



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

## **II EVENTO INTERNACIONAL “LA UNIVERSIDAD EN EL SIGLO XXI”**

### **PONENCIA: SIMPOSIO 1**

EL ALMACENAMIENTO A CORTO PLAZO EN NITRÓGENO LÍQUIDO DE SEMILLAS DE TOMATILLO SILVESTRE (*Solanum lycopersicum* MILL.) MODIFICA LOS NIVELES DE FENOLES EN PLÁNTULAS DE 7 DÍAS DE GERMINADAS.

#### **AUTORES:**

Byron Zevallos

Inaudis Cejas

Bárbara Valle

Lourdes Yabor

Carlos Aragón

Florent Engelmann

Marcos Edel Martínez

José Carlos Lorenzo

#### **FECHA:**

**AGOSTO DE 2013**

## INTRODUCCIÓN

La Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López (ESPAM, Ecuador) está conduciendo un proyecto de investigación encaminado a la colecta, caracterización y conservación de la diversidad genética del tomatillo silvestre (*Solanum lycopersicum* Mill.) en el Cantón Bolívar (Sección Centro-Norte de la Provincia de Manabí, 537.8 km<sup>2</sup>), cuyos genes podrían ser útiles para futuros programas de mejoramiento genético del tomate. El proyecto involucra la caracterización *in situ* de las condiciones ambientales donde las plantas crecen, *ex situ* en condiciones experimentales controladas, y con marcadores moleculares. Además, se trabaja en el establecimiento de una colección crioconservada. En el contexto de los criobancos y desde el punto de vista agronómico, el efecto de la exposición al nitrógeno líquido (NL) sobre la viabilidad de las semillas y la germinación deben ser evaluadas para cada material vegetal antes del almacenamiento a largo plazo.

Con la pérdida sin precedentes de germoplasma vegetal que está ocurriendo en todo el mundo, es cada vez más relevante conservar semillas *ex situ* en bancos de genes (Roberts, 1991). Las condiciones recomendadas para la conservación de semillas incluye el uso de recipientes herméticamente cerrados, con humedad relativa entre 3–7% (base a masa fresca) dependiendo de las especies, y la temperatura de almacenamiento de -18°C o menos (FAO-IPGRI, 1994). Tales condiciones garantizan la retención de la alta viabilidad por largos períodos de tiempo, posiblemente siglos (Pritchard and Dickie, 2003). La posibilidad de un almacenamiento más largo puede ser alcanzada con el uso de la crioconservación (NL, -196°C) (Pritchard and Dickie, 2003). Bajo la crioconservación, el material vegetal puede ser almacenado sin alteración por largos períodos de tiempo. Además, los cultivos se almacenan en pequeños volúmenes, protegidos de las contaminaciones y requieren poco mantenimiento (Engelmann, 2004).

Pritchard (1995) predijo que la longevidad de la semillas a  $-196^{\circ}\text{C}$  podría ser alrededor de 175 veces mayor comparado con la alcanzada a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Mas recientemente, la vida media fue calculada en 3 400 años en semillas de lechuga sobre la base de experimentos ejecutados durante más de 10 años (Walters et al., 2004). Estimados comparables de la longevidad de las semillas de lechuga a  $-18^{\circ}\text{C}$ , basados en la ecuación de viabilidad desarrollada por Walters et al. (2004), fueron aproximadamente 46-70 años, 74 veces menos que a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Por lo tanto, como política adicional de seguridad, el uso de la crioconservación debe considerarse para todas las semillas ortodoxas, y una sub-muestra de cada accesión debe almacenarse sistemáticamente en NL, además de la forma clásica de conservación en las condiciones de bancos de genes (Engelmann and Ramanatha, 2012).

El estado fisiológico de las muestras antes de ser crioconservadas tienen un impacto grande en su estabilidad y viabilidad por largos periodos de tiempo (Benson, 2008). Además, los parámetros físicos y bioquímicos del material vegetal tienen un efecto importante en la capacidad para resistir el almacenamiento prolongado. Las fracturas producidas por el estrés térmico de los materiales biológicos durante el enfriamiento y calentamiento pueden causar serios daños a las muestras. Las fracturas ocurren típicamente en órganos grandes como las semillas y son menos comunes en suspensiones celulares y meristemas. La mayoría de los reportes sobre fractures se han hecho en órganos animales más que en plantas (Reed, 2011).

En la literatura hay muchas publicaciones que describen las técnicas de crioconservación (Salinas-Flores et al., 2008; Berjak et al., 2010; Engelmann, 2010; Forni et al., 2010). Por el contrario, pocos estudios se han hecho para entender los efectos bioquímicos de la exposición al NL y a los cambios fisiológicos que ocurren en las semillas después del almacenamiento (Uragami et al., 1993; Lakhanpaul et al., 1996; Harding, 2004; Cejas et al., 2012; Engelmann and Ramanatha, 2012).

