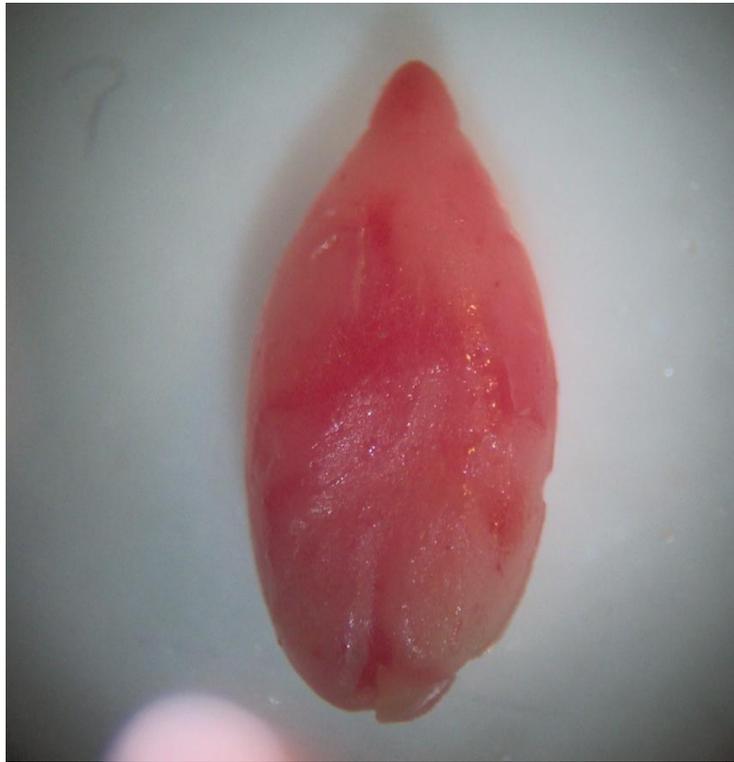


Figura 2. Semilla teñida con Tetrazolio 1%.

Fuente: Alfredo Alberto Arrieta Arrieta. 2009

La prueba permitió observar coloraciones que van desde el rojo, rosado y blanco; la roja indica que el material se encuentra vivo, la rosada que se inicia la pérdida de viabilidad y la coloración blanca total o parcial significa que hay pérdida total de esta viabilidad (Villa et al., 2003).

5.5 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

Para la recolección de información se elaboraron formatos donde se contempla el mapa de las bandejas de germinación para llevar registro ordenados de los brotes, e ir apuntando en observaciones los indicadores de cada variable, como se muestra en el Anexo A.

5.6 ANÁLISIS DE INFORMACIÓN

La información recolectada se ordenó en tablas y en gráficas: para la prueba de hipótesis se hizo Análisis de Varianza para detectar diferencias entre tratamientos y se aplicó la prueba de Duncan para escoger los mejores tratamientos, como se muestra en los Anexos B al O.

6. RESULTADOS

En los índices de germinación definidos, Capacidad de Germinación (Índice GC), Tasa de Germinación (Índice GRI) y Valor Pico (Índice PV) se hace referencia a los tres rodales semilleros (Andaluz, Petate y La Sierra), y se espera que las condiciones dentro de cada uno sean homogéneas y existan ciertas diferencias entre ellos tres.

El modelo estadístico propuesto para cada variables respuesta fue el siguiente:

$$y = \mu + L + Cr + Sl + Cr * Sl + \varepsilon$$

Donde μ es el efecto promedio; L hace referencia al efecto rodal semillero; Cr al efecto del nitrógeno líquido (crioconservante); Sl representa el efecto de aplicar silica; $Cr * Sl$ representa el efecto de la interacción entre aplicar silica y considerar crioconservante y finalmente ε es el error experimental que no es explicado por el modelo.

6.1 CAPACIDAD DE GERMINACION (INDICE GC)

Se define como el porcentaje de semillas germinadas al final de la prueba (Baskin & Baskin, 1998); en las figuras se muestra que cuando no se aplicó el nitrógeno líquido el mayor porcentaje de germinación se presentó en el rodal semillero La Sierra a los 0 días en silica gel (Figura 3).

De igual forma cuando se utilizó nitrógeno líquido el mayor porcentaje de germinación se presentó en el rodal semillero La Sierra a los cero días en silica gel; el menor porcentaje se presento en el rodal semillero Andaluz a los 12 días en silica gel (Figura 3 y 4).

Si comparamos, encontramos que la capacidad de germinación sin nitrógeno líquido presenta unos mayores porcentajes que los que se crioconservaron. Esto se evidencia en el análisis de varianza y el test de Duncan (ver anexo B y C) que muestra la diferencias significativas entre ambos tratamientos; esta diferencia pudo ser ocasionada por la formación de cristales de hielo en los espacios aéreos extracelulares posibilitando daños en las membranas celulares al ser expuestas a ultra bajas temperaturas lo cual se referencia con lo enunciado por Salisbury & Ross en 1994. Ver Figuras 3, 4 y 5.

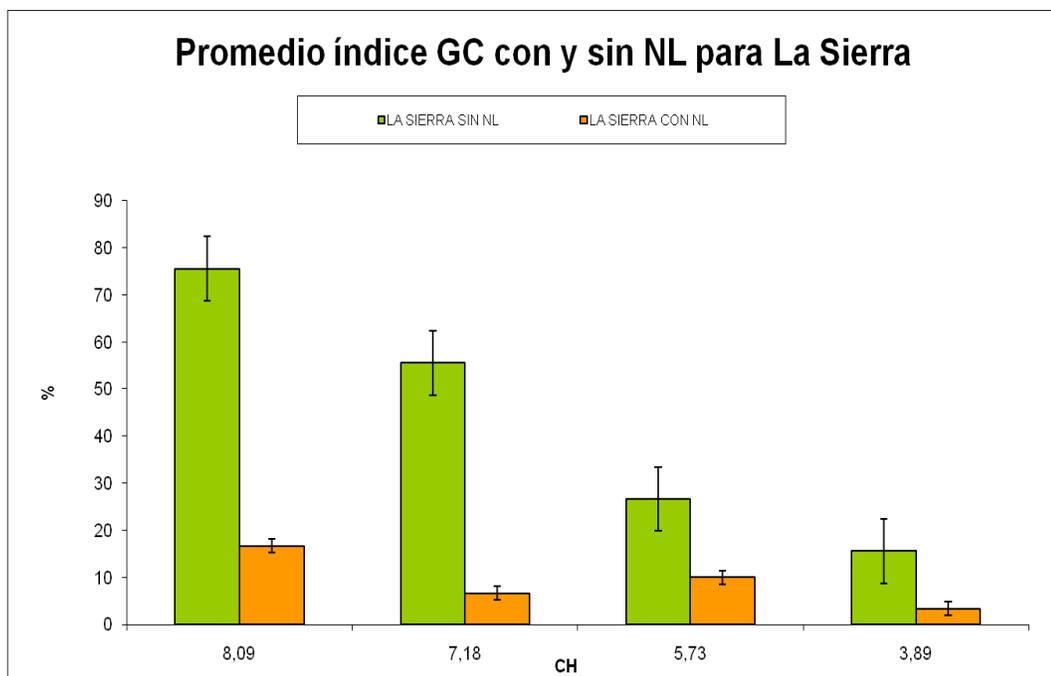


Figura 3. Promedio porcentaje de germinación con y sin NL para el rodal semillero La Sierra

