UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESERVACIÓN DE SEMILLAS DE *Agave victoriae-reginae* (AGAVACEAE) Y *Glandulicactus uncinatus* (CACTACEAE), ESPECIES ENDÉMICAS Y EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

TESIS QUE PRESENTA:

BIÓL. VIRIDIANA BEJARANO LEÓN

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ASESOR DE TESIS:
DR. ALEJANDRO MARTÍNEZ PALACIOS

Morelia, Michoacán; Abril 2011.

CONTENIDO

Índice General……i

Índice de Cuadros……ii

Índice de Figuras……...iii

I. Resumen General……..1
II. Abstract ……..3
III. Introducción General ……..5
IV. Hipótesis…….22
V. Objetivos ……23

Efecto en la viabilidad de semillas de *Agave victoriae-reginae* y *Glandulicactus uncinatus,* del almacenamiento bajo diferentes temperaturas y tiempos.

Resumen……...29
Abstract……..31
Introducción ..……...32
Materiales y métodos……...34
Resultados..…….....35
Discusión……..39
Literatura citada…….....42

Efecto de la crioconservación en la viabilidad de semillas de *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) y *Glandulicactus uncinatus* (Cactaceae), especies endémicas de México.

Resumen……..44
Abstract…….45
Introducción…….46
Materiales y métodos……..47
Resultados…….....48
Discusión ……..54
Literatura citada ……....57

VI. Discusión General……60
Literatura citada…….....63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Reportes diversos del uso de semillas de especies endémicas en diferentes países, conservadas en nitrógeno líquido…….19

Cuadro 2. Porcentajes de germinación de semillas de diferentes especies cultivadas, después de diferentes periodos y condiciones de almacenamiento…….....34

Cuadro 3. Análisis de varianza de efectos fijos para los factores: Especies (*A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus*), Meses de almacenamiento (1, 6, 9 y 12), Temperatura de almacenamiento (26, 6, -20, -70 y -196 °C) y sus interacciones……37

Cuadro 4. Análisis de varianza de datos transformados (arcoseno) del Porcentaje del germinación de *Agave victoriae-reginae*……50

Cuadro 5. Viabilidad de semillas de *A. victoriae-reginae,* almacenadas en nitrógeno líquido de 0.5 a 2160 horas……..51

Cuadro 6. Análisis de varianza de datos transformados (arcoseno) del porcentaje de germinación de *Glandulicactus uncinatus*……...52

Cuadro 7. Porcentajes de germinación de semillas de *Glandulicactus uncinatus,* almacenadas en nitrógeno líquido de 0.5 a 2160 horas…….52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta juvenil de *Agave victoriae-reginae* de aproximadamente 4-6 años de edad (1:8) y su distribución geográfica……....11

Figura 2. Ejemplar de *Glandulicactus uncinatus* y su distribución en México……...13

Figura 3. Efecto del tiempo de almacenamiento (1, 6, 9 y 12 meses) en la viabilidad de semillas de A. *victoriae-reginae* y *G. uncinatus* del valor promedio registrado en cinco diferentes temperaturas (26, 6, -20, -70 y -196 °C) de almacenamiento. Letras iguales no son significativamente diferente (DSM α=0.05)……...38

Figura 4. Efecto de la temperatura (26, 6, -20, -70 y -196 °C) en la viabilidad de semillas de *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus* del valor promedio registrado en cuatro periodos de almacenamiento (1, 6, 9 y 12 meses). Letras iguales no son significativamente diferentes (DSM α=0.05)……...39

Figura 5. Porcentajes de germinación de los cuatros periodos y en las cinco temperaturas de almacenamiento en *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus,* letras iguales no son significativamente diferentes (DSM α=0.05)……..40

Figura 6. Análisis de regresión de las medias del porcentaje de germinación de *A. victoriae-reginae* de semillas almacenadas en nitrógeno líquido de 0.5 a 2160 horas……..50

Figura 7. Análisis de regresión de las medias del porcentaje de germinación de *G. uncinatus* de semillas almacenadas en nitrógeno líquido de 0.5 a 2160 horas……..53

Figura 8. Plantas de *A. victoriae-reginae*: a) a las 2 primeras semanas de trasplante de *in vitro* a *ex vitro*, b) Plantas a más de 8 de establecidas bajo condiciones de invernadero 1:80……..54

Figura 9. Plantas de *G. uncinatus:* a) Plántulas a 2 semanas de Trasplante de *in vitro* a *ex vitro*, b) Plantas a más de 8 semanas de establecidas en invernadero 1:80……55

I. RESUMEN GENERAL

La riqueza florística mexicana es notable por su diversidad y endemismo. *Agave victoriae-reginae* y *Glandulicactus uncinatus* se ubican en peligro de extinción por la distribución restringida y por colectas inmoderadas de semillas y plantas para uso ornamental. Ambas ubicadas en el apéndice II del CITES y en la NOM 059, en la categoría de en peligro de extinción y amenazada respectivamente. Las semillas son el material idóneo para la preservación *ex situ* y restablecimiento de poblaciones. La disminución de la humedad de las semillas y descenso de la temperatura de almacenamiento, son los factores más importantes que pueden prolongar la viabilidad de las semillas por muchos años.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura (26, 6, -20, -70 y -196°C) en la preservación (1, 6, 9 y 12 meses) de semillas de ambas especies. Las semillas registraron viabilidad de 75% para *G. uncinatus* y 96% para *A. victoriae-reginae,* previo a todos los ensayos de preservación. Antes de realizar la preservación, se redujo el contenido de humedad y se almacenaron en diferentes temperaturas. Los análisis estadísticos indicaron que hubo diferencias significativas entre las diferentes temperaturas de almacenamiento (P=0.0001) siendo la mejor temperatura de preservación -70 °C para ambas especies ensayadas. En *A. victoriae-reginae*, las medias de germinación en todas las temperaturas de almacenamiento usadas no mostraron diferencias significativas, la especie mantuvo viabilidad 92 % aún en temperaturas de 26 °C hasta 12 meses de almacenada. Caso contrario en *G. uncinatus*, donde se observó una tendencia a disminuir la viabilidad conforme transcurre el tiempo de almacenamiento, 85.7 % en nueve meses de almacenada decae a 84 % a los 12 meses. En cuanto al uso de nitrógeno líquido, en *A. victoriae-reginae* hubo diferencias significativas en los tiempos de almacenamiento bajo este sistema (P=0.0061). En *G. uncinatus* se registraron diferencias significativas en los diferentes tiempos evaluados en nitrógeno líquido (P=0.0108); el almacenamiento bajo este sistema no mostró efectos negativos para las especies ensayadas. Las metodologías establecidas muestran que la

conservación a bajas temperaturas y reducción de la humedad permite conservar semillas de ambas especies. El Nitrógeno líquido puede ser la mejor alternativa por ser la más económica y permite mantener la viabilidad por tiempo indefinido al reportarse que se suspende cualquier actividad metabólica del embrión.

II. ABSTRACT

The Mexican species richness is remarkable for its diversity and endemism. *Agave victoriae-reginae* and *Glandulicactus uncinatus* are placed in danger of extinction due to restricted distribution and immoderate collections of seeds and plants for ornamental use. Both located in Appendix II of CITES and the NOM -059, in the category of endangered and threatened respectively. The seeds are the ideal material for ex situ preservation and restoration of populations. The decrease in seed moisture and lowering the storage temperature are the most important factors that may prolong the viability of the seeds for many years.

The objective of this study was to evaluate the effect of temperature (26, 6, -20, -70 and -196 °C) preservation (1, 6, 9 and 12 months) of seeds of both species. Seed viability of 75 % recorded for *G. uncinatus* and 96 % for *A. victoriae-reginae*, prior to any trial of preservation. Before preservation, decreased moisture content and stored at different temperatures. Statistical analysis indicated that there were significant differences between different storage temperatures (P = 0.0001) being the best preservation temperature -70 °C for both species tested. In *A. victoriae-reginae*, average germination at all storage temperatures used were not significantly different, the species remained viable 92 %, even in temperatures of 26 °C to 12 months of storage. Otherwise in *G. uncinatus*, where there was a tendency to reduce viability as time of storage, 85.7 % in nine months of storage fell to 84 % at 12 months. On the use of liquid nitrogen in *A. victoriae-reginae* significant differences in storage times under this system (P = 0.0061). In *G. uncinatus* significant differences were evaluated at different times in liquid nitrogen (P = 0.0108), the storage under this system showed no adverse effects on the species tested. Established methodologies show that conservation at low temperatures and humidity reduction can save seeds from both species. Liquid nitrogen can be

the best alternative to be the most economical and can maintain viability indefinitely suspending the reported any metabolic activity of the embryo.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las familias Agavaceae y Cactaceae tienen gran importancia para México desde el punto de vista de recurso fitogenético, de diversidad y endemismo, producto de las diversas variaciones en topografía y climas del territorio; ambas familias registran un alto valor comercial ya que son económicamente importantes en el mercado nacional e internacional.

La familia Cactaceae incluye aproximadamente 1,500 especies que se distribuyen únicamente en el continente Americano, desde Canadá hasta la Patagonia. México alberga a más del 70 % de las especies. Por su parte, la familia Agavaceae está constituida por 9 géneros (293 especies) de los cuáles México cuenta con la mayor diversidad, con más de 50 % de las especies (Rzedowski, 1991). La importancia de estos dos grupos de plantas radica en su endemismo, para el caso de las cactáceas la mayoría de los taxones se ubican en grave peligro de extinción (SEMARNAT, 2002; CITES, 2008), se distribuyen de manera natural en un ambiente xerófito, han tenido diversos usos a lo largo de la historia de los asentamientos humanos en ambientes de extrema sequía, y que hasta la fecha son fuente de empleo a comunidades de alta marginación (Gentry, 1982). En las últimas décadas, estas especies a las que se les atribuye valor ornamental, son presa de sobre-colecta a través del saqueo ilegal, lo que las ha puesto en graves problemas de extinción (SEMARNAT, 2002).