La evaluación fenotípica es probablemente la forma más fácil de detectar cualquier cambio después de la criopreservación. En un trabajo reciente ejecutado por nuestro grupo sobre la criopreservación de semillas de *Phaseolus vulgaris*, no se observaron cambios fenotípicos en las plántulas obtenidas de semillas criopreservadas (Cejas et al., 2012). Sin embargo, a nivel bioquímico se encontraron cambios estadísticamente significativos, incluyendo un decremento en los contenidos de proteínas y fenoles y un incremento de los contenidos de aldehydos en brotes, y un decremento en el contenido de fenoles en las raíces. En general, las raíces fueron más afectadas que otros órganos.

Intuitivamente, se espera que las células criopreservadas no deben envejecer más allá del punto fisiológico en el cual se almacenaron en NL. En principio, la criopreservación garantiza la estabilización de las células viables *ad infinitum*, basado en la premisa de que el germoplasma permanece viable, no tiene cambios duraderos y puede recuperarse vivo e inalterado después del almacenamiento (Benson, 2008).

Este experimento fue ejecutado para probar esta hipótesis usando semillas de *S. lycopersicum* Mill. Las semillas se almacenaron en NL durante diferentes períodos de tiempo (0 - 28 días). Después de conservadas, las semillas se colocaron a germinar durante 7 días y se evaluaron los niveles de fenoles en las raíces, tallos y hojas. Nosotros decidimos evaluar el contenido de fenoles sobre la base de un experimento previo que mostró que los contenidos de fenoles variaron significativamente como resultados de la criopreservación (Zevallos et al., aceptado para publicar en Cryoletters).

## **DESARROLLO**

Después de cosechadas las semillas de *S. lycopersicum* Mill. (accesión 56), se almacenaron durante 4 meses a 4°C en la oscuridad en recipientes herméticamente cerrados. Para el experimento se usaron semillas con 12% de humedad basado en la masa fresca (ISTA, 2005). Las semillas se colocaron

con crio-viales (volumen: 2 ml; 50 semillas por criovial) y sumergidas en NL por 7, 14, 21 o 28 días. Las semillas testigo se colocaron a germinar directamente sin la exposición al NL. La recuperación de las semillas del NL se ejecutó de acuerdo con Standwood and Bass (1981).

Las semillas (3 réplicas de 50 semillas por tratamiento) se colocaron en placas de Petri ( $\varnothing$ : 100 mm) con 15 ml de agua destilada durante 7 días (oscuridad,  $27\pm 1$  °C). Las determinaciones bioquímicas se ejecutaron usando tres muestras independientes de 100 mg cada una. Las muestras se maceraron con NL y los contenidos de fenoles (ligados a la pared, libres, totales) se determinaron de acuerdo con Gurr et al. (1992).

El Statistical Package for Social Sciences (Version 17.0 for Windows, SPSS Inc.) se usó para ejecutar ANOVA y pruebas Tukey ( $p\leq 0.05$ ). Luego, los coeficientes de variación general (OCV) se calcularon de la forma siguiente:  $(\text{desviación típica}/\text{promedio}) * 100$ . En esta fórmula, para calcular la desviación típica y el promedio de los cinco tratamientos, se consideraron las cinco medias. Por lo tanto, a medida que las diferencias entre los tratamientos fueran mayores, mayores fueron los OCV.

Tanto el control como las semillas crioconservadas mostraron alrededor del 60% de germinación, sin diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados). No se observaron visualmente cambios fenotípicos en las plántulas a los 7 días de la germinación. Sin embargo, el almacenamiento de las semillas de tomate en NL durante diferentes períodos de tiempo (0-28 días) modificó los niveles de fenoles en las posturas (Fig. 1).

Cuando las semillas se sumergieron por 7, 14 y 21 días, los niveles de fenoles ligados, libres y totales disminuyeron significativamente en las raíces y en los tallos, comparados con el testigo. Sin embargo, sus concentraciones generalmente se incrementaron cuando las semillas fueron almacenadas en NL por 20 días (Fig. 1A, B, C, D, E, F).

En las hojas, se observó un patrón similar en los fenoles libres (Fig. 1H) pero los resultados obtenidos con los fenoles ligados fueron marcadamente diferentes (Fig. 1G). De hecho, los fenoles ligados se incrementaron en las hojas de las plántulas derivadas de semillas crioconservadas durante 7 y 14 días.

De acuerdo con los OCVs (Fig. 1J), el efecto de la duración del almacenamiento en NL fue clasificado como "alto" para los contenidos de fenoles libres en los tallos (Fig. 1E, OCV=110.60%) y "medio" para los contenidos de fenoles totales en los tallos (Fig. 1F, OCV=88.05%), así como, para los fenoles ligados y libres en las hojas (Fig. 1G, OCV=71.67%; Fig. 1H, OCV=73.89%). Los otros OCVs fueron clasificados como "bajos" (Fig. 1).

