

## **TEMA:**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y BOTÁNICA DE PLANTAS DE TOMATILLO SILVESTRE (*SOLANUM LICOPERSICUM*) OBTENIDAS A PARTIR DE SEMILLAS CRIOCONSERVADAS Y NO CRIOCONSERVADAS: CONTRIBUCIÓN A LA CONSERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD EN MANABÍ, ECUADOR.**

**AUTORES:** Byron Zevallos<sup>1</sup>, Inaudis Cejas<sup>2</sup>, René Carlos Rodríguez<sup>5</sup>, Justo González<sup>5</sup>, Florent Engelmann<sup>3</sup>, Domenico Carputo<sup>4</sup>, Riccardo Aversano<sup>4</sup>, Marcos Edel Martínez<sup>5</sup>, José Carlos Lorenzo<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López (ESPAM), Campus Politécnico El Limón, Carrera de Ingeniería Agrícola, Calceta, Manabí, Ecuador.

<sup>2</sup> Faculty of Agronomy, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila 69450, Cuba.

<sup>3</sup> IRD, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex, 5, France, E-mail: [florent.engelmann@ird.fr](mailto:florent.engelmann@ird.fr)

<sup>4</sup> University of Naples Federico II, Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, Via Università 100 - 80055 Portici, Italy, E-mail: [raversan@unina.it](mailto:raversan@unina.it)

<sup>5</sup> Laboratory for Plant Breeding, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila 69450, Cuba. E-mail: [jclorenzo@bioplantacuba.cu](mailto:jclorenzo@bioplantacuba.cu). URL: [www.bioplantacuba.cu](http://www.bioplantacuba.cu).

## **Introducción**

El tomate es uno de los cultivos más importantes de la agricultura moderna y por eso se desarrollan numerosos programas de mejoramiento genético en todo el mundo. Tales programas requieren de la conservación de los recursos

genéticos existentes. La presente investigación doctoral se enmarca dentro de los esfuerzos que se realizan a nivel global para evitar todo tipo de erosión genética.

Con la pérdida sin precedentes del germoplasma de plantas que está ocurriendo a nivel mundial, lo cual concierne también al tomate, es relevante conservar *ex situ* los bancos de germoplasma (Roberts, 1991). El almacenamiento de semillas es ciertamente el método más efectivo y eficiente para este tipo de conservación de los recursos genéticos (Linington and Pritchard, 2001). Las condiciones óptimas para el almacenamiento de las semillas incluye el uso de recipientes herméticamente cerrados con un contenido de humedad entre el 3–7% (basado en masa fresca) dependiendo de la especie y a  $-18^{\circ}\text{C}$  o más bajo; tales condiciones garantizan la retención de altos niveles de viabilidad por largos períodos de tiempo, quizás siglos (Pritchard and Dickie, 2003).

La posibilidad del almacenamiento de las semillas por tiempos sustancialmente mayores es probable a temperaturas ultrabajas con el uso de la criopreservación (Pritchard and Dickie, 2003). Bajo la criopreservación, a  $-196^{\circ}\text{C}$ , el material vegetal puede ser almacenado sin modificación o alteración por muy largos períodos de tiempo. Además, los cultivos son almacenados en pequeños volúmenes, protegidos de la contaminación y requieren muy poco mantenimiento (Engelmann, 2004).

Una predicción temprana hecha por Pritchard (1995) sugirió que la longevidad de la semilla a temperatura criogénica podría ser 175 veces mayor que con los métodos tradicionales de conservación de semillas. Más

recientemente, la vida media de las semillas crioconservadas de lechuga se ha estimado en 3,400 años, basado en experimentos desarrollados durante más de 10 años (Walters et al., 2004).

El estado fisiológico del germoplasma antes de ser conservado tiene implicaciones importantes para la estabilidad y viabilidad a largo plazo (Benson, 2008). Además, los parámetros físicos y bioquímicos del material vegetal tienen un efecto en su capacidad para ser almacenado por largo tiempo (Reed, 2001).