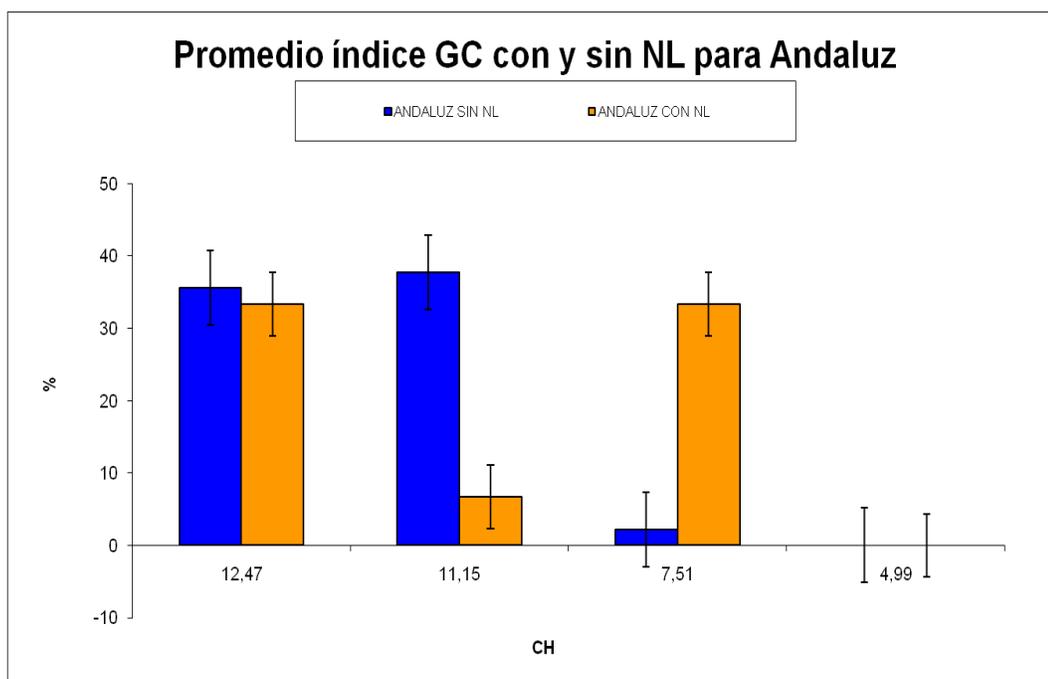


Figura 4. Promedio porcentaje de germinación con y sin NL para el rodal semillero Andaluz

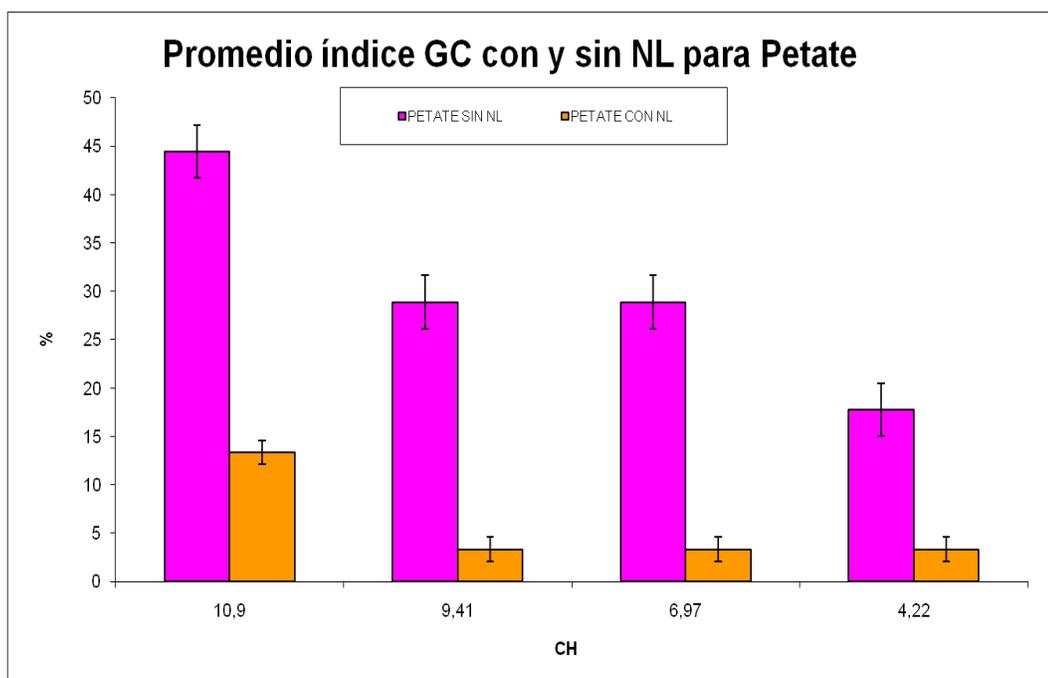


Figura 5. Promedio porcentaje de germinación con y sin NL para el rodal semillero Petate

En la Figura 6 se muestra que los mayores contenidos de humedad se encontraron a los 0 y 4 días de exposición a la silica gel disminuyendo en los 8 días y 12 días; el test de Duncan (anexo D y E) muestra que existe diferencia significativa entre el contenido de humedad de las semillas expuestas a los 0, 4 días y las que estuvieron expuestas 8 y 12 días; pero no se encontró diferencias en los contenidos de humedad de los 8 y 12 días. Lo anterior pudo suceder porque a mayor tiempo de exposición a la silica gel el contenido de humedad tiende a ser menor, lo cual podría afectar la germinación de las semillas.

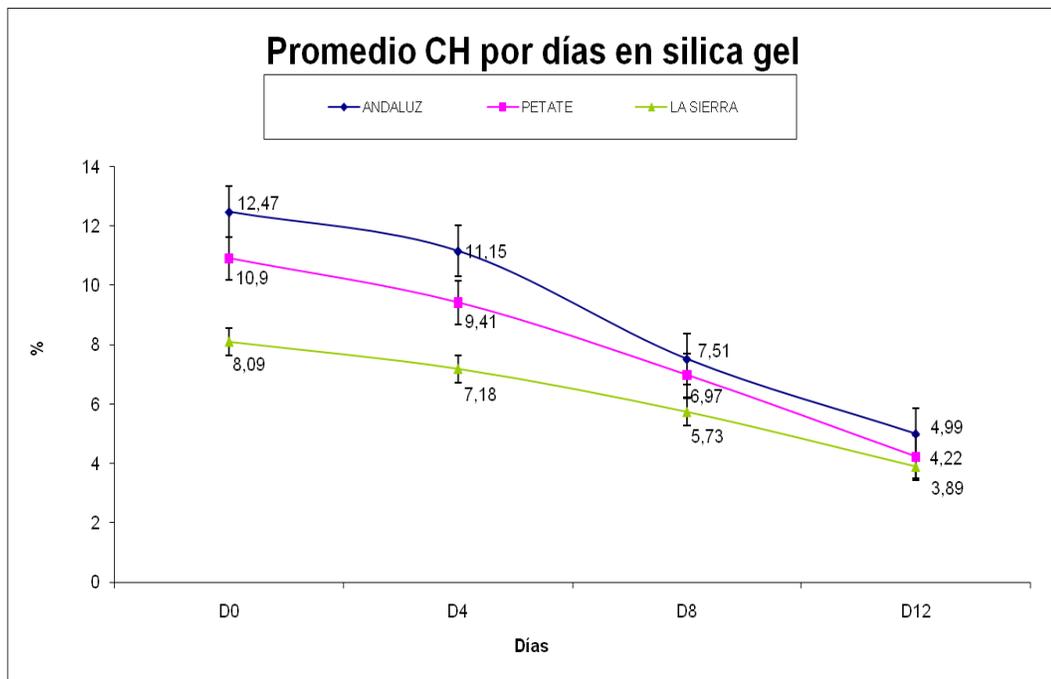


Figura 6. Contenido de humedad (CH) promedio en rodales semilleros Andaluz, Petate y La Sierra.