Se asume que la actividad metabólica y la división celular cesa y el envejecimiento se detiene a la temperatura del NL o su vapor (-196°C a -140°C) (Benson, 2008). Sin embargo, estudios desarrollados por Walters et al. (2004) alertaron que, aunque se asume que el almacenamiento criogénico causa longevidad infinita, los efectos del tiempo sobre la viabilidad no han sido probados, ni teórica ni empíricamente. Walters (2004) analizó la estabilidad biofísica de semillas secas usando la temperatura Kauzmann, i.e. el punto en el cual la estabilidad molecular de los cristales es prácticamente cero, como un indicador de la movilidad molecular. Ella concluyó que la movilidad molecular podía ocurrir aún a la temperatura criogénica, aunque estaba limitada por el estado del agua. Buitink et al. (2000) aplicó la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica para estudiar la rotación de una sonda spin en el citoplasma de semillas, polen y varias especies de plantas, como una función del contenido de humedad y la temperatura. Sus descubrimientos sugirieron que el envejecimiento perjudicial estuvo asociado con la movilidad molecular en el citoplasma.

Aunque las escalas de tiempo observadas por Buitink et al. (2000) y Walters (2004) son diferentes de las empleadas en nuestro estudio (años en su caso, días en el nuestro), sus descubrimientos pueden usarse para explicar

algunos de nuestros resultados. La movilidad molecular que ocurre en el citoplasma durante la crioconservación podría, por ejemplo, inducir cambios en el estrés oxidativo a través de la formación de radicales libres, los que pueden dañar los sistemas membranosos y producir algunas microfracturas. Estos cambios en la compartimentación celular pueden unir algunos compuestos químicos que están aislados en condiciones normales y entonces producir alteraciones en diferentes rutas metabólicas, incluyendo los fenoles.

## CONCLUSIÓN

La inmersión de semillas de tomatillo silvestre en Nitrógeno Líquido durante diferentes períodos de tiempo (0-28 días) modificó los niveles de fenoles, indicando que algún envejecimiento puede haber ocurrido durante el almacenamiento en Nitrógeno Líquido. Estudios adicionales durante períodos mayores se requieren para esclarecer los mecanismos que explican estos resultados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Benson, E., 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critic. Rev. Plant Sci.* 27, 141–219.
- Berjak, P., Bartels, P., Benson, E., Harding, K., Mycock, D., Pammenter, N., Sershen, W., 2010. Cryoconservation of South African plant genetic diversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47, 65-81.
- Buitink, J., Leprince, O., Hemminga, M.A., Hoekstra, F.A., 2000. Molecular mobility in cytoplasm: An approach to describe and predict lifespan in dry germplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2385–2390.
- Cejas, I., Vives, K., Laudat, T., González-Olmedo, J., Engelmann, F., Martínez-Montero, M.E., Lorenzo, J.C., 2012. Effects of cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. seeds on early stages of germination. *Plant Cell Rep.* DOI 10.1007/s00299-012-1317-x.

- Engelmann, F., 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40, 427–433.
- Engelmann, F., 2010. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47, 5-16.
- Engelmann, F., Ramanatha, R., 2012. Major research challenges and directions for future research, in: Normah, M. N., et al. (Eds), *Conservation of Tropical Plant Species*. Springer Verlag, Berlin, pp. 511-526.
- FAO-IPGRI, 1994. Genebank Standards. FAO/Rome and IPGRI/Rome.
- 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, 413-425.
- Gurr, S., McPherson, J., Bowles, D., 1992. Lignin and associated phenolic acids in cell walls, in: Wilkinson, D. L. ed. *Molecular Plant Pathology*. Oxford Press, Oxford, pp. 51-56.
- Harding, K., 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *Cryoletters* 25, 3-22.
- ISTA. 2005. *International Rules for Seed Testing* International Seed Testing Association, Bassersdorf.
- Lakhanpaul, S., Babrekar, P., Chandel, K., 1996. Monitoring studies in onion (*Allium cepa* L.) seeds retrieved from storage at -20C and -180C. *Cryoletters* 17, 219-232.
- Pritchard, H., 1995. Cryopreservation of seeds, in: Day, J., McLellan, M. (Eds), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 133-144.
- Pritchard, H., Dickie, J., 2003. Predicting seed longevity: use and abuse of seed viability equations, in: Smith, R. ed. *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 653-722.
- Reed, B., 2011. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryoletters* 22, 97-104.
- Roberts, E., 1991. Genetic conservation in seed banks. *Biol. J. Linnean Soc.* 43, 23-29.



- Salinas-Flores, L., Adams, S., Wharton, D., Downes, M., Lim, M., 2008. Survival of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, oocytes in relation to intracellular ice formation. *Cryobiology* 56, 28-35.
- Standwood, P., Bass, L., 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Sci. Technol.* 9, 423.
- Uragami, A., Lucas, M., 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.
- Walters, C., 2004. Temperature dependency of molecular mobility in preserved seeds. *Biophys. J.* 86, 1253–1258.
- Walters, C., Wheeler, L., Standwood, P., 2004. Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology* 48, 229-244.