En el caso de *Solanum lycopersicum*, las semillas son categorizadas como ortodoxas en cuanto a su comportamiento (Walters et al., 2004). Ellas han demostrado ser tolerantes a la desecación y a la exposición al nitrógeno líquido (Standwood and Bass, 1981; Standwood, 1985).

Actualmente, la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López (ESPAM) lidera un proyecto para coleccionar, caracterizar y conservar la diversidad genética del tomatillo silvestre (*Solanum lycopersicum*) en el cantón Bolívar, cuyos genes podrían ser útiles para futuros programas de mejoramiento genético del cultivo. La investigación incluye la descripción fenotípica in situ y ex situ, así como, el análisis con marcadores moleculares. Además, el establecimiento de un banco de semillas crioconservado forma parte de las acciones a cumplir por el proyecto.

Este artículo presenta algunos efectos de la crioconservación de semillas de tomatillo silvestre en las primeras etapas de la germinación, posteriores a la inmersión en nitrógeno líquido. Se evaluaron los niveles de pigmentos clorofílicos (*a*, *b*, total); malondialdehído; otros aldehídos; y fenoles

(ligados a la pared, libres, totales). Nosotros estudiamos estos compuestos pues ellos están relacionados con un amplio rango de rutas bioquímicas importantes como la respuesta al estrés y la fotosíntesis. Además, tal estudio podría brindar una imagen general de los posibles efectos de la crioconservación en las primeras etapas de la germinación. Hasta donde conocemos, tal información sobre el tomatillo silvestre no ha sido publicada. En la literatura, hay muchos artículos que describen las técnicas de crioconservación (Engelmann, 1999; 2000; 2004; 2010; Engelmann and Tagaki, 2000; Salinas- Flores et al., 2008; Berjak et al., 2010; Forni et al., 2010); pero unos pocos estudios se han desarrollado para entender los efectos bioquímicos de la exposición de las semillas al nitrógeno líquido (Uragami et al., 1993; Lakhanpaul et al., 1996; Harding et al., 2000; Cejas et al., 2012).

Este trabajo también muestra la evaluación del efecto de la crioconservación de las semillas de tomatillo en la conservación de su fenotipo original, no criopreservado. Los caracteres botánicos principales de las plantas crioconservadas y no crioconservadas fueron evaluados. Hasta donde conocemos, este es el primer informe sobre la caracterización fenotípica del tomatillo silvestre originado de semillas criopreservadas.

## **Desarrollo**

Las semillas de *Solanum lycopersicum* (accessión 56) fueron almacenadas durante 4 meses después de la cosecha, a 4°C en la oscuridad, en recipientes herméticamente cerrados. Se usaron semillas con un 12% de humedad. La mitad de las semillas se colocó en crioviales (volumen: 5 ml; 12 semillas por

criovial) y sumergidas en nitrógeno líquido durante 2 semanas. La otra mitad de las semillas continuó almacenada en las condiciones descritas anteriormente y se consideraron como testigos. La recuperación de las semillas del nitrógeno líquido se hizo según Standwood y Bass (1981). De cada tratamiento, las semillas fueron seleccionadas aleatoriamente para ejecutar las siguientes fases de la investigación.

Dos series de experimentos se llevaron a cabo: 1) análisis de las semillas a los 10 días de la germinación (tres réplicas de 10 semillas por tratamiento); y 2) análisis de las plantas a los 120 días de crecimiento en un cantero (90 plantas por tratamiento). Para ejecutar la serie experimental 1, cada determinación bioquímica se ejecutó a partir de tres muestras independiente de 100 mg cada una. Se determinaron los contenidos de malondialdenido y otros aldehídos (Heath y Packer, 1968); clorofilas (*a*, *b*, total (Porra, 2002)); y fenoles (ligados a la pared, libres y totales (Gurr et al., 1992)).

Para completar la serie 2, las semillas germinaron en un semillero y luego se transfirieron a un cantero. La caracterización botánica se ejecutó a los 120 días de crecimiento de las plantas.