Cuando se analiza la interacción entre las variables contenido de humedad y NL, se encuentra que la interacción sin nitrógeno líquido a los 0 días en silica gel es significativamente diferente a la interacción sin NL y a los 4 días en silica gel; pero entre las demás interacciones no existe diferencias significativas, como lo confirman los resultados mostrados (Ver Anexo D y E).

6.2 TASA DE GERMINACIÓN (ÍNDICE GRI)

Con respecto a la tasa de germinación, que es el número de semillas que germinan en un tiempo determinado (Baskin & Baskin, 1998), presentó un mejor comportamiento el rodal semillero La Sierra sin y con NL expuesta a 0 días en silica gel. Ver Figura 7.

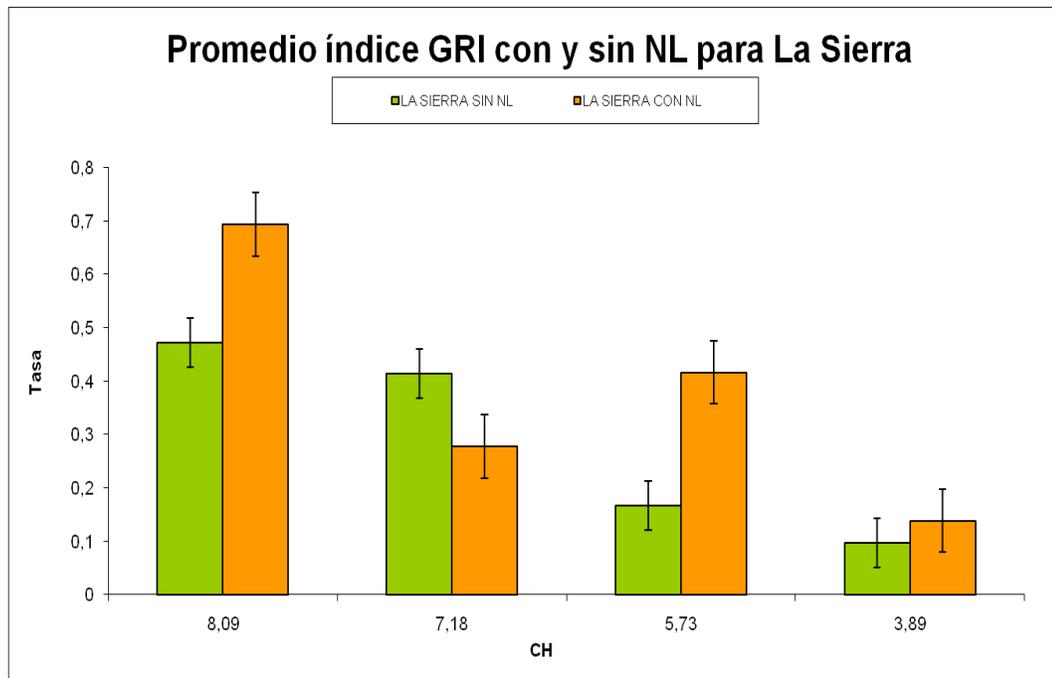


Figura 7. Promedio tasa de Germinación con y sin NL para el rodal semillero La Sierra

Realizado el análisis de varianza (Ver Anexos F y G) se encontraron diferencias significativas en la tasa de germinación de los rodales semilleros Andaluz, Petate y La Sierra, en lo referente a la aplicación de NL y el número de días en silica gel, pero el test de Duncan con un nivel de significancia del 5%, muestra que la tasa de germinación del rodal semillero La Sierra es significativamente diferente a Petate y Andaluz aunque entre estos no se presentó diferencia significativa Ver figuras 8 y 9.

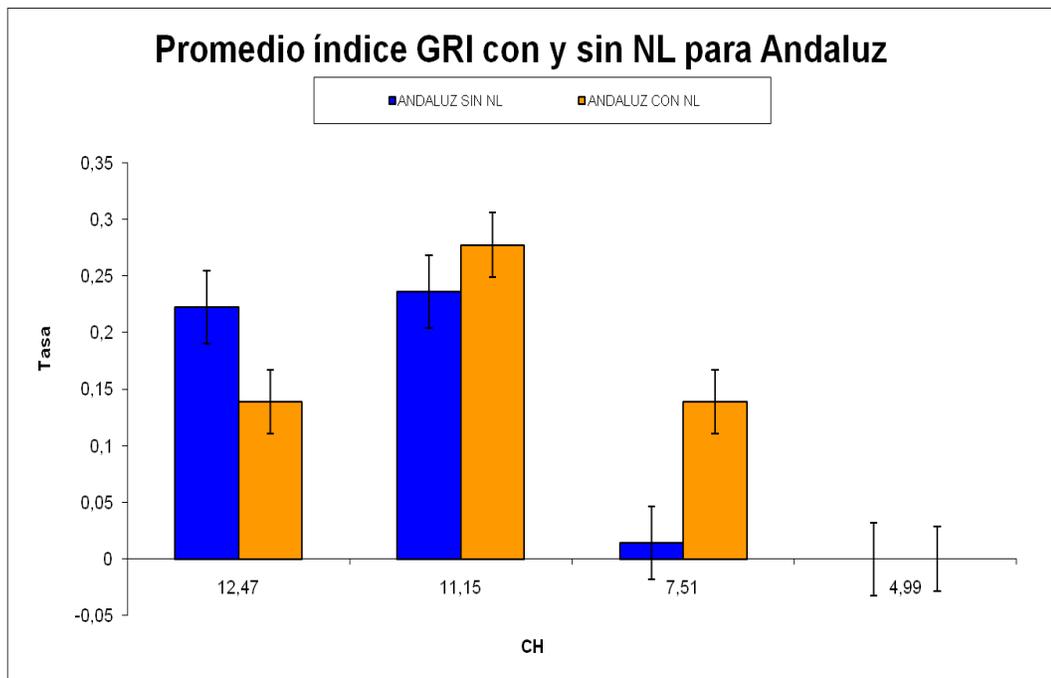


Figura 8. Promedio tasa de Germinación con y sin NL para el rodal semillero Andaluz

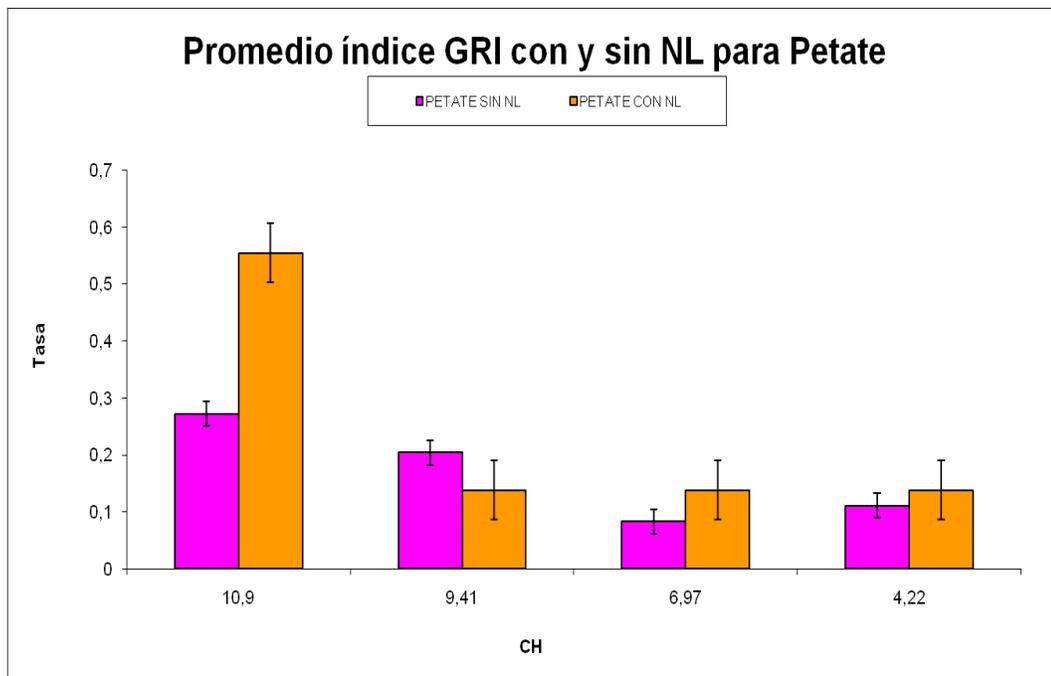


Figura 9. Promedio tasa de Germinación con y sin NL para el rodal semillero Petate

Cuando se compararon los tres rodales semilleros con NL y sin NL se encontraron diferencias entre estos en lo que se refiere a tasa de germinación. Germinaron más rápido las semillas donde no se utilizó NL como se observa en el test de Duncan del anexo H. Esto pudo suceder por efecto de una dormancia inducida por la exposición al NL en donde aparentemente el tiempo de exposición aumenta la dormancia y disminuye la velocidad de germinación.