La conservación *in situ* de especies amenazadas implica una adecuada protección y gestión de sus ecosistemas. Sin embargo, en un gran número de casos, las diferentes actividades antropogénicas están disminuyendo las poblaciones y las han ubicado en grave riesgo de extinción (Falk, 1989).

Cuando la conservación *in situ* es difícil de realizar, la conservación *ex situ* puede ser una alternativa viable de preservar para evitar la extinción de germoplasma valioso. Tomando en cuenta la importancia de la variación genética, las semillas se presentan como el material idóneo para preservar y recuperar poblaciones (Pavlik *et al.,* 1993). Los bancos de germoplasma *ex situ*, a través de la

preservación de semillas, son una alternativa que han aplicado en diversas especies agrícolas (FAO, 1996), en las últimas décadas se ha enfocando en la conservación de especies silvestres con problemas de extinción (Falk, 1989).

La preservación de semillas es una técnica que ha permitido conservar semillas ortodoxas por más de un siglo (Hartmann y Kester, 1988). Los hallazgos mejor preservados se localizan en climas muy secos, en ambientes congelados o carentes de oxígeno. Estas condiciones han permitido que fisiológicamente las semillas se conserven en buen estado y sean capaces de germinar cuando se les coloca en condiciones adecuadas; ejemplo de esto están especies de semillas de *Canna compacta* (achira), con 600 años de edad al momentos de su germinación; otros ejemplo bien documento son semillas de *Medicago polymorpha* recuperadas de ladrillos de adobe de edificios históricos en el norte de México, germino a la edad aproximada de 200 años, el sitio árido y la testa dura contribuyo a su preservación (Casasola, 1996); en ejemplares de herbarios se han encontrados semillas viables que tenían entre 100 y 158 años: como ejemplos están *Cassis bicapsularis* con 115 años, *Cassis multijuga* con 158 años, *Goodia lotifolia* con 105 años y *Trifolium pratense* con 100; así como varias especies de *Nelumbo* que permanecieron viables entre 121 y 193 años (Casasola, 1996); y un caso muy conocido el de *Phoenix dactylifera*, cuyas semillas fueron datadas con carbono 14 con una edad de 2000 años, cuando germino (LiveSciencie, 2008) .

La baja humedad relativa y temperaturas cercanas al punto de congelación del agua o incluso muy por debajo de éste, permiten prolongar la viabilidad de las semillas ortodoxas (Ellis *et al,* 1989 y Dickie *et al,* 1990). Se ha estimado que la conservación de semillas a temperatura del nitrógeno líquido (-196 ºC) puede suspender cualquier actividad metabólica, lo que prolonga la latencia de las semillas por tiempo indefinido (Pritchard 2008). Para tal hecho, es necesario investigar diversos niveles de refrigeración que permitan mostrar el comportamiento de la viabilidad de semillas para poder generar alternativas de conservación de germoplasma por periodos largos de tiempo y en el mejor de los casos que puedan

permanecer viables de manera indefinida durante su almacenamiento. Investigaciones recientes han demostrado que el congelamiento en nitrógeno líquido de semillas ortodoxas ha generado resultados exitosos (Pritchard, 1995, 2008); ejemplos como *Lathyrus cicera, L. sativus, Lens culinaris, Lupinus albus, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum, Vicia articulata Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum,* todas ellas con porcentajes de viabilidad de 67 a 100 % tras su almacenamiento (Cardoso *et al.,* 2000; Martínez *et al.,* 2010). La criopreservación puede ser adecuada para la conservación de recursos genéticos económicamente importantes (Beardmore y Whittle 2005; Pritchard 2000, 2007, 2008), que pueden ser adecuadas para la conservación de un gran número de especies silvestres con riesgo de extinción. Por lo anterior, se plantea la necesidad de establecer sistemas de conservación *ex situ* para *Agave victoriae-reginae* y *Glandulicactus uncinatus* dos especies endémicas mexicanas y en peligro de extinción, debido a la problemática de sus poblaciones que son presa de la extracción exhaustiva y degradación acelerada de sus hábitats; por lo que mediante análisis del comportamiento de las semillas al sujetarse a diferentes temperaturas de enfriamiento con bajo contenido de humedad, se indicara el sistema más factible para su conservación *ex situ.*

ANTECEDENTES

Diversidad florística de México

Pocos territorios con la dimensión de México tienen una constitución tan compleja, expresada en su relieve escabroso y su variado clima, y que produce el heterogéneo escenario geográfico y físico de una de las biotas más diversas del mundo (Ferrusquía-Villafranca, 1998). Las biotas fanerogámicas de México representan entre 10 y 12 % del total mundial, con lo que es probable que su flora vascular alcance el cuarto lugar en el mundo (Toledo y Ordoñez, 1998), el total de la flora fanerogámica conocida en México se calcula en forma aproximada en 220 familias, 2 140 géneros y 22 000 especies (Rzedowski, 1998). México alberga una elevada proporción de taxa de distribución restringida. El fenómeno es particularmente espectacular en las zonas áridas y semiáridas, donde los endemismos a menudo no sólo se atañen a grupos taxonómicos de rango elevado, sino también a formas biológicas, la proporción de taxa endémicos de México se aproxima a 10 % en el caso de los géneros y a 52 % en cuanto a especies (Rzedowski, 1998).

Diversidad de la familia Agavaceae en México

En nuestro país, la familia Agavaceae ha tenido desde tiempos prehispánicos, gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas, las han aprovechado como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras, abono, construcción de viviendas, entre otros usos (Gentry, 1982). Los agaves son plantas perennes o permanentes con hojas dispuestas en espiral y arregladas en roseta a partir de un tallo central. Las hojas por lo general son suculentas, es decir, que acumulan agua en su interior, como adaptación a los sitios donde crecen (secos o con poca disponibilidad de agua); además, son fibrosas, y comúnmente tienen forma de línea, espada u óvalo (Gentry, 1982). El género *Agave*, es endémico de América. De sus aproximadamente 200 especies, 150 se encuentran en México (esto es 75%), más de 36 pertenecen a categorías infraespecíficas, lo cual constituye un total de 186 taxones, de los cuales 129 son endémicos de México (García-Mendoza, 2007).

Diversidad de la familia Cactaceae en México

La familia Cactaceae, aunque originaria de Sudamérica; ha definido en el país su máxima diversidad, abundancia e importancia con alrededor de 900 especies (Rzedowski, 1998), considerado el país más diverso con 84% de endemismos a nivel especie (Arias, 1993). En nuestro país se registra su mayor diversificación (Rzedowski, 1998). Como centro de diversidad de la familia, en México encontramos también un alto grado de endemismo aproximadamente 18 géneros y 715 especies (Arias, 1993), distribuidas principalmente en matorrales xerófilos, seguidos de bosques tropicales subcaducifolios, caducifolios y espinosos, en estos tipos de vegetación es donde se encuentran mayormente representada la cacto flora mexicana (Rzedowski, 1998).

Factores que ponen en riesgo a ambas familias y la importancia de su conservación.

Entre los principales factores que ponen en estado de amenaza a estas familias, se encuentra el uso que se les da como plantas ornamentales, situación que se remonta a la conquista de América (Bravo-Hollis, 1978). Otro factor es la degradación directa de su hábitat natural, por la llamada civilización (Jurado *et al.,* 1998). De forma más detallada, los factores principales adversos para estos grupos de plantas, y que constituyen una severa amenaza para la flora en general se pueden destacar los siguientes; a) desmontes no planificados para acrecentar la frontera agropecuaria; b) desarrollos urbanos no planificados, con crecimientos hacia sus hábitats; c) incendios forestales; d) sobre explotación de especies; e) erosión de suelos; f) introducción de especies de flora y fauna exótica; g) desarrollo de áreas industriales inadecuadas; h) contaminación ambiental; i) tráfico de especies; j) cambio climático global; k) cambio en el uso del suelo (Zalba *et al.,* 2000; Alvarado *et al.,* 2003; González *et al.,* 2003). Es evidente la acelerada pérdida de la vegetación en nuestro país aunada a la colecta ilegal de las poblaciones, por lo que es de vital importancia conservar especies endémicas ya que su importancia radica en su representación limitada al lugar al que habitan y su desaparición significaría la pérdida de una parte especial de la biodiversidad, con lo que eso significa en cuanto

al estudio de la biología evolutiva, a la pérdida de diversidad genética y a las posibles conexiones de carácter trófico que estas desempeñan (Jurado y Treviño, 1998)

Descripción de la especie *Agave victoriae-reginae* T. Moore

Plantas con tallo compacto en forma de roseta que alcanza 50-90 cm de diámetro. Puede ser solitaria o ramificar con múltiples hijuelos. Sus hojas son cortas, rígidas y gruesas de color verde oscuro con señales distintivas blancas en los márgenes. Las marcas se encuentran a lo largo de la hoja junto a los márgenes, que le dan una apariencia de imagen poliédrica, los márgenes no son dentados, pero al final de la hoja pueden incluir de 1 a 3 espinas cada una de 1-3 cm de longitud. Tiene un tubo floral de 1.80 m, con flores de color amarillo verdoso. Tarda entre 20 y 30 años en florecer, como todos los agaves, muere después de su primera y única floración. Semillas de 3-5 mm de diámetro, color negro, hemisféricas y nervadas en la cara baja marginal (Tomado de Gentry, 1982).

Distribución y hábitat de la especie

Es una especie endémica de México, ubicada en el centro del desierto de Chihuahua, que habita en zonas rocosas de piedra caliza con baja dispersión de arbustos del desierto (Fig. 1).

Clasificación taxonómica (tomado de Gentry, 1982)

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Especie: *Agave victoriae-reginae* T. Moore

Nombre común: Agave de la Reina Victoria, Noa y Pintillo.