Se utilizó el Statistical Package for Social Sciences (Version 17.0 for Windows, SPSS Inc.) para ejecutar t-tests y comparar los dos tratamientos estudiados: semillas no crioconservadas y semillas crioconservadas ( $p \leq 0.05$ ). Luego, el coeficiente general de variación se calculó de la forma siguiente:  $(\text{desviación típica/promedio}) * 100$ . en esta formula, se tomaron en cuenta los valores promedios de cada tratamiento. Por lo tanto, a medida que el coeficiente era mayor, mayor era el efecto de la crioconservación. Los

coeficientes se clasificaron en tres categorías: de 0 a 30%, el efecto de la crioconservación fue considerado como bajo; de 30 a 60% como medio, y de 60 a 90% como muy elevado.

### **Conclusiones**

Varios efectos estadísticamente significativos fueron observados a nivel bioquímico durante las etapas tempranas de la germinación (Tabla 1). Los mayores efectos de la crioconservación se evaluaron en las raíces: niveles disminuidos de clorofilas (a, b, total; OCV: 81.60-84.38%) y fenoles ligados a las paredes celulares (OCV: 80,93%); y contenidos incrementados de malondialdehído y otros aldehídos (OCV: 68,33% y 62,98%, respectivamente). La crioconservación de las semillas también disminuyó significativamente el contenido de fenoles ligados a las paredes y su contenido total en las hojas (OCV: 87,85% y 66,77%, respectivamente). El efecto de la crioconservación en la disminución de los fenoles libres en los tallos también fue clasificado como muy elevado (OCV: 61,09%).

En la presente investigación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el fenotipo de las plantas crecidas en el cantero (Fig. 1, Tabla 2).

### **Agradecimiento**

Esta investigación ha sido posible por el apoyo de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología de Ecuador (SENESCYT); la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López (ESPAM-

MFL), el Institute for Developmental Research (IRD, Francia), la University of Naples Federico II (Italia) y el Centro de Bioplasmas (Universidad de Ciego de Ávila, Cuba).

## Referencias

1. Benson E (2008) Cryopreservation of Phytodiversity: A Critical Appraisal of Theory & Practice. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27:141–219
2. Berjak P, Bartels P, Benson E, Harding K, Mycock DJ, Pammenter NW, Sershen, Wesley-Smith J. (2010) Cryoconservation of South African plant genetic diversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 47:65-81
3. Cejas, I., K. Vives, T. Laudat, J. González-Olmedo, F. Engelmann, M.E. Martínez-Montero, J.C. Lorenzo, Effects of cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. seeds on early stages of germination. *Plant Cell Rep.* (2012) DOI 10.1007/s00299-012-1317-x.
4. Engelmann F (1999) Management of field and in vitro germplasm collections. Proceedings of a consultation meeting—15–20 January 1996, CIAT, Cali, Colombia. International Plant Genetic Resources Institute, Rome
5. Engelmann F (2000) Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: Engelmann F.; Takagi H. (eds) *Cryopreservation of tropical plant germplasm—current research progress and applications.* JIRCAS, Tsukuba, 8–20
6. Engelmann F (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 427–433

7. Engelmann F (2010) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant. Review*. Published on line: 3 November 2010
8. Engelmann F, Takagi H (2000) Cryopreservation of tropical plant germplasm— current research progress and applications. JIRCAS,Tsukuba
9. Forni C, Braglia R, Beninati S, Lentini A, Ronci M, Urbani A, Provenzano B, Frattarelli A, Tabolacci C, Damiano C (2010). Polyamine concentration, transglutaminase activity and changes in protein synthesis during cryopreservation of shoot tips of apple variety Annurca. *CryoLetters* 31 (5) 413-425
10. Gurr S, McPherson J, Bowles D (1992) Lignin and associated phenolic acids in cell walls, p. 51-56, *In* D. L. Wilkinson, ed. *Molecular Plant Pathology*. Oxford Press, Oxford
11. Harding K, Marzalina M, Krishnapillay B, Nashatul Z, Normah M N & Benson E E (2000) . Molecular stability assessments of trees regenerated from cryopreserved Mahogany (*Swietenia Macrophylla* King.) seed germplasm using non-radioactive techniques to examine the chromatin structure and DNA methylation status of the ribosomal RNA genes. *Journal of Tropical Forest Science* 12: 149-163.
12. Heath R, Packer J (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189-198