No existe diferencia significativa entre los rodales semilleros que estuvieron 0 y 4 días en silica gel, así mismo entre 8 y 12 días en silica gel, pero se encontraron diferencias entre los dos grupos. (Ver Anexo I).

Se observa que la capacidad de germinación entre los rodales de semillas que estuvieron 0 y 4 días en silica gel sin NL, no fueron significativamente diferentes, así mismo no se muestran diferencias significativas en los rodales semilleros sin NL a los 8 días y 12 días, con NL a los 0 y 4 días, pero si se muestran diferencias significativas entre ambos rodales (Ver Anexo J).

6.3 VALOR PICO (ÍNDICE PV)

Es el cociente derivado de la división del porcentaje de germinación entre el número de días de germinación (Baskin & Baskin, 1998). Este valor pico presento un mejor comportamiento en el rodal semillero La Sierra sin y con NL y expuesta 0 días en silica gel. Ver Figura 10.

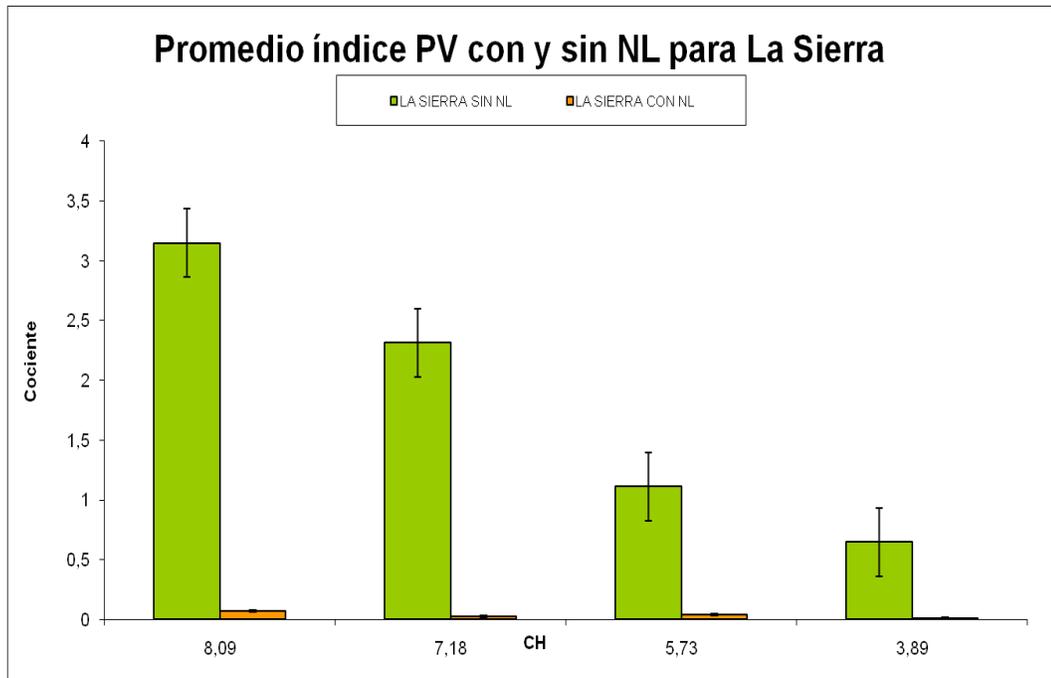


Figura 10. Promedio valor pico con y sin NL para el rodal semillero La Sierra

Realizado el análisis de varianza (Ver Anexos K y L) se encontraron diferencias significativas en el valor pico de los rodales semilleros Andaluz, Petate y La Sierra, en lo referente a la aplicación de NL y el número de días en silica gel.

El test de Duncan con un nivel de significancia del 5%, muestra que los valores pico del rodal semillero La Sierra son significativamente diferentes a Petate y Andaluz pero entre estos últimos no se presentó diferencia significativa. Ver Figuras 11 y 12.