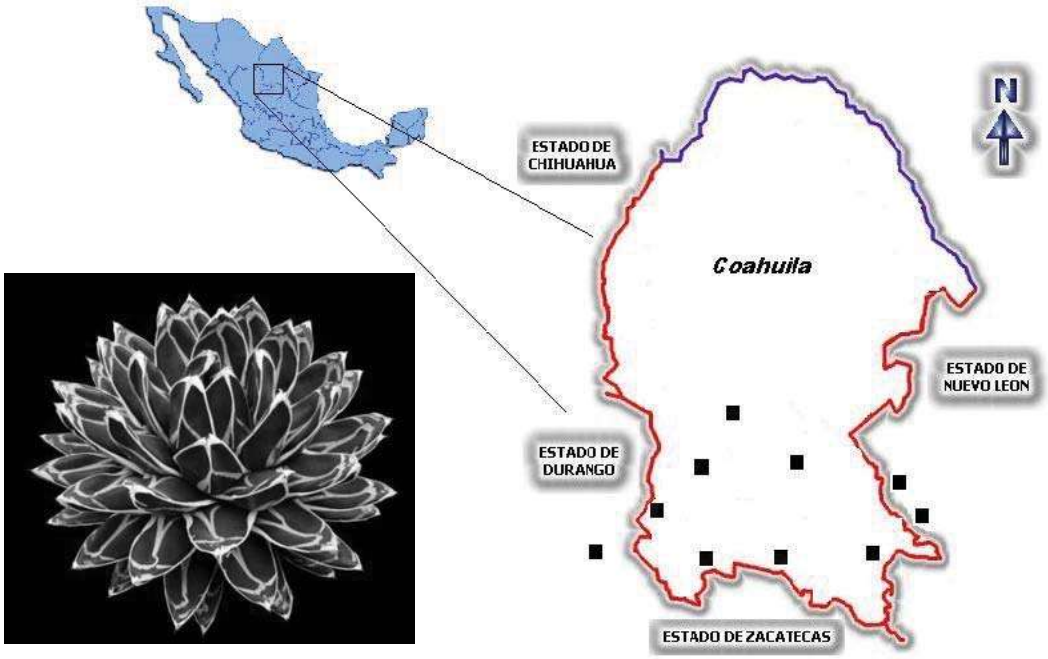

Figura 1. Planta juvenil de *Agave victoriae-reginae* de aproximadamente 4-6 años de edad (1:8) y su distribución geográfica.

Estado de conservación

La colecta ilegal de plantas, semillas y la modificación del hábitat por acciones antropogénicas, han hecho que este catalogada en peligro de extinción por la NOM-ECOL-059-2001 (SEMARNAT, 2002). Está ubicada en el apéndice II de la CITES (CITES, 2008).

Descripción de la especie *Glandulicactus uncinatus* (Galeotti) Backeberg.

Planta simple o cespitosa; tallo cilíndrico, de 7.5 hasta 35 cm de alto y de 5 a 14 cm de diámetro, de color verde glauco, a veces con tinte rojizo; costillas 9 a 13, fuertemente tuberculadas, onduladas; aréolas con la región espinífera circular a oval, con 1 a 3 glándulas amarillentas; espinas radiales 8 a 20, de 2.5 a 5cm de largo, aciculares, de color rojizo o pardo amarillento; espinas centrales 1 a 4, la principal es ascendente, uncinada, de 5 hasta 17 cm de largo, amarillentas o pardo amarillentas. Presenta flores infundibuliformes, de 2 a 2.5 cm de largo, de color rojo purpúreo oscuro; fruto ovoide, de 2 a 2.5 cm de largo, con brácteas de color rojizo; sus semillas son ovoides de color negras de 1 mm de diámetro (Tomado de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Distribución y hábitat de la especie

Se localiza al sur de Estados Unidos, en Nuevo México y Texas; en México en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí. Su hábitat natural son los desiertos áridos (Fig. 2).

Clasificación taxonómica

División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Caryophyllidae
Orden: Caryophyllales
Familia: Cactaceae
Subfamilia: Cactoideae
Tribu: Cacteae
Género: *Glandulicactus*
Especie: *G. uncinatus* (Galeotti) Backeberg

Sinonimias: *Echinocactus uncinatus, Ferocactus uncinatus, Hematocactus uncinatus, Echinomastus uncinatus, Glandulicactus uncinatus, Ancistrocactus uncinatus, Pediocactus uncinatus, Sclerocactus uncinatus, Hamatocactus wrightii, Glandulicactus wrightii, Echinocactus crassihamatus, Ferocactus crassihamatus,*

Glandulicactus crassihamatus, Hamatocactus crassihamatus, Echinocactus mathssonii, Ferocactus mathssonii, Glandulicactus mathssonii, Ancistrocactus mathssonii.

Nombre común: cactus uña de gato, cactus cabeza de turco.

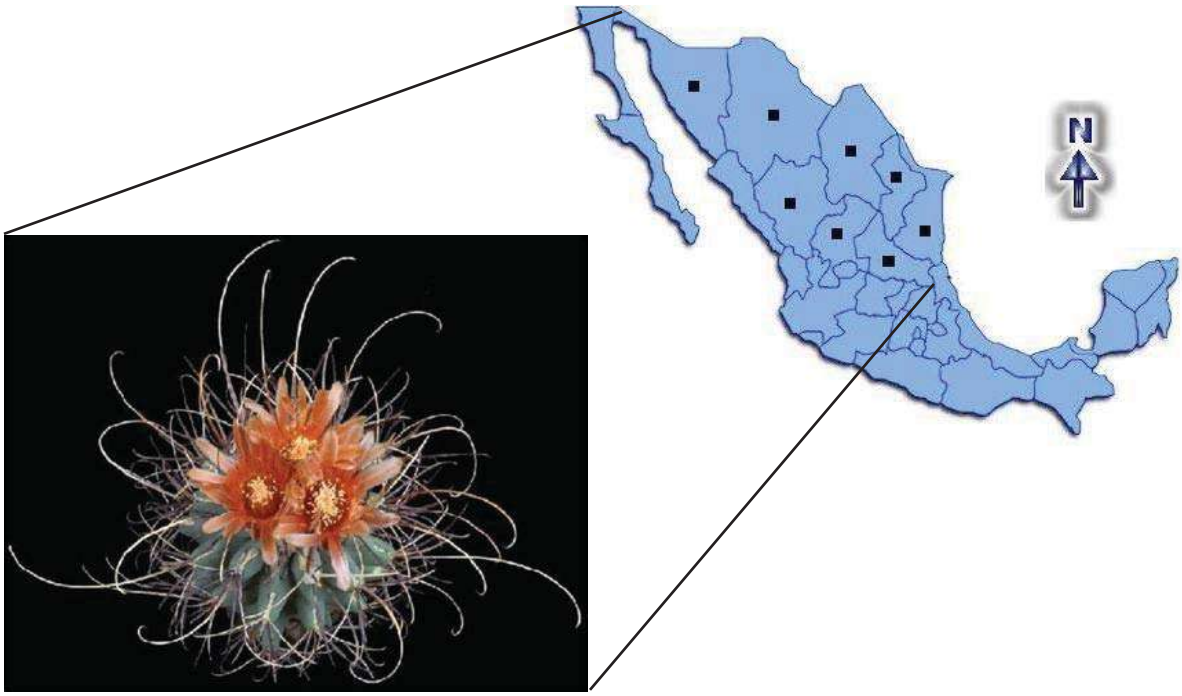

Figura 2. Ejemplar de *Glandulicactus uncinatus* y su distribución en México.

Estado de conservación de la especie

La colecta ilegal y destrucción de sus hábitats han puesto a esta especie en estado de riesgo de amenaza (SEMARNAT, 2002) por lo que se ubican en el apéndice II de la CITES (CITES, 2008).

Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos

La conservación de la biodiversidad es un tema que ha venido ganando relevancia de forma progresiva en nuestra sociedad. La conservación de la flora silvestre constituye una pieza clave dentro del cuidado del medio ambiente. La sociedad es cada vez más consciente de la importancia de la flora silvestre como fuente de alimento, aceites, gomas, resinas, ceras, colorantes, fibras, energía, sustancias aromáticas y principios medicinales, por su valor ornamental y por su valor ecológico como indicador y elemento restaurador de situaciones ambientales degradadas (McNeely *et al.,* 1990*;* Prance, 1997). La conservación toma especial relevancia en nuestros días dado el acelerado proceso de degradación ambiental en el que vivimos. Sin embargo, la preocupación por la conservación de los recursos vegetales es tan antigua como la propia civilización humana (Maxted *et al.,* 1997). No obstante, frecuentemente la simple restricción de la actividad humana en el entorno no resulta suficiente para asegurar y garantizar la supervivencia de las especies a conservar (Falk, 1989). Este tipo de limitaciones conlleva la necesidad de desarrollar métodos de conservación *ex situ*, que sirvan para complementar las acciones tomadas en los hábitats naturales (Reid y Miller, 1989). Los programas de conservación *ex situ* complementan la conservación *in situ* mediante el almacenamiento a largo plazo de germoplasma representativo de las poblaciones, lo que permite un mejor conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado, y proporciona propágulos para su utilización en programas educativos, de mejora genética y en planes de reforzamiento, reintroducción o introducción (Mcneely *et al.,* 1990). Los métodos de conservación *ex situ* implican la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética de una especie y su mantenimiento fuera de las condiciones naturales en las que la especie ha evolucionado. Las ventajas que proporcionan estos métodos son control directo sobre el material, fácil accesibilidad y disponibilidad (Reid y Miller, 1989).

El almacenamiento de germoplasma de especies amenazadas tienen lugar en forma de colecciones de plantas y en los bancos de germoplasma (Laliberté, 1997); en México existen pocas instituciones que realizan la labor, siendo uno de los más

importantes el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), establecido en 1965, contando con 120,527 accesiones entre los géneros representados se encuentra: *Zea, Triticum,Hordeum, Triticosecale*, entre otros (Franco, 2008). Las colecciones de plantas constituyen el método tradicional de conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Bajo esta denominación se pueden considerar tanto los jardines botánicos como las colecciones de plantas en campo, no obstante, los jardines botánicos presentan una serie de problemas derivados de su irregular distribución por el mundo y del escaso recurso financiero que reciben para su costoso mantenimiento (Maxted *et al.,* 1997). Por otra parte existen los bancos de germoplasma de especies raras y amenazadas, que están basados en el almacenamiento de propágulos de una parte representativa de la variabilidad genética correspondiente a una determinada especie, ejemplo de esto son los bancos de *Musa, Citrus, Solanum tuberosum, S. lycopersicum, Capsicum,* entre otra. Dentro de esta categoría podemos distinguir los bancos de semillas, los bancos de cultivo *in vitro*, los bancos de polen y los bancos de genes o bancos de ADN (Iriondo, 2001).