13. Lakhanpaul S, Babrekar PP & Chandel KPS (1996) Monitoring studies in onion (*Allium cepa* L.) seeds retrieved from storage at -20C and -180C *CryoLetters* 17, 219-232.
14. Linington SH, Pritchard HW (2001) Genebanks, p. pp.165-181, *In* S. Levin, ed. *Encyclopedia of Biodiversity*, Vol. 3. Academic Press, San Diego, CA
15. Porra R (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynth Res* 73:149-156
16. Pritchard HW (1995) Cryopreservation of seeds, p. 133-144, *In* J. G. Day and M. R. McLellan, eds. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Vol. 38. Humana Press Inc., Totowa, NJ
17. Pritchard HW, Dickie JB (2003) Predicting seed longevity: use and abuse of seed viability equations, p. 653-722, *In* R. D. Smith, et al., eds. *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK
18. Reed, BM (2001) Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryoletters* 22:97-104
19. Roberts, E (1991) Genetic conservation in seed banks. *Biol J Linnean Soc* 43:23-29
20. Salinas-Flores L, Adams SL, Wharton DA, Downes MF Lim MH (2008) Survival of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, oocytes in relation to intracellular ice formation *Cryobiology* 56: 28–35
21. Standwood PC, Bass LN (1981) Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Sci Technol* 9:423

22. Standwood PC (1985) Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation, p. 199-226, *In* K. K. Kartha, ed. Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press, Boca Raton, FL
23. Uragami A, Lucas MO, Ralambosoa J, Renard M & Dereuddre J (1993) Cryopreservation of microspore embryos of soilseed rape (*Brassica napus*) by dehydration in air with or without alginate encapsulation *CryoLetters* 14: 83-90.
24. Walters C Wheeler L, Standwood PC (2004) Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology* 48:229-244

**Tabla 2 Caracterización botánica de plantas de tomatillo silvestre crecidas a partir de semillas no crioconservadas y crioconservadas.**

	Plantas de semillas no crioconservadas	Plantas de semillas crioconservadas	OCV (%)**
Longitud del tallo mayor (cm) *	200.3 a	198.8 a	0.53
Longitud del pétalo (mm) *	11.1 a	11.0 a	0.63
Longitud del sépalo (mm) *	5.1 a	5.1 a	0.00
Número de frutos por inflorescencia *	6.9 a	7.3 a	3.98
Masa del fruto (g) *	1.5 a	1.5 a	0.00
Longitud del fruto (mm) *	1.3 a	1.3 a	0.00
Ancho del fruto (mm) *	1.5 a	1.5 a	0.00
Longitud del pedicelo (mm) *	8.1 a	8.1 a	0.00
Espesor del pericarpio (mm) *	0.1 a	0.1 a	0.00
Diámetro del corazón del fruto (cm) *	0.4 a	0.4 a	0.00
Número de lóculos por fruto *	2.1 a	2.2 a	3.28
Brix del fruto (%) *	8.1 a	7.9 a	1.76
pH del fruto *	3.8 a	3.9 a	1.83