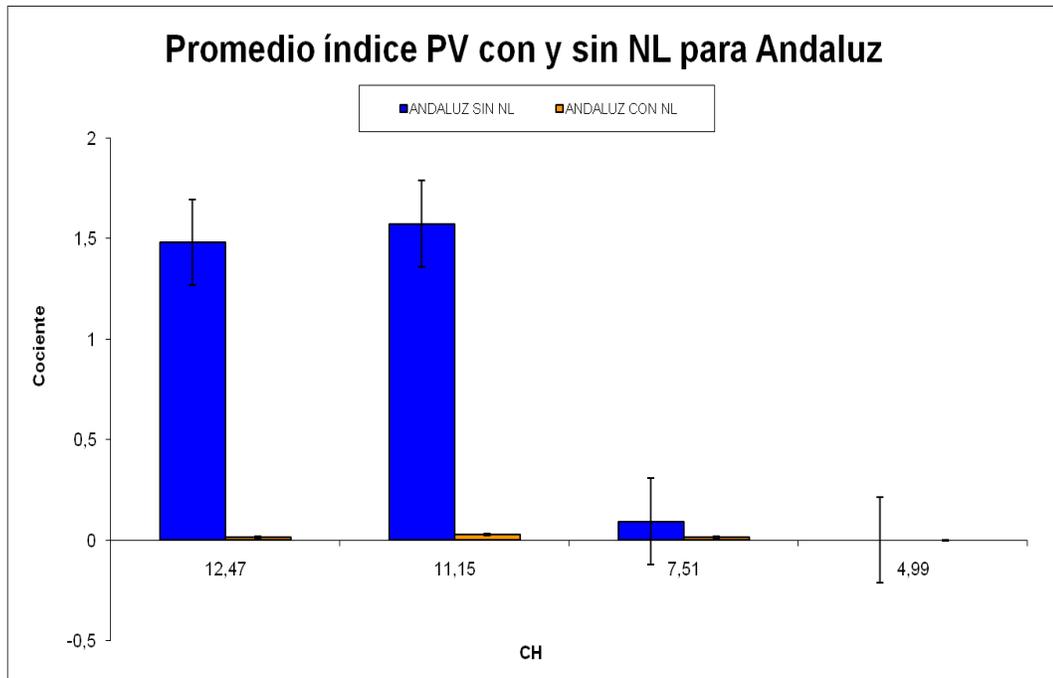


Figura 11. Promedio valor pico con y sin NL para el rodal semillero Andaluz

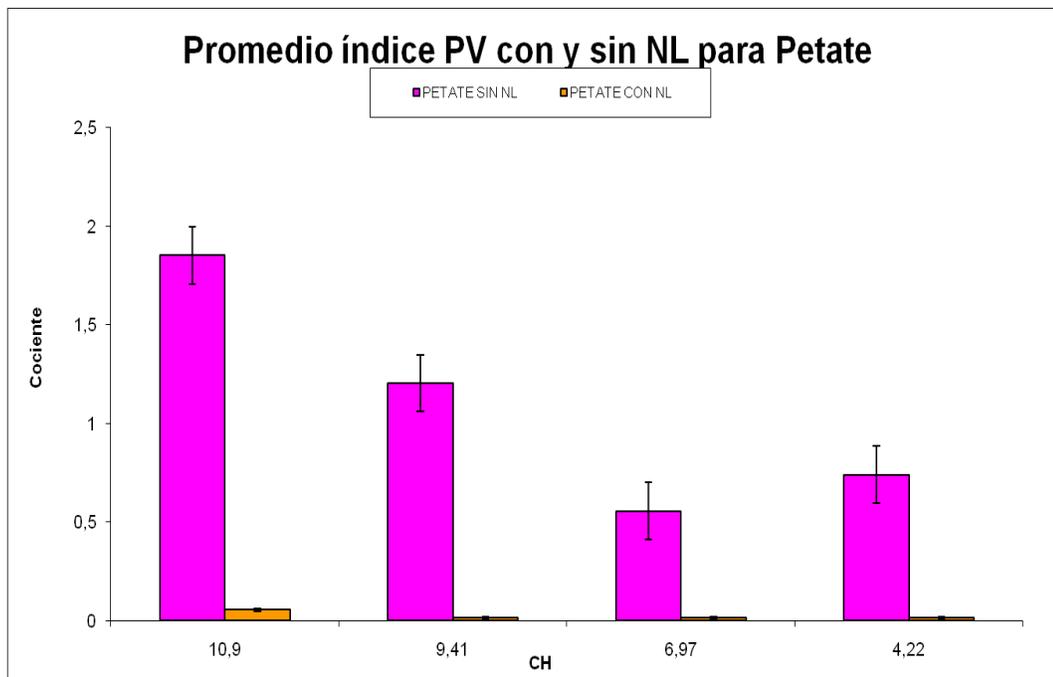


Figura 12. Promedio valor pico con y sin NL para el rodal semillero Petate

Al comparar los grupos sin y con NL se encontró que estos son significativamente diferentes; el grupo sin NL presentó un mejor comportamiento debido a que las semillas tratadas con NL por las bajas temperaturas pudieron verse afectadas en su fisiología en lo referente a su poder germinativo, ya que cuando las células se deshidratan por congelamiento cesan su labor fotosintética (Salisbury & Ross, 1994) Aunque todas estas semillas fueron obtenidas de tres rodales semilleros diferentes, no es de extrañar que los porcentajes de germinación fueran más bajos en los tratamientos que incluyeron la congelación (Ver Anexo M).

Las células están expuestas continuamente a un incremento en la solución hipertónica durante su congelamiento; a una baja tasa de enfriamiento, las células tratarán de mantener el equilibrio con la solución externa. La solución externa se congela antes que el medio intracelular debido al efecto protector de las membranas celulares, así, se da un flujo de agua desde el interior de la célula hacia su exterior. Este efecto se comporta como un cuchillo que resquebraja la célula. Cuando la tasa de enfriamiento se incrementa, existe una menor cantidad de tiempo para el agua se mueva desde la célula hacia afuera, lo que nos puede dar como resultado que un súper enfriamiento eventualmente forme cristales de hielo en los espacios intracelulares, resultando en muerte celular (Oskavukcu, et al., 2002).

En el anexo N se observa que no existe diferencia significativa entre las semillas de los rodales que estuvieron 8 y 12 días en silica gel; pero si se encontraron diferencias significativas entre los contenidos de humedad de 0 días en silica gel, 4 días en silica gel y el par de 8 y 12 días.

Con un nivel de significancia del 5% se encontró que existen diferencias significativas entre los grupos de semillas sin NL a los 0, 4 días y demás tratamientos; así mismo se muestra que no existen diferencias significativas entre los grupos sin NL a los 8 días, sin NL a los 12 días, con NL a los 0 días, 8 días, 4 días y 12 días. Las mejores medias se encontraron en sin NL a 0 y 4 días. (Ver anexo O).

Como se aprecia en la tabla 4 el resultado para la germinación de semillas de *Gmelina arborea* sin diferenciación por rodal semillero presentaron el siguiente comportamiento:

Tabla 4. Porcentaje de germinación promedio sin diferenciación de rodal semillero.

	12 DIAS	8 DIAS	4 DIAS	0 DIAS
<i>Gmelina arborea</i> sin NL	75.55%	55.55%	26.66%	15.55%
<i>Gmelina arborea</i> con NL	16.66%	6.66%	10%	3.33%

En cuanto a las semillas expuestas al NL que no germinaron, una muestra de 108 semillas fueron teñidas con Tetrazolio 1%; 72 resultaron no viables (tinción rosa y blanca) y 36 viables (tinción roja). Estos números nos señalan que existe una alta diferencia, lo que indica posible baja tolerancia al NL.

En la prueba de Tetrazolio 1%, el análisis de varianza y la prueba de comparación de promedios de Duncan mostraron que las evaluaciones de sobrevivencia con Tetrazolio no presentaron diferencias significativas entre éstas (Ver Anexos P, Q, R y S).

7. DISCUSION

Tanto en angiospermas como en gimnospermas el método más habitual de propagación es a partir de semillas. El período que comprende desde la germinación de la semilla hasta el establecimiento de las plántulas es el más vulnerable de todo el ciclo vital, ya que la semilla en germinación está expuesta a drásticas variaciones en contenido de humedad y temperatura.

El período de germinación se caracteriza a través de dos parámetros: el porcentaje de semillas que germinan y la velocidad de germinación. Cuando estos parámetros se estudian bajo condiciones óptimas controladas resulta posible estimar la germinación. Estos factores dependen esencialmente de la existencia de dormancia, la presencia de infecciones microbianas, el tamaño de la semilla, su edad y las condiciones de almacenamiento. La baja germinación de una muestra de semillas puede constituir una grave limitación para una propagación efectiva.

En la crioconservación de semillas, la utilización de nitrógeno líquido (-196°C) asegura las temperaturas ultrabajas y la independencia de la electricidad. Esta metodología tiene una gran ventaja y es que requiere de un espacio muy reducido, permite que el material esté protegido de la contaminación, ya que una vez almacenado no se manipula y el mantenimiento requerido por la colección es mínimo (Abdelnour-Esquivel, 1999).

La dormancia o incapacidad del embrión para germinar debido a causas inherentes a la propia semilla suele ser a menudo uno de los factores que limita en mayor medida la germinación de semillas.

Existen dos categorías básicas de dormancia en función de la localización de los mecanismos que bloquean la germinación. A menudo, la semilla presenta dormancia porque los tejidos que envuelven al embrión (cubiertas seminales, endospermo, pericarpio) impiden la germinación. Los mecanismos que impiden la germinación en la dormancia impuesta por las cubiertas pueden ser interferencia con la absorción de agua o con el intercambio de gases, restricciones mecánicas, retención de inhibidores procedentes del embrión y suministro de inhibidores al embrión. Este tipo de dormancia no se rompe hasta que la cubierta resulta dañada por la actividad microbiana, por procesos de congelación o por el fuego. Por tanto, la manera de eliminar este tipo de dormancia, al objeto de incrementar el porcentaje de germinación de las semillas, consiste en llevar a cabo una escarificación de las cubiertas. Dependiendo de la especie, la escarificación puede llevarse a cabo por métodos mecánicos (papel de lija), químicos (ácido sulfúrico) o sometiendo a las semillas a elevadas temperaturas, en agua caliente (calor húmedo) o en una estufa (calor seco) (Iriando & Pérez, 1999).