Los bancos de semillas han interesado a la humanidad desde el inicio de la agricultura hace 7,000 años. El almacenamiento del material a conservar en forma de semillas constituye uno de los procedimientos de conservación *ex situ* más válidos y extendidos en la actualidad. Se ha podido comprobar que el almacenamiento de semillas a largo plazo constituye una operación relativamente simple y económica en términos de tecnología, infraestructura, personal y gastos de mantenimiento (Maxted *et al.,* 1997). De esta manera, resulta posible mantener un gran número de semillas de diferentes especies vegetales durante largos períodos de tiempo y con un mínimo riesgo de daños genéticos (Iriondo, 2001). Por otro lado, las semillas son unidades adaptadas a la dispersión en el tiempo y, por tanto, capaces en la mayoría de los casos de permanecer viables de forma natural, durante largos periodos de tiempo (Chin, 1994). El tamaño pequeño de las semillas, unido a la posibilidad de que cada una de ellas posea una constitución genética diferente, asegura la conservación de una gran diversidad genética en un espacio reducido (Iriondo y Pérez, 1999). La

conservación de semillas ofrece como mínimo un servicio de seguridad y apoyo a otras técnicas de conservación, mientras que, en el otro extremo, pueden constituir la única opción disponible cuando los últimos ejemplares de una especie están a punto de desaparecer (Reid y Miller, 1989).

Las semillas se clasifican como ortodoxas o tolerantes a la desecación cuando son capaces de mantener su viabilidad tras ser desecadas a menos de 5-10% de contenido de humedad; la tolerancia a la desecación está ligada a las propiedades del protoplasma celular, para poder afrontar la deshidratación, los tejidos celulares deben ser capaces de limitar o reparar los daños sufridos y mantener su integridad fisiológica durante el periodo en el que el tejido está seco (Black y Pritchard, 2002), los mecanismos que permiten esta desecación están relacionados con la capacidad de simplificar las estructuras intracelulares (mitocondrias), y la capacidad de inhibir la actividad metabólica, la eficiencia de los sistemas antioxidantes, la facultad de elaborar las proteínas de la membrana celular, entre otros, que rodean los cuerpos grasos e impiden que se aglomeren durante la deshidratación y la capacidad de vitrificar durante la deshidratación algunas sustancias como los azucares (Berjak y Pammenter, 2002), permaneciendo viables hasta por más de 100 años. Por el contrario, las semillas recalcitrantes o sensibles de la desecación pierden viabilidad cuando se desecan por debajo de un límite crítico, habitualmente entre 12-30% de contenido de humedad y conservan su viabilidad por periodos no mayores de 2-3 años (Chin y Roberts, 1980), como ejemplos esta el mango, aguacate y cítricos. Existe una tercera categoría en la que las semillas tienen características de almacenamiento intermedias entre las ortodoxas y las recalcitrantes. Las semillas intermedias pueden ser desecadas a contenidos de humedad similares a las semillas ortodoxas, sin embargo, una vez desecadas, se dañan al someterlas a bajas temperaturas y su viabilidad desciende rápidamente durante el almacenamiento y su viabilidad no llega a ser mayor de 10 años cuando se desecan hasta un 7-10 % en temperatura baja (Ellis *et al.,* 1989). Por ello, la determinación del comportamiento de las semillas de una especie constituye un tema trascendental de cara a su conservación a largo plazo. Afortunadamente la mayoría de las especies silvestres

del planeta forman semillas ortodoxas, las más comunes las especies cultivadas (Iriondo, 2001).

Aunque el almacenamiento en bancos de germoplasma está universalmente aceptado como parte integral de los programas de conservación de plantas silvestres, las muestras de semillas de plantas silvestres almacenadas en bancos de germoplasma suponen menos de 2 % del total de germoplasma almacenado, destinado esencialmente a plantas cultivadas (Astley, 1991).

Criopreservación o ultrapreservación de semillas ortodoxas

La conservación de semillas a bajas temperaturas (a partir de -80 °C hasta -196 °C) y baja humedad relativa (12 a 6 %) han permitido su conservación por décadas, semillas con latencia prolongada, particularmente de zonas templadas y áridas (Harrington, 1972; Hartmann y Kester 1988); sin embargo, existen semillas de especies con características similares a las estudiadas que requieren de evaluar y determinar las condiciones de preservación particularmente de temperatura, que permitan mostrar la viabilidad de conservación por periodos largos de tiempo. El objetivo de cualquier protocolo de criopreservación es evitar la formación de hielo intracelular, el control del estado del agua durante el proceso de descenso de temperatura es la clave de esta técnica; para lo cual es necesario deshidratar las semillas hasta un contenido en humedad menor al 10 %, en estas condiciones estás pueden soportar la inmersión directa sin necesidad de pretratamiento alguno (González-Benito, 1998). En estos casos las semillas se introducen en crioviales, que serán sumergidos al criotanque, técnica que ha sido ensayada en especies ibéricas de las familias Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cistaceae y Scrophulariaceae (González-Benito, 1998; Pérez y González, 2008).

La criopreservación de semillas es una técnica que se ha venido estudiando desde la década de los 80, como una alternativa a los métodos tradicionales de almacenamiento de semillas sobre todo de interés agrícola, medicinal y algunas especies de flora silvestre (González-Benito *et al*., 1998). Cardoso-Almeida (2000),

reporta el efecto de la criopreservación en un almacenamiento por 48 horas con el uso de semillas de diversas leguminosas como: *Lathyrus cicera* (chícharo) , *Lens culinaris* (lenteja)*, Lupinus albus* (entremozo)*, Pisum sativum* (chícharo)*, Vicia faba* (haba) y *Phaseolus vulgaris* (frijol); obteniendo porcentajes de 63 hasta 100 % de germinación tras su almacenamiento en nitrógeno líquido; sólo algunas muestras mostraron ligeras pérdidas en la viabilidad, probablemente debida a su composición química o a la sensibilidad de las semillas a los daños físicos y al no estricto control de humedad.

Para el caso de especies raras o en peligro de extinción comienzan a realizarse las investigaciones en esta técnica, los reportes son pocos para estas especies que requieren de mantenimiento de su variabilidad genética, cuya amenaza es inminente a la extinción; la mayor parte de los reportes señalan que las semillas usadas han soportado la inmersión en nitrógeno líquido por mínimo 24 horas, y registros hasta por 3 años de almacenamiento bajo esta condición, sin existir pérdidas considerables en la viabilidad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Informes del uso de semillas de especies endémicas, conservadas en nitrógeno líquido.

Material biológico	Tiempo y respuesta al nitrógeno líquido	Referencia
Varias especies de las Familia Leguminosas	Almacenadas de 1 a 3 años, no mostraron efectos negativos en sus porcentajes de germinación que fueron de 85-96%.	Stanwood, 1985
51 especies forestales *Picea* y *Pinus* las más destacadas	Almacenadas por 24 h, 4 semanas y 8 meses, mostrando 97-70% en el caso de *Picea*, y en *Pinus* 93-89%.	Barbour *et al.*, 2003
Orquídeas: *Calanthe vestia, Calanthe gorey, Angraecum magdalenae, Trichopilia tortilis, Miltonia flavescens, Encyclia cochleata*	Almacenamiento por 45 días, manteniendo 69-100%.	Nikishina *et al.,* 2001
Lathyrus cicera, *L. sativus*, *Lens culinaris*, *Lupinus albus*., *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vicia articulata*, *V. faba*, *V. monanthos* y *V. sativa*	Almacenadas por 48 h, obteniendo desde 63 hasta 100% de germinación tras su inmersión al N2L.	Cardoso-Almeida, 2000
Orquídea*: Phaius tankervilleae*	Almacenadas por 12 meses con porcentajes de germinación de 80 a 96%.	Hirano *et al.,* 2009
Varias especies de *Pinus spp*	Almacenadas por 4 días, obteniendo porcentajes de germinación desde 71 hasta 97%	Pita *et al.,* 1998
Burchardia umbellata, Allocasuarina fraseriana, Banksia occidentalis, Petrophile divaricata, Stylobasium australe, Acacia acuminata, entre otras especies australianas endémica	Tiempo no especificado, obteniendo sobrevivencias del 30-60%.	Touchell y Dixion, 1994
6 especies de *Encholirium* y 2 de *Dyckia spp*	24 h, con porcentajes de germinación de 50 hasta 95%	Tarré *et al.,* 2007

En la mayoría de las cactáceas, sus semillas han mostrado resultados inconsistentes de viabilidad cuando se les almacena por periodos cortos, registran pérdida de viabilidad o estado de letargo y dificultan el estimulo de la germinación (Distefano, 1990; Maiti *et al.*, 1994). Las semillas de agaves cuando se almacena en temperaturas de 10 a 6 °C, con bajos contenidos de humedad muestran viabilidad de 90 % hasta por 10 años (Martínez-Palacios, 1998; Golubov *et al.,* 2007); sin embargo a temperaturas cercanas al punto de congelación, los embriones se caracterizan por mantener un gasto de energía o dicho de otra manera, el metabolismo del embrión por lo que es de esperarse que la viabilidad disminuya o incluso se pierda a largo plazo (Hartmann y Kester, 1988). Las semillas ortodoxas han demostrado que con la deshidratación a niveles de 4% e incluso menores, y pueden resistir temperaturas de -80 ºC y de hasta -196 ºC (Pritchard, 2008; Reed, 2008).