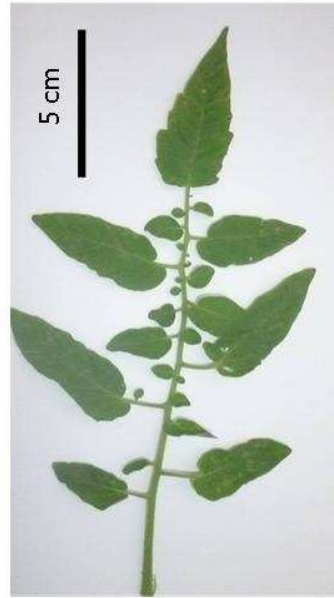
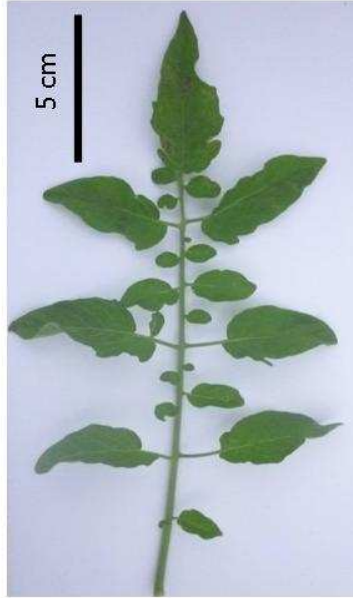
\* Resultados con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (t-test,  $p > 0.05$ ).

\*\* Coeficiente de variación general = (desviación típica/promedio)\* 100. Para calcular el coeficiente, los valores promedios de cada tratamiento fueron tomados en cuenta. A medida que el coeficiente es mayor, mayor es el efecto de la crioconservación.

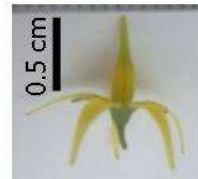
**Materiales de  
semillas no  
crioconservadas**

**Materiales de  
semillas  
crioconservadas**

**Hoja típica de  
mediana edad a  
los 120 días de  
crecimiento de la  
planta.**



**Flor típica  
después de la  
antesis a los 120  
días de  
crecimiento de la  
planta**



**Fuot típico a los  
120 días de  
crecimiento de la  
planta.**



**Figura 1 Efecto de la crioconservación en el crecimiento ex vitro del tomatillo silvestre.**

**Tabla 1 Caracterización bioquímica de plantas de tomatillo Silvestre germinadas de semillas no crioconservadas y crioconservadas.**

	Raíz			Tallo			Hojas		
	Plantas de semillas no crioconservadas	Plantas de semillas crioconservadas	OCV (%)**	Plantas de semillas no crioconservadas	Plantas de semillas crioconservadas	OCV (%)**	Plantas de semillas no crioconservadas	Plantas de semillas crioconservadas	OCV (%)**
Contenido total de clorofilas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	146.28 a	38.22 b	82.83	290.26 a	241.51 b	12.96	583.19 a	581.12 a	0.25
Clorofila a ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	81.19 a	21.78 b	81.60	178.15 a	148.60 b	12.79	218.17 a	216.87 a	0.42
Clorofila b ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	65.08 a	16.44 b	84.38	112.12 a	92.90 b	13.26	365.01 a	364.25 a	0.15
Malondialdehído ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ masa fresca) *	24.35 b	63.45 a	62.98	7.89 b	10.04 a	16.96	45.74 a	46.33 a	0.91
Otros aldehídos ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ masa fresca) *	75.30 b	216.07 a	68.33	61.76 b	69.16 a	7.99	507.55 a	471.91 b	5.15
Contenido de fenoles ligados a la paredes celulares ( $\text{mg g}^{-1}$ masa fresca) *	11.80 a	3.21 b	80.93	6.34 a	2.97 b	51.19	3.22 b	13.78 a	87.85
Fenoles libres ( $\text{mg g}^{-1}$ masa fresca)	4.30 a	3.90 a	6.90	6.58 a	2.61 b	61.09	3.35 b	4.57 a	21.78
Contenido total de fenoles ( $\text{mg g}^{-1}$ masa fresca) *	16.10 a	7.10 b	54.86	12.92 a	5.58 b	56.11	6.58 b	18.35 a	66.77

---

\* En cada órgano de la planta, resultados con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (t-test,  $p > 0.05$ ).

\*\* Coeficiente de variación general = (desviación típica/promedio)\* 100. Para calcular el coeficiente, los valores promedios de cada tratamiento fueron tomados en cuenta. A medida que el coeficiente es mayor, mayor es el efecto de la crioconservación.

---