Por el contrario, se dan casos en los que la naturaleza de la dormancia reside en el propio embrión y en donde la eliminación de las cubiertas no permite la germinación del embrión. En algunas orquídeas los embriones no se encuentran totalmente formados en el momento de la dispersión de las semillas y necesitan tiempo para madurar. Más frecuentemente, la dormancia del embrión es consecuencia de la presencia de inhibidores en el mismo. El balance entre reguladores de crecimiento endógenos, inhibidores y promotores de la germinación resulta afectado por las condiciones ambientales externas que pueden llegar a romper la dormancia (Bewley & Black, 1994).

Algunas semillas requieren ser imbibidas en agua a cierta temperatura durante algún tiempo. Esto se puede conseguir almacenando las semillas entre capas de arena u otro sustrato humedecido, procedimiento denominado estratificación. Otros factores que pueden romper este tipo de dormancia son la alternancia de temperaturas, el lavado

de inhibidores solubles al agua o la imbibición en soluciones de ácido giberélico (Iriando & Pérez, 1999).

Los resultados obtenidos en este estudio son diferentes a los de la investigación de Abdelnour-Esquivel et al., (2007) que evaluó la crioconservación de especies forestales arbóreas, entre ellas la *Gmelina arborea*. La diferencia consiste en que se dejó de lado tanto la escarificación de semillas como el tratamiento con GA₃ que hizo Abdelnour-Esquivel, se aumentó el tiempo de deshidratación y el descongelamiento se hizo en baño María.

Los mayores porcentajes de germinación obtenidos en la investigación de Abdelnour-Esquivel et al. en 2007 con las semillas incubadas en el regulador de crecimiento y desecadas durante 12 y 24 horas (90% y 76% de germinación, respectivamente) pudieron deberse en parte al contenido de humedad (alrededor del 9%), pero, sobre todo, al efecto del GA₃.

En este estudio, el mayor porcentaje de germinación se presentó para el rodal semillero La Sierra a los 0 días de desecación en silica gel, cuando la semilla de *Gmelina arborea* presenta un contenido de humedad promedio de 8.09%. El menor porcentaje de germinación lo obtuvo el rodal semillero Andaluz a los 12 días en silica gel, cuando su porcentaje de humedad promedio era de 4.99%. Todas las plántulas germinadas con y sin NL presentaron una morfología normal.

El menor contenido de humedad promedio lo mostró el Rodal semillero La Sierra con 3.89% a los 12 días en silica gel, y exhibió una germinación mínima; el rodal semillero Petate a los mismos 12 días de exposición a silica gel tenía un contenido de humedad promedio de 4.22% y no presentó ninguna germinación. Esto se puede deber a que en efecto, la germinación no solamente se encuentra asociada al contenido de humedad de las semillas sino también a la composición genética de la semilla para cada rodal semillero.

Para aclarar lo anterior, se recomienda ensayar hasta con 16 días de desecación en sílica gel para que el contenido de humedad promedio de las semillas sea inferior al 4% y realizar un estudio de la composición química de las semillas de cada rodal semillero; de esta forma se acercará al punto en el que no exista diferencia entre la presencia o ausencia de NL en la germinación de las semillas.

Referente a la evaluación de viabilidad de semillas que no germinaron, la prueba de Tetrazolio 1% que produce tinción del tejido vivo, es probable que se hayan calificado como muertas semillas con pérdida avanzada de viabilidad debido a que presentaron tinción muy deficiente o no haya habido tinción, por lo cual pudo haberse dado una subestimación de lo observado.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo proponen una evaluación preliminar para la crioconservación de semillas de melina (*Gmelina arborea* Roxb.) utilizando el método de congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido, realizado entre Agosto de 2008 a Diciembre de 2008 en sus estudios preliminares y de Enero de 2009 a Septiembre de 2009 en su desarrollo.

1. A los 0 y 4 días de exposición a la silica gel se muestran los mejores resultados en índice y velocidad de germinación para con y sin NL en los tres rodales semilleros.
2. La silica gel afecta el contenido de humedad de las semillas, lo que es resultado de un alto tiempo de exposición a este agente y adicionalmente incide en una pérdida de viabilidad, aunque podría mejorar las condiciones para el almacenamiento.
3. Se comprueba la hipótesis de la investigación; la utilización del método de inmersión directa en nitrógeno líquido de semillas de tres rodales semilleros si afecta tanto el porcentaje de germinación como su viabilidad.
4. El rodal semillero la Sierra presentó siempre el mejor comportamiento germinativo tanto con NL como sin NL.
5. La regulación de las condiciones de estrés en las semillas, la estabilidad metabólica, los ataques de hongos y otras condiciones deben ser tenidas en cuenta a la hora de realizar el análisis de viabilidad por test de Tetrazolio 1%.

6. Las semillas de *Gmelina arborea* de los rodales semilleros Andaluz, Petate y La Sierra se pueden sumergir directamente en nitrógeno líquido para su crioconservación sin necesidad de reducir su contenido de humedad.
7. Las plántulas sometidas a NL que germinaron presentaron una morfología totalmente normal.
8. La validación de la viabilidad es un parámetro importante a ser considerado en un programa de crioconservación de semillas.
9. Con los resultados alcanzados se puede perfeccionar un protocolo de crioconservación simple de semillas por inmersión directa en NL.

9. RECOMENDACIONES

Con base en las inquietudes despertadas en este trabajo se realizan las siguientes recomendaciones, para permitir la continuidad de los estudios que profundicen los conocimientos hasta ahora adquiridos.

1. Se deben realizar avances para este método de crioconservación ya que la investigación en la materia para esta especie forestal en particular es muy reducida o nula.
2. Se recomienda ampliar el tiempo de exposición de las semillas en silica gel para disminuir aún más el contenido de humedad y obtener una curva de secado hasta llegar a su estabilización.
3. La prueba de Tetrazolio 1% debe aplicarse de una manera en que se facilite el acceso a las semillas en este tipo de drupas duras y gruesas.

10. REFERENCIAS

Abdelnour-Esquivel, A. 1999. Situación actual y perspectivas de las aplicaciones biotecnológicas en la conservación y uso de los recursos fitogenéticos. En: XI Congreso Nacional Agronómico. Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, p. 299-306.

Abdelnour-Esquivel, A., Rojas, G., Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha*. Vol. 20-1: 98-103.

AGA Fano S.A. 2003. AGA (2003: Colombia). Tarjeta de emergencia para el transporte de materiales. Producto químico: nitrógeno líquido [en línea]: <[http://www.aga.com.co/international/web/ig/co/like/gagaco.nsf/repositorybyalias/pdf_temerg_n/\\$file/tarjeta%20de%20emergencia%20nitr%C3%B3geno%20l%C3%ADquido.pdf](http://www.aga.com.co/international/web/ig/co/like/gagaco.nsf/repositorybyalias/pdf_temerg_n/$file/tarjeta%20de%20emergencia%20nitr%C3%B3geno%20l%C3%ADquido.pdf)> [consulta: 23 de Agosto. 2009]

Alegría, Irondo. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Invest. Agr: Prod. Prot. Veg.* Vol. 16 (1): 5-24.

Baskin, Carol C., Baskin, Jerry Mark. 1998. *Seeds ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, London Academic. 666 p.

Besnier, F. (1989). *Semillas: Biología y Tecnología*. Ed. Mundiprensa, Madrid. 524 p.

Bewley J.D., Black M., 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York, 462 pp.

Bhatti, M.H., Percival, T., Davey, C.D.M., Henshaw, G.G., Blakesley, D. 1997. Cryopreservation of embryogenic tissue of a range of genotypes of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) using an encapsulation protocol. *Plant Cell Reports* 16: 802-806.

Blakesley, D., Al-Mazrooei, S., Henshaw, G.G. 1995. Cryopreservation of embryogenic tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas*): use of sucrose and dehydration for cryoprotection. *Plant Cell Reports* 15: 259-263.