Los bancos de semillas tienen la ventaja de que en pequeños recipientes se puede almacenar una gran variabilidad genética de una población, pueden permanecer viables por décadas, el material biológico puede incrementarse en cada periodo de producción de semillas, están libres del ataque de microorganismos y los costos de mantenimiento son muy bajos a temperaturas por abajo de -20 ºC (Harrington, 1972; Hartmann y Kester, 1988). Sólo necesaria la supervisión por un técnico especializado, y se ahorra en gran medida la mano de obra que requieren otros sistemas (Ej. Jardines Botánicos, laboratorios de plantas *in vitro*, gastos de compra y mantenimiento de refrigerantes, evaluaciones continuas de viabilidad de semillas etc.). La preservación del germoplasma, en particular la criopreservación se ha estado realizando en los últimos 40 años, es una práctica relativamente nueva (Engelmann, 2004). Sin embargo, los países desarrollados como Reino Unido, Noruega, España, Rusia, China, Japón, entre otros, lo contemplan como una necesidad y en la última década lo han estado llevando a la práctica, poniendo mayor consideración en el germoplasma de países con mayor diversidad y en especies en peligro de extinción como orquídeas, árboles forestales y plantas silvestres de uso medicinal (Rico, 2002; Darwin Initiative, 2005).

Las técnicas de criopreservación pueden tener una importante aplicación para la preservación de especies en peligro de extinción (Touchell y Dixon, 1994), debido

a que se mantiene la viabilidad a las semillas por tiempo indefinido a través de la detención metabólica del embrión. En los sistemas tradicionales de almacenamiento, existen riesgos como daños y pérdidas en las semillas, por lo que se requieren evaluaciones periódicas, control de la viabilidad y además de riesgo por enfermedades, estos riesgos quedan eliminados con el uso de la criopreservación (Benson *et al.,* 1996; Moukadiri *et al.,* 1999, Pita *et al.,* 1998). Aunque el almacenamiento criogénico se ha llevado a cabo para muchas especies de la familia de las leguminosas y orquídeas (González-Benito *et al*., 1998; Salomão, 2002; Popova *et al*., 2003), en algunos casos han existido problemas tales como la pérdida de germinación o muerte anormal por lesiones internas que se han notificado, debidas a la presencia de agua en la semillas provocando complicaciones (Vertucci, 1989). Sin embargo, los problemas están generalmente asociados con las características de las semillas como son el tamaño, contenido de humedad y composición química (Belletti *et al.,* 1990).

En México, dada su gran diversidad de especies y a su riqueza de endemismos, la conservación *ex situ* de especies en peligro de extinción debe ser una necesidad impostergable, debido a la velocidad de destrucción que se ha estimado a los bosques tropicales del mundo, México no es excepción, para fines del siglo se ha considerado que estos desaparecerán del planeta (Soulé, 1991) y con ellos el gran número de especies vegetales que los integran. Los países que no inviertan en la conservación de germoplasma, dependerán de los países que han apostado a la conservación de los recursos vegetales.

Tanto en *Agave victoriae-reginae* y *Glandulicactus uncinatus*, debido al material con que se cuenta y a los valores cercanos al 100 % de germinación después de la colecta, se presentan como el material idóneo para desarrollar sistemas de preservación de semillas.

IV. HIPÓTESIS

Las semillas ortodoxas se caracterizan por registrar viabilidad por varios años, esta se puede incrementar si se disminuye la temperatura de almacenamiento y el contenido de humedad, e incluso mantenerse de forma indefinida si la temperatura (-196 °C) suspende el metabolismo del embrión.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- Desarrollar un protocolo de preservación de semillas de *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) y *Glandulicactus uncinatus* (Cacteceae),

Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta de germinación de semillas de *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus*, al ser almacenadas en diferentes temperaturas (26, 6, -20, -70 y -196°C).
- Evaluar la pérdida de viabilidad de las semillas sujetas a bajo contenido de humedad (3-4 %), almacenamiento bajo diferentes periodos (1, 6, 9 y 12 meses) en cinco temperaturas.
- Evaluar el efecto del nitrógeno líquido en el almacenamiento de semillas de *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus*, con contenido de humedad de 3-4 %, por periodos de tiempo de 30 minutos a 12 semanas.

Literatura citada

Alvarado, M.A., R. Foroughbakhch, Jurado, E. y Rocha, A. 2003. El cambio climático y la fenología de las plantas. Ciencia UANL 5(4):493-500

Arias, S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. Rev, Soc. Mex. Hist. 44:109-115.

Astley, D. 1991. Exploration: Methods and Problems of Exploration and Field Collecting. En: Genetic Conservation of World Crop Plants. Hawkes, J.G., ed. Academic Press, Harcourt, Brace and Javnovitch Publishers, London, pp. 11-22.

Barbour, J.R., Bernard, R., y Parresol, P.D. 2003. Effect of liquid nitrogen storage on seed germination of 51 tree species. Seed Technology. 25(2): 181-188

Beardmore, T., y Whittle, C.A. 2005. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. P.O. Box 4000, Fredericton, NB E3A 5P7, Canada 25(8):965-972

Berjak, P y Pammenter, N.W. 2000. What ultrastructure has told about recalcitrant seeds. Revista Brasileira de Fisiología Vegetal, 12:22-25

Belletti, P.; Lanteri, S.; Leporl, G.; Nassi, M.O. y Quagliotti, L. 1990. Factors related to the cryopreservation of pepper and eggplant seeds. Advanced Horticulture Science 4: 118-120

Benson, E.; Wilkinson, M.; Todd, A.; Ekuere, V. y Lyon, I. 1996. Development competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoottips. Cryo-Letters 17: 119-128.

Black, M., y Pritchard, H.W. 2002. Desiccation and survival in plants. Drying without drying. Wallingford, UK: CABI Publishing 412pp

Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. 1. UNAM. México pp.1-84

Bravo-Hollis, H., Sánchez-Mejorada, H. 1991. Las cactáceas de México. Vol. II. UNAM. México. pp. 132

Cardoso-Almeida, F., Pita, J.M., y Gomes, J.G. 2000. Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. Revista Brasileña de Productos Agroindustriales. Campina Grande 2(1):67-71

Casasola, M.P. 1996. Vida y obra de granos y semillas. Fondo de cultura económica, México, D.F. Capítulo VII

Chin, H.F., 1994. Seed banks: conserving the past for the future. Seed Science and Technology 22, 385-400.

Chin, H.F., y Roberts, E.H. 1980. Recalcitrant Crop Seeds. Tropical Press SDN. BHD, Kuala Lumpur.

CITES. 2008. Appendices I, II and III to the convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. US Fish & Wildlife Service, Washington, DC.

Darwin Initiative. 2005.http://darwin.defra.gov.uk/ (accesada en abril 2009)

Dickie, J.B,. Ellis, R.H.; Kraak, H.L, Ryder, K., y Tompsett, P.B. 1990. Temperature and seed storage longevity. Annals of Botany 65:197-204.

Distefano, F.V.1990. The effect of temperature and chemicals on the germination of some conophytums. Cactus and Succulent. Journal (U.S) 62: 60-64.

Ellis, R.H., y Roberts, E.H. 1989. A comparison of the low moisture-content limit to the logarithmic relation between seed moisture and logevity in twelve species. Annals of Botany 63:601-611

Engelmann, F. 2004. Plant Cryopreservation: progress and prospects. In Vitro Cell Dev Biol plant 40: 427-433

Falk D., 1989. The Theory of Integrated Conservation Strategies for Biological Diversity En: Proceedings of the Natural Areas Association. Syracuse, NY, 6-9 June 1988. Nat. Areas Assoc., Rockford, Illinois, pp. 5-10.

FAO, 1996. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome, Italy

Ferrusquía-Villafranca, I. 1998. Geología de México: Una sinopsis. En T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y Fa, J. (Eds). Diversidad biológica de México. Orígenes y distribución. Instituto de Biología. UNAM. México

Franco, T. 2008. Los bancos de germoplasma en las Américas. Recursos Naturales y Ambiente 53:81-84

García-Mendoza, A.J. 2007. Los Agaves de México. [Disponible en: http://redalyc.uaemex.] 2007, (julio-septiembre): [fecha de consulta: 12 de diciembre de 2010]

Gentry, H.S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press, Tucson, U.S.A. 670 pp.

Golubov J., Mandujano, M.C., Arizaga, S., Martínez-Palacios, A. y Koleff, P. 2007. Inventarios y conservación de Agavaceae y Nolinaceae. Pp: 133-152, En: En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México

Gonzales-Benito, M.E.; Iriondo, J.M. y Pérez-García, F. 1998. Seed cryopreservation: an alternative method for conservation of Spanish endemics. Seed Science Technology 26: 257-262.

González, M., Jurado, E., González, S.; Aguirre, O., Jiménez, J., y Navar, J. 2003. Cambio climático mundial: origen y consecuencias. Ciencia UANL 6(3): 77-385

Harrington, J.F. 1972. Seed storage and longevity. En: T.T. Kozlowski (ed), Seed Biology. Academic Press, New York.

Hartmann, H.T. y Kester, D.E. 1988. Propagación de Plantas, Principios y Prácticas. Editorial Continental. México

Hirano, T., Godo, T., MyoshI, K., Ishikawa, K., Ishikawa, M. y Mii, M. 2009. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervillaea.* Plant Biotechnol Rep. 3:103-109

Iriondo, J.M. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). Universidad Politécnica de Madrid. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 16 (1):6-20

Iriondo, J.M., y 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.

Jurado, E., Jiménez, J., y Treviño, E. 1998. Biodiversidad en peligro. Ciencia UANL 1(1):43-47

Laliberté, B. 1997. Botanic garden seed banks / genebanks worldwide, their facilities, collections and network. Botanic Gardens Conservation News 2, 18-23.

LiveSciencie. 2008. Extinct Tree from Christ´s Time Rises From The Dead. http://www.livescience.com/2602-extinct-tree-christ-time-rises-dead.html

Maiti, R.K., Hernández-Piñero, J.L. y Valdéz-Marroquín, M. 1994. Seed ultra-structure and germination of some species of Cactaceae. International Journal of Experimental Botany. 55:97-105.

Martínez-Palacios A. 1998. Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae.* T. Moore y aplicaciones del cultivo de tejidos para su conservación. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM, México.

Martínez, M., Cardozo, C.I., Y Sánchez, O.M. 2010. Respuesta fisiológica de semillas de tomate *Solanum lycopersicum* L. var. Unapal- maravilla y pimentón *Capsicum annuum* L. var Unapal-Serrena en crioconservación. Acta agronómica 59 (4):401-409

Maxted N., Ford-lloyd, B.V., y Hawkes, J.G. 1997. Complementary Conservation Strategies. En: Plant Genetic Conservation. The *In Situ* Approach. Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Hawkes, J.G., ed. Chapman & Hall, London, pp. 15-39.

Mcneely, J.A., Miller, K.R., Reid, W.V., MIttermeier, R.A.,y Werner, T.B. 1990. Conserving the World Biological Diversity. IUCN, WRI, CI, WWF-US, the World Bank, Gland, Suiza, pp: 193

Moukadiri, O.; Deming, J.; O'connor, J.B., y Cornyo, M.J. 1999. Phenotypic characterization of the progenies of rice plants derived from cryopreserved calli. Plant Cell Report 18: 625-632.

Nikishina, T.V. Popov, A.S., Kolomeitseva, G.L., y Golovkin, B.N. 2001. Effect of cryoconservation on seed germination of rare tropical Orchids. Russian Journal of Plant Physiology. 48 (6):10-815

Pavlik, B.M., Nickrent, D.L., y Howald, A.M., 1993. The recovery of an endangered plant. I. Creating a new population of *Amsinckia grandiflora*. Conservation Biology 7:510-526. En: Martinez-Palacios, A. 1998. Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* T. moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación. Tesis doctoral. UNAM, México.

Pérez-García F. Y González-Benito M.E., 2008. Seed cryopreservation of *Halimium* and *Helianthemum* species *CryoLetters* 29(4): 271-276.

Pita, J.M.; Sanz, V. y Escudero, A. 1998. Seed cryopreservation of seven Spanish native pine species. Silvae Genetica 47: 220-223.

Popova, E.V.; Nikishina, T.V.; Kolomeitseva, G.L. y Popov, A.S. 2003. The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid Bratonia. Biodiversity and Conservation 50: 672-677.

Prance, G. T. 1997. The Conservation of Botanical Diversity. En: Plant Genetic Conservation. The In situ Approach. Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Haekes, J.G. (ed) Chapman &Hall,London, pp. 33-14.

Pritchard, H.W. 2000. Cryopreservation and global warming! Cryoltters 23:281-282.

Pritchard, H.W. 2007. Cryopreservation of desiccation tolerant Seeds. pp 183-189 In: Day JG, Stacey GN (eds) Cryopreservation and freeze-drying protocols. Human Press Inc., Totowa, NJ.

Pritchard, H.W. 2008. Cryopreservation of Orthodox (Desiccation Tolerant) Seeds. pp 485-501 En: Barbara M. Reed (ED), Plant Cryopreservation, A Practical Guide, Springer USA

Pritchard, H.W. 1995. Cryopreservation of seeds, pp 133-144 En: day JG, McLellan MR (eds) Methods in molecular biology. Vol.3. Cryopreservation and Freeze-drying protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Reed, B.M. 2008. Cryopreservation, Practical Considerations. pp 3-57, En: Barbara M. Reed (ED.), Plant Cryopreservation, A Practical Guide, Springer USA

Reid, W.V., y Miller, K.R., 1989. Keeping Options Alive. The Scientific Basis for Conserving Biodiversity. World Resources Institute, Washington, 128 pp.

Rico, L. 2002. El Bancos de semillas de los Jardines de Kew. Ciencias UNAM. 68:42-45.

Rzedowski, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. Acta Botánica Mexicana. 15: 47-64.

Rzedowski, J. 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. Pags. 129-144. En T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y Fa, J. (Eds). Diversidad biológica de México. Orígenes y distribución. Instituto de Biología. UNAM. México

Salomão, A.N. 2002. Tropical seed species response to liquid nitrogen exposure. Brazilian Journal of Plant Physiology 14: 133-138.

SEMARNAT. 2002, http://www.semarnat.gob.mx (accesada en Mayo 2009)

Stanwood, P. C. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: Karth, K. K. (ed). Cryopreservation of plant cells and organs. Boca Ratón, CRC Press

Soulé, M. E. 1991. Conservation: tactics for a constant crisis. Science 253:744-750.

Toledo, V.M. y Ordoñez, M.J. 1998. El panorama de la biodiversidad en México: Una revisión de los hábitats terrestres. En T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y Fa, J. (Eds). Diversidad biológica de México. Orígenes y distribución. Instituto de Biología. UNAM. México

Tarré, E., Mendes-Pires, B., Mancano, G. A., Alves, C. L. Campostrini, F. R. y Mansur, E. 2007. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seed from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult & Schult. F. and *Dykia* Schult & Schult. F. species (Bromeliaceae). Acta botanica brasileña 21(4):777-783

Touchell, D.H. y Dixon, K.W. 1994. Cryopreservation for seedbanking of Australian species. *Annals of Botany* 74: 541-546.

Vertucci, C.W. 1989. Relationship between termal transitions and freezing injury in pea and soybean seeds. Plant Physiology 90: 1121-1128.

Zalba, S.M, Sonagliona, M.I., Compagnoni, C.A. y Belenger, C.J. 2000. Using a habitat model to asses the Risk of invasion by an exotic plant. Biol. Conserv., 93:203-20

Efecto en la viabilidad de semillas de *Agave victoriae-reginae* y *Glandulicactus uncinatus,* del almacenamiento bajo diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento.

V. Bejarano-León[1], A. Martínez-Palacios[1], C. Sáenz-Romero[1], M. E. Pedraza-Santos[2], C. Philippe-Lobit[1] y V. Chávez-Ávila[3]
[1]Laboratorio de Biotecnología y Genética, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF-UMSNH), Km 9.5 carr. Morelia-Zinapécuaro C.P. 58880, Tarímbaro Michoacán México; [2] Facultad de Agrobiología, UMSNH, Uruapan Michoacán México; [3] Jardín Botánico, IB-UNAM

Resumen

Agave victoriae-reginae (Agavaceae) y *Glandulicactus uncinatus* (Cactaceae), son especies endémicas del norte de México, que poseen un alto valor ornamental tanto a nivel nacional como internacional; ambas especies han sido objeto de saqueos exhaustivos, además del cambio de uso del suelo y la destrucción acelerada de sus hábitats naturales. La preservación de semillas es una alternativa viable de conservación de una población, donde la variación genética puede enriquecerse con nuevas colectas. La preservación de semillas ortodoxas es exitosa siempre y cuando se mantengan bajo dos factores necesarios para prolongar su viabilidad: bajo contenido de humedad y temperatura durante su almacenamiento. Se evaluó el almacenamiento de semillas a 3-4 % de humedad para *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus* por 1, 6, 9 y 12 meses bajo las temperaturas de 26, 6, -20, -70 y -196°C. Después del tiempo de preservación programado, las semillas se germinaron *in vitro* en medio basal Murashige y Skoog. Los análisis estadísticos registraron diferencias significativas entre las dos especies (P=0.0372); entre el tiempo de almacenamiento hubo una marginal diferencia significativa (P=0.0509); para las temperaturas de preservación hubo diferencia significativa (P=0.0001); las interacciones especie/tiempo de almacenamiento no hubo diferencia (P=0.0594); en especie/temperatura existió diferencia significativa (P=0.0014) y la interacción tiempo del almacenamiento/temperatura registró alta diferencia significativa(P=0.0001). La mejor temperatura de almacenamiento para las dos especies es la de -70 °C, *G. unicinatus* mostrando una tendencia de pérdida de viabilidad, conforme transcurre el

tiempo de almacenamiento. Esta metodología de preservación de semillas ortodoxas mostró ser una alternativa viable para la conservación *ex situ* y podría ser base para la conservación de otras especies vegetales con graves problemas de extinción en nuestro país.

Palabras clave: agave, cactácea, conservación, preservación de semillas.

Abstract

Agave victoriae-reginae (Agavaceae) and *Glandulicactus uncinatus* (Cactaceae), are endemic in northern Mexico, which have a high ornamental value both nationally and internationally, both species have been subject to extensive looting, besides the change of use soil and the accelerated destruction of natural habitats. Preserving seeds is a viable alternative for the conservation of a population, where genetic variation can be enriched by new collections. The preservation of orthodox seeds is successful as long as they remain under two factors necessary to prolong their viability, low moisture content and temperature during storage. We evaluated the seed storage moisture 3-4% for *A. victoriae-reginae* and *G. uncinatus* for 1, 6, 9 and 12 months at temperatures of 26, 6, -20, -70 and -196 ° C. After the scheduled time preservation, seeds germinated *in vitro* on basal medium Murashige and Skoog. Statistical analysis revealed significant differences between the two species (P=0.0372), between the storage time there was a marginal significant difference (P=0.0509) for temperatures to preserve significant difference (P=0.0001), species interactions/storage time there was no difference (P=0.0594), in species/ temperature significant difference (P=0.0014) and interaction of storage time/ temperature showed high significant difference (P= 0.0001). The best storage temperature for the two species is -70 °C, *G. unicinatus* showed a trend of loss of viability, as time storage. This method of preservation of orthodox seeds proved to be a viable alternative to ex situ conservation and could be the basis for the conservation of plant species extinction with serious problems in our country.

Keywords: agave, cactus, conservation, preservation of seeds.