Chaudhury, R., Pangdey, R., Malik S. K., Mal, B. 2003. In vitro conservation and cryopreservation of tropical fruit species. IPGRI – NBPGR, 175 – 200.

Copeland, L. O & Kauffman, H. H. 1995. Principles of seed science and technology. 3rd ed. Chapman Hall. New York USA. 409 p.

Engelmann, F. 1997. In Vitro conservation methods. Biotechnology and plant genetic resources. Ed J.A. Callow, B.V. Ford-Lloyd and H.J. Newbury, 119 – 161.

International Seed Testing Association, 1992. Seed Testing International.

International Seed Testing Association, 2005. Seed Testing International

Iriondo J.M., Pérez C., 1999. 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.

Mandal, B. B., Chaudhury, R., Engelmann, F., Mal, B., Tao, K. L., Dhillon, B. S. 2003. Conservation Biotechnology of plant germoplams. NBPGR – IPGRI – FAO, 209 -272.

Obregón Sánchez, Carolina. 2005. *Gmelina arborea*. Versatilidad, renovación y productividad sostenible para el futuro. Revista MM Edición 50: 14-20

Panis B. 2009. Crioconservación de germoplasma de Musa. 2a edición. Guías técnicas No. 9. F. Engelmann y E. Benson, eds. Bioersivity International, Montpellier, Francia. 48 p.

Pennycooke, J.C., Towill, L.E. 2000. Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) by vitrification. Plant Cell Reports 19: 733-737.

Pennycooke, J.C., Towill, L.E. 2001. Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) shoot tips cryopreserved by vitrification and encapsulation – dehydration. Cryo-Letters 22: 381-389.

Oskavukcu, Sinan., Erdemli, Esra. 2002. Criopreservación: Basic Knowledge and biophysical effects. Journal of Ankara medical school. Vol. 24 No. 4: 187-196.

Towill, L.E. 2002, en Reed, Barbara M. 2008. Plant cryopreservation a practical guide. Chapter I: Criopreservación of Germplasm: Introduction and some observations. Springer Science+Business Media. 513 p.

Rivera, Angela. Valbuena, Raúl., Hidalgo, Rigoberto., Moreno, José. 2008. Crioconservación de yemas de microtubérculos de papa *Solanum tuberosum* ssp.

andigena mediante desecado de tejidos. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria (2008) 9(2), 37-44

Russi, Daniela., Bartosik, Ricardo., Rodríguez, Juan., Peretti, Anna. 2007. Adaptación del test de Tetrazolio para la detección rápida de daño en la calidad del trigo por altas temperaturas durante el secado. IX Congreso Argentino de Ingeniería Rural y I del MERCOSUR. Córdoba, Argentina.

Salisbury, F.B. & Ross C.W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica, México. (ISBN 970-625-024-7)

Schmidt, L. 2005. Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. Copenhagen, Denmark: Danida Forest Seed Centre, 511 p.

Villa AL, Sánchez AM. 2003. Crioconservación de una accesión de *Solanum phureja* (Tesis de grado). Universidad del Tolima, Licenciatura en Biología, Ibagué, 55 p.

Westendorp, Nieves & Encina, Carlos., 1998. Encuentros en la Biología (1998: España). Crioconservación de plantas [en línea]: <<http://www.encuentros.uma.es/encuentros98/crioconservacion.htm> > [consulta: 2 de Septiembre. 2009]

11. ANEXOS

Anexo A. Formato de recolección de información.

BANDEJA No. _____ FECHA INICIO _____ FECHA FINALIZACION _____
RODAL 1 _____ RODAL 2 _____ RODAL 3 _____

1	2	13	14	25	26	37	38	49	50	61	62
3	4	15	16	27	28	39	40	51	52	63	64
5	6	17	18	29	30	41	42	53	54	65	66
7	8	19	20	31	32	43	44	55	56	67	68
9	10	21	22	33	34	45	46	57	58	69	70
11	12	23	24	35	36	47	48	59	60	71	72

ANOTACIONES _____

BANDEJA No. _____ FECHA INICIO _____ FECHA FINALIZACION _____
RODAL 1 _____ RODAL 2 _____ RODAL 3 _____

1	2	13	14	25	26	37	38	49	50	61	62
3	4	15	16	27	28	39	40	51	52	63	64
5	6	17	18	29	30	41	42	53	54	65	66
7	8	19	20	31	32	43	44	55	56	67	68
9	10	21	22	33	34	45	46	57	58	69	70
11	12	23	24	35	36	47	48	59	60	71	72

ANOTACIONES _____

Anexo B. Análisis de varianza de la capacidad de germinación (GC).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	2.38527382	0.26503042	19.63	<.0001
Rodal semillero	2	0.28675902	0.14337951	10.62	0.0001
Crioconservante	1	0.9799972	0.9799972	72.6	<.0001
Factor_1	3	0.72629577	0.24209859	17.93	<.0001
Interacción	3	0.39222183	0.13074061	9.69	<.0001
Error	62	0.83694298	0.01349908		
Total correcto	71	3.2222168			

R-cuadrado 0.740259

Anexo C. Test de Duncan para diferenciar la capacidad de germinación sin y con NL.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Nitrógeno líquido
A	0.29444	36	Sin crioconservante
B	0.06111	36	Con crioconservante

Anexo D. Test de Duncan para los diferentes contenidos de humedad.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	factor_1 (diferentes contenidos de humedad)
A	0.31481	18	0 días en silica gel 6.5:1
B	0.23148	18	4 días en silica gel 6.5:1
C	0.09815	18	8 días en silica gel 6.5:1
C	0.06667	18	12 días en silica gel 6.5:1

Anexo E. Test de Duncan entre sin NL a los diferentes días y con NL, con un nivel de significancia del 5%.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Interacción
A	0.51852	9	Sin criopreservante - 0 días en sílica gel 6.5:1
B	0.40741	9	Sin criopreservante - 4 días en sílica gel 6.5:1
C	0.14074	9	Sin criopreservante - 8 días en sílica gel 6.5:1
C	0.11111	9	Con criopreservante - 0 días en sílica gel 6.5:1
C	0.11111	9	Sin criopreservante - 12 días en sílica gel 6.5:1
C	0.05556	9	Con criopreservante - 8 días en sílica gel 6.5:1
C	0.05556	9	Con criopreservante - 4 días en sílica gel 6.5:1
C	0.02222	9	Con criopreservante - 12 días en sílica gel 6.5:1

Anexo F. Análisis de varianza para la tasa de germinación (Índice GRI).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	1.08774856	0.12086095	21.37	<.0001
Rodal semillero	2	0.11757602	0.05878801	10.39	0.0001
Criopreservate	1	0.49670545	0.49670545	87.81	<.0001
Factor_1	3	0.27956101	0.093187	16.47	<.0001
Interacción	3	0.19390608	0.06463536	11.43	<.0001
Error	62	0.35070398	0.00565652		
Total correcto	71	1.43845254			

R-cuadrado 0.756194

Anexo G. Test de Duncan para la tasa de germinación en los tres rodales semilleros.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	RODAL
A	0.16281	24	La Sierra
B	0.09672	24	Petate
B	0.06595	24	Andaluz

Anexo H. Test de Duncan para diferenciar la tasa de germinación entre los grupos con y sin NL.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Nitrógeno líquido
A	0.19155	36	Sin criopreservante
B	0.02543	36	Con criopreservante

Anexo I. Contenidos de humedad a los 0, 4,8 y 12 días.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	factor_1
A	0.18514	18	0 días en silica gel 6.5:1
A	0.15396	18	4 días en silica gel 6.5:1
B	0.05553	18	8 días en silica gel 6.5:1
B	0.03933	18	12 días en silica gel 6.5:1