Introducción

Las familias Agavaceae y Cactaceae registran en México su mayor diversidad y endemismo. La colecta exhaustiva de semillas y plantas, y el cambio en el uso del suelo las ha ubicado en grave riesgo de extinción (SEMARNAT, 2001; CITES, 2008). *Agave victoriae-reginae* T. Moore, se distribuye en el centro del desierto Chihuahuense Mexicano (Martínez-Palacios, 1998). Uso, principalmente el ornamental en el extranjero. El estatus es en peligro de extinción según la NOM-059 (SEMARNAT, 2002) y enlistada en el Apéndice II de la CITES (CITES, 2008). *Glandulicactus uncinatus*, se distribuye en el desierto del Norte de México, en los Estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí. Uso, principalmente es ornamental. El estatus de la especie, se ubica en peligro de extinción según la NOM-059 (SEMARNAT, 2002) y enlistada en el Apéndice II de la CITES (CITES, 2008).

La conservación *in situ* es la mejor manera de conservar a una especie, sin embargo, muchas de ellas y en particular las de ambiente restringido se están erosionando en su variación genética y un gran número de ellas están en grave riesgo de extinción. Por lo anterior, una alternativa es la conservación *ex situ*, a este respecto, las semillas se presentan como el material idóneo a preservar, dada la variabilidad genética que ellas contienen y a la posibilidad de prolongar la viabilidad de las semillas por décadas o siglos (Hartmann y Kester, 1988). La longevidad de un lote de semillas es el tiempo que pueden mantenerse viables en determinadas condiciones de temperatura y contenido de humedad, en la mayoría de las semillas la longevidad media se puede situar entre 5 y 25 años, de acuerdo a reportes de diversas especies almacenadas bajo diversas condiciones (Cuadro 2) (Pérez y Pita, 2000). Los métodos de conservación convencionales normalmente incluyen el almacenamiento a temperaturas comprendidas entre 5 y -20 °C, en la conservación a largo plazo las semillas se almacenan normalmente a -18 °C, mientras que en la

conservación a mediano plazo se utilizan temperaturas de 0 a 10 °C (Ellis *et al.,* 1985).

Cuadro 2. Porcentajes de germinación de semillas de diferentes especies cultivadas, después de diferentes periodos y condiciones de almacenamiento. Fuente: Pérez y Pita, 2000.

ESPECIE	PERIODO DE ALMACENAMIENTO (AÑOS)	GERMINACIÓN (%)
Phaseolus vulgaris (judía)	18	99
Beta vulgaris (remolacha)	22	75
Daucus carota (zanahoria)	20	63
Zea mays (maíz)	32	79
Cucumis sativus (pepino)	30	77
Solanum melongena (berenjena)	20	86
Cucumis melo (melón)	30	96
Allium cepa (cebolla)	22	75
Pisum sativum (guisante)	31	78
Lycopersicum esculentum (tomate)	43	76
Citrus lanatus (sandía)	30	92

Las semillas ortodoxas se caracterizan por soportar el descenso de la temperatura a niveles de -196 ºC cuando los niveles de humedad son inferiores a 4% (Ellis *et al.,* 1989; Dickie *et al.,* 1990). Bajos estos niveles de temperatura se ha reportado que interrumpen cualquier actividad metabólica, prolongando la latencia de las semillas por tiempo indefinido (Pritchard, 2008). La preservación de semillas a -196 °C, en las últimas dos décadas ha sido ampliamente probada para diversas especies de interés agrícola como: *Lathyrus cicera, Lens culinaris, Vicia faba* y *Phaseolus vulgaris*, y especies forestales como: *Pinus contorta, Picea engelmannii,*

Abies amabilis, Pinus montícola por mencionar alguna (Beardmore y Whittle, 2005; Pritchard 2000, 2007, 2008; Barbour *et al.,* 2003); sin embargo existen especies mexicanas, particularmente cactáceas del apéndice I del CITES representadas por unos cuantos individuos, que demandan establecer sistemas de preservación para evitar su extinción. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura (26, 6, -20, -70 y -196 °C) en el porcentaje de germinación de semillas de dos especies mexicanas en peligro de extinción (*Agave victoriae-reginae* y *Glandulicactus uncinatus*), preservadas con 3-4 % de humedad por 1, 6, 9 y 12 meses.

Materiales y Métodos

Se colectaron semillas en campo de las especies *Agave victoriae-reginae y Glandulicactus uncinatus.* Previo al almacenamiento se realizó un control de germinación de 200 semillas por especie. Las semillas tenían 9 % de humedad al momento de su colecta. Se redujo la humedad a las semillas después de su limpieza, mediante una cámara de deshidratación con cloruro de calcio (anhídrido) ($CaCl_2$), durante un periodo de 2 meses, hasta alcanzar niveles de 3-4 % de humedad; procedimiento que se confirmó mediante una prueba de contenido de humedad recomendado por el ISTA (2009). En cada especie se utilizaron cinco tratamientos de temperatura (26, 6, -20, -70, y -196 °C) y cuatro periodos de evaluación en el tiempo de preservación (1, 6, 9 y 12 meses). Las semillas almacenadas entre los 26 y -70 °C se almacenaron en sobres de papel dentro de frascos de cristal con $CaCl_2$, para la temperatura de -196 °C, se utilizaron crioviales de 1.5 ml de capacidad, todos los tratamientos con lotes de 200 semillas, las mismas que fueron utilizadas para cada evaluación de viabilidad de cada temperatura y de cada periodo de almacenamiento. Para el caso de la temperatura de -196 °C y -70 °C, se tomó en cuenta la temperatura y tiempo de introducción para la inmersión de la muestra al tanque criogénico, se inició en 0 °C y se descendió 10 °C cada minuto al ser introducidas al tanque criogénico empezando de 0°C, hasta la inmersión total (Crane *et al.,* 2003). La evaluación de viabilidad a través del porcentaje de germinación, se estableció *in vitro*, para lo cual, las semillas se desinfectaron en alcohol al 70% por un minuto,

posteriormente se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 50% (blanqueador doméstico) por 20 minutos, dentro de una campana de flujo laminar se enjuagaron tres veces en agua estéril; las semillas se sembraron en frascos con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y se incubaron a 26ºC y fotoperiodo 16h luz (2000 lux de intensidad). Los porcentajes de germinación se transformaron a arcoseno y se analizaron por especie a través de un ANOVA factorial, las medias se diferenciaron mediante un análisis de diferencias mínimas significativas (DMS α=0.05).

Resultados

Las semillas de *A. victoriae-reginae* después de la colecta, antes de ser deshidratadas y almacenadas, registraron 95.5 % de germinación; para *G. uncinatus* se registró 75 % de germinación inicial. El ANOVA factorial indicó que existieron diferencias significativas entre la capacidad de germinación de *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus* (*P= 0.0372*); entre el tiempo de almacenamiento (1, 6, 9 y 12 meses) se registró una diferencia marginalmente significativa (*P=0.0509*); y para las temperaturas, se registró una diferencia altamente significativa (*P=0.0001*); para el caso de la interacción especie/tiempo de almacenamiento, hubo una diferencia marginalmente significativa (*P=0.0594*); en la interacción especie/temperatura existió diferencia significativa (*P=0.0014*) y por último la interacción tiempo de almacenamiento/temperatura se registró diferencia altamente significativa (*P=0.0001*) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza de efectos fijos para los factores: especies (*A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus*), meses de almacenamiento (1, 6, 9 y 12), temperatura de almacenamiento (26, 6, -20, -70 y -196 °C) y sus interacciones.

FACTOR	GL	*F*	*P*
Especie	1	4.36	0.0372
Meses	3	2.60	0.0509
Temperatura	4	8.34	0.0001
Especie/Meses	3	2.49	0.0594
Especie/Temperatura	4	4.48	0.0014
Meses/Temperatura	12	3.33	0.0001
Error	751		
Total corregido	778		

Las medias del porcentaje de germinación de todas las temperaturas obtenidas en los periodos de almacenamiento para ambas especies nos indicaron que en *A. victoriae-reginae,* aunque no existe diferencia significativa, la disminución del porcentaje de germinación en las tres primeras evaluaciones mostraron una tendencia a disminuir la viabilidad conforme avanzó el tiempo de almacenamiento; sin embargo a los 12 meses de almacenada, esta especie volvió a recuperar su capacidad de germinación (91.7 %). Esto a diferencia de *G. uncinatus,* que presentó una ligera pérdida de viabilidad conforme trascurre su tiempo de almacenamiento en todas las temperaturas (9 meses 85.7% y 12 meses 84.1%) y mostró un comportamiento opuesto al de *A. victoriae-reginae*. Una diferencia mínima

significativa nos indicó que sólo en el caso de *G. uncinatus* existió una tendencia clara a perder viabilidad con respecto al tiempo de almacenamiento (Fig. 3).

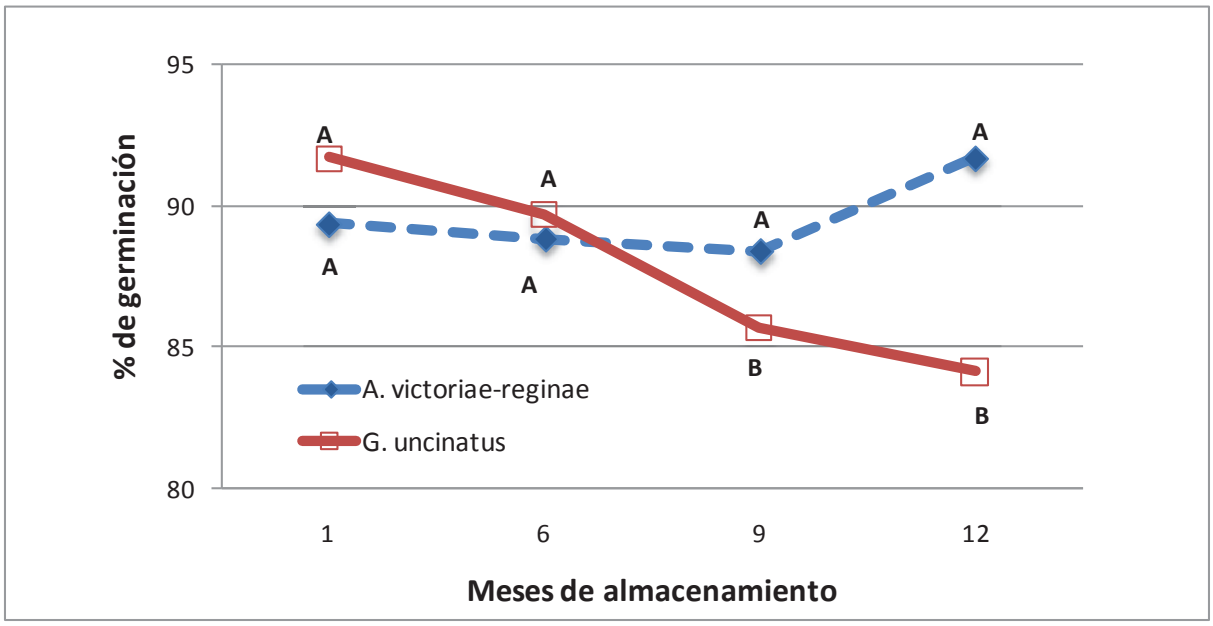

Figura 3. Efecto del tiempo de almacenamiento (1, 6, 9 y 12 meses) en la viabilidad de semillas de *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus* sobre el valor promedio registrado en cinco diferentes temperaturas (26, 6, -20, -70 y -196 °C) de almacenamiento. Letras iguales no son significativamente diferentes (α=0.05).