Anexo J. Test de Duncan para diferenciar el efecto de la interacción en la capacidad de germinación.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Interacción
A	0.32403	9	Sin criopreservante - 0 días en sílica gel 6.5:1
A	0.28481	9	Sin criopreservante - 4 días en sílica gel 6.5:1
B	0.08793	9	Sin criopreservante - 8 días en sílica gel 6.5:1
B	0.06942	9	Sin criopreservante - 12 días en sílica gel 6.5:1
B	0.04626	9	Con criopreservante - 0 días en sílica gel 6.5:1
B	0.02312	9	Con criopreservante - 8 días en sílica gel 6.5:1
B	0.02311	9	Con criopreservante - 4 días en sílica gel 6.5:1
B	0.00924	9	Con criopreservante - 12 días en sílica gel 6.5:1

Anexo K. Análisis de varianza para el valor pico (PV).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	41.54466	4.61607	19.37	<.0001
Rodal semillero	2	4.71751	2.35875	9.9	0.0002
Crioconservante	1	17.37997	17.37997	72.92	<.0001
Factor_1	3	12.44677	4.14892	17.41	<.0001
Interacción	3	7.00041	2.33347	9.79	<.0001
Error	62	14.77678	0.23834		
Total correcto	71	56.32144			

Anexo L. Test de Duncan con un nivel de significancia del 5% para los tres rodales semilleros.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	RODAL
A	1.0781	24	La Sierra
B	0.6655	24	Petate
B	0.4629	24	Andaluz

Anexo M. Test de Duncan con un nivel de significancia del 5% para los valores picos.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Nitrógeno líquido
A	1.2268	36	Sin crioconservante
B	0.2442	36	Con crioconservante

Anexo N. Test de Duncan para los valores pico del Factor_1.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	de factor_1
A	1.3117	18	0 días en silica gel 6.5:1
B	0.9436	18	4 días en silica gel 6.5:1
C	0.4089	18	8 días en silica gel 6.5:1
C	0.2778	18	12 días en silica gel 6.5:1

Anexo O. Test de Duncan para los valores picos de las diversas interacciones.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Interacción
A	2.1604	9	Sin criopreservante – 0 días en silica gel 6.5:1
B	1.6975	9	Sin criopreservante – 4 días en silica gel 6.5:1
C	0.5864	9	Sin criopreservante – 8 días en silica gel 6.5:1
C	0.4629	9	Sin criopreservante – 12 días en silica gel 6.5:1
C	0.4629	9	Con criopreservante – 0 días en silica gel 6.5:1
C	0.2315	9	Con criopreservante – 8 días en silica gel 6.5:1
C	0.1898	9	Con criopreservante – 4 días en silica gel 6.5:1
C	0.0926	9	Con criopreservante – 12 días en silica gel 6.5:1

Anexo P. Análisis de varianza para la prueba de tinción por Tetrazolio.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	460.055556	65.722222	7.5	<.0001
Rodal	2	0	0	0	1
factor	3	0	0	0	1
tinte	2	460.055556	230.027778	26.26	<.0001
Error	100	875.944444	8.759444		
Total correcto	107	1336			

Anexo Q. Test de Duncan con un nivel de significancia del 5% para las semillas teñidas con Tetrazolio.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	RODAL
A	6	36	Andaluz
A	6	36	La Sierra
A	6	36	Petate

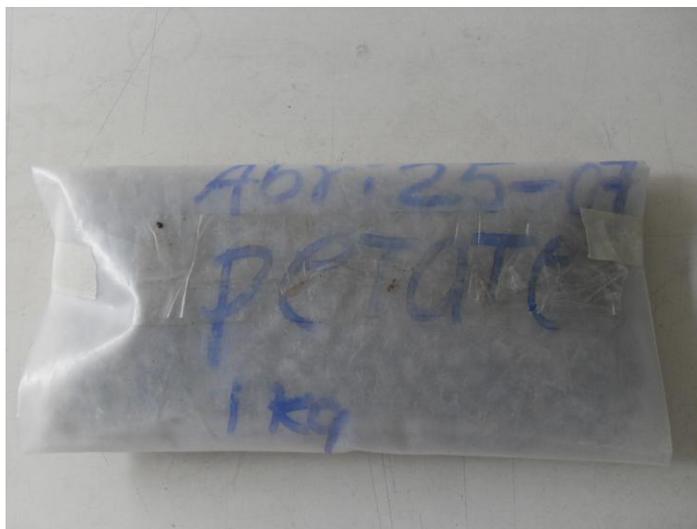
Anexo R. Test de Duncan para los valores pico del Factor.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	factor
A	6	27	0 días en silica gel 6.5:1
A	6	27	12 días en silica gel 6.5:1
A	6	27	4 días en silica gel 6.5:1
A	6	27	8 días en silica gel 6.5:1

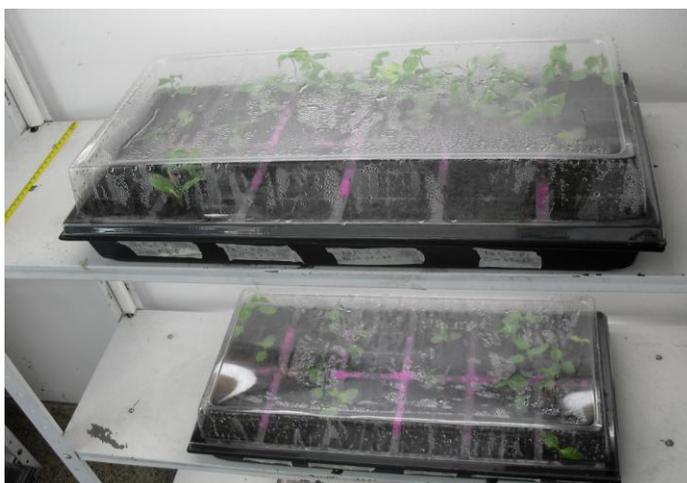
Anexo S. Test de Duncan para viabilidad de semillas.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	tinte
A	7.1111	72	No Viable (blanco y rosa)
B	3.7778	36	Viable (Rojo)

Anexo T. Fotografías.



Semillas rodal semillero Petate empacadas * 1 Kg. Fuente: Alfredo Alberto Arrieta Arrieta. 2009.



Germinación de semillas de melina en bandejas. Fuente: Alfredo Alberto Arrieta Arrieta. 2009.

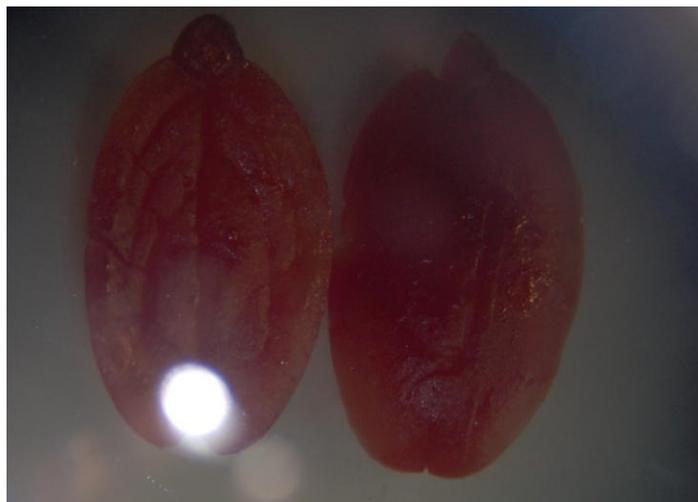


Día 24: Rodal semillero La Sierra



Plántula Germinada: Rodal semillero La Sierra

Finalización de la germinación de semillas de melina. Fuente: Alfredo Alberto Arrieta Arrieta. 2009



Semilla no germinada al cabo de 24 días en turba teñida con Tetrazolio 1% Color rojo: viable.

Fuente: Alfredo Alberto Arrieta Arrieta. 2009.