En cuanto al comportamiento de las semillas de *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus* en las diferentes temperaturas en las que fueron almacenadas (26, 6, -20, -70 y -196 °C) las medias de germinación indicaron que la mejor temperatura de preservación para las dos especies ensayadas fue la de -70 °C. Para *A. victoriae-reginae* se muestra un efecto de pérdida de viabilidad en las semillas almacenadas en -196 °C (86.9 %) y 26 °C (88.3 %); en *G. uncinatus* fue notable la tendencia de pérdida de viabilidad en 6 °C (85.4 %) y 26 °C (80.2 %), indicada por la diferencia mínima significativa (Fig. 4).

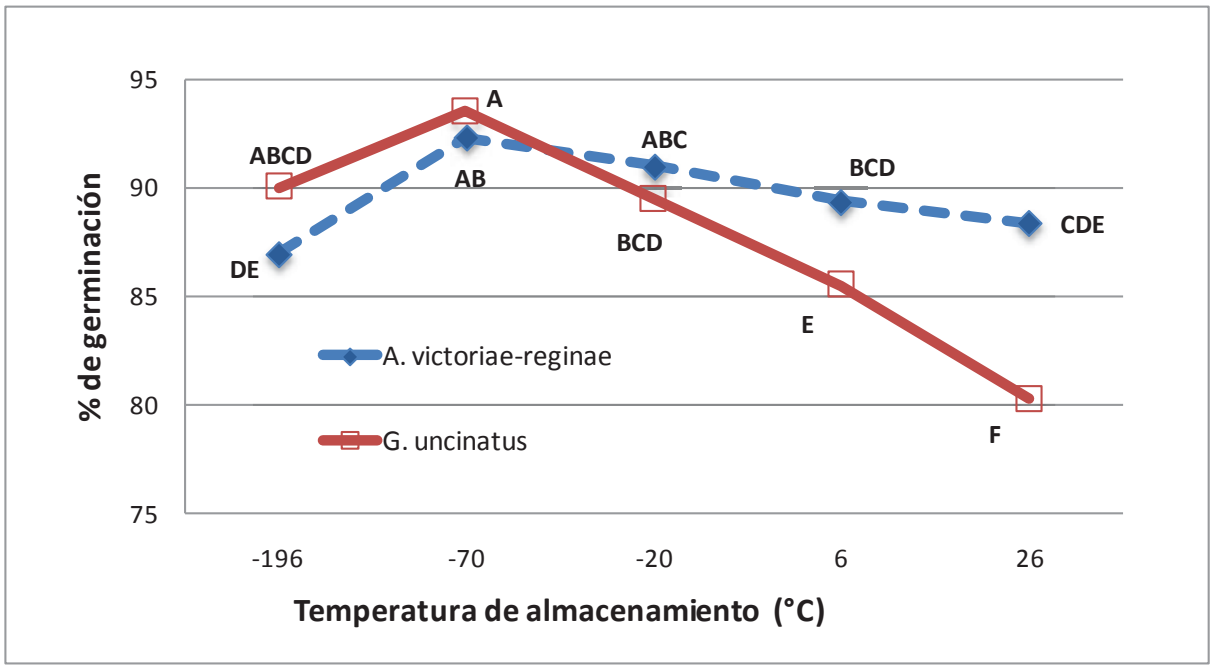

Figura 4. Efecto de la temperatura (26, 6, -20, -70 y -196 °C) en la viabilidad de semillas de *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus* sobre el valor promedio registrado en cuatro periodos de almacenamiento (1, 6, 9 y 12 meses), letras iguales no son significativamente diferentes (α=0.05).

Las dos especies ensayadas, *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus,* registraron una tendencia de mantener una mejor respuesta de viabilidad durante su preservación a temperaturas por debajo del punto de congelación; como se describió anteriormente en ambas especies, la mejor temperatura de preservación fue a -70 °C con una media de germinación de 92.3 % para *A. victoriae-reginae* y 93.5 % para *G. uncinatus*, seguido de -20 °C con porcentajes de 89.4 y 91 % y -196 °C teniendo 86.9 y 90 % respectivamente. En *G. uncinatus* se observó clara la tendencia a disminuir la viabilidad en las temperaturas de 6 y 26 °C, sin embargo los porcentajes de germinación estuvieron por arriba de 80 % (Fig.5).

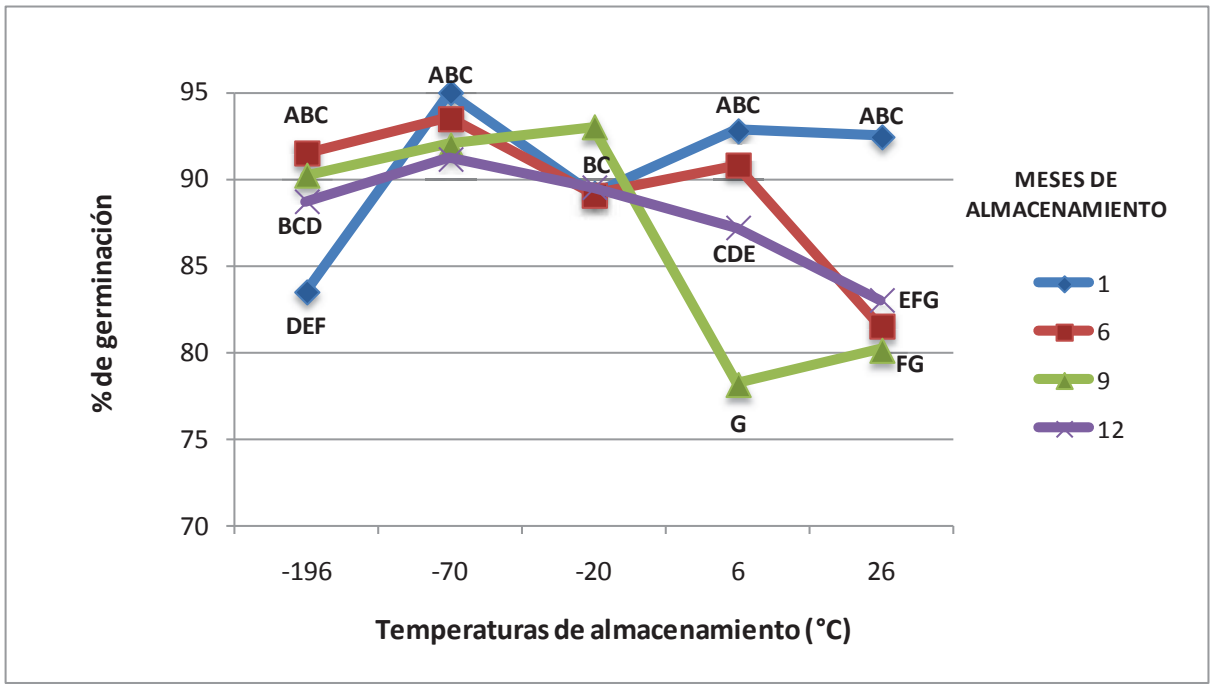

Figura 5. Porcentajes de germinación en los cuatros periodos y en las cinco temperaturas de almacenamiento en *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus.* Letras iguales no son significativamente diferentes (DSM α=0.05).

Discusión

Los resultados corroboraron que con niveles bajos de humedad (3-4 %), y en temperatura de 26 °C, las semillas mantuvieron viabilidad de 88.3 % en *A. victorie-reginae* y 80.2 % en *G. uncinatus*. La falta de semillas y de tiempo no permitió explorar temperaturas más elevadas o mayores períodos de almacenamiento. Existen reportes del uso de semillas de *Arachis hipogea* (cacahuate) con contenido de humedad de 1.7 % y que mantuvieron altos porcentajes de viabilidad (80 %) por más de dos años de almacenamiento a 35 y 50 °C, a diferencia de los tratamientos que registraron 4.4 % o más de humedad antes de tres meses de almacenamiento en las mismas temperaturas (Sastry *et al.,* 2007).

En cactáceas la latencia es muy común por las condiciones ambientales de sus hábitats naturales: la falta de agua, oxígeno, luz o temperaturas originan un estado quiescente (Baskin y Baskin, 1998). Se ha reportado que en las semillas de cactáceas, mientras mantienen cierto nivel de humedad, esta latencia persiste,

hasta que se reduce la humedad relativa del ambiente natural en que se desarrollan las semillas (Orozco-Segovia *et al.,* 2007). Las semillas de cactáceas pueden presentar diferencias en los requerimientos para su germinación y en los procesos de latencia (Silvertown y Lovett-Doust, 1993). Las semillas de *G. uncinatus* después de su colecta, muy probablemente presentaban cierto grado de latencia y al ser sometidas a las bajas temperaturas y reducir su contenido de humedad, el efecto fue revertido, por lo que sus porcentajes de germinación incrementaron. Sin embargo, al prolongar el tiempo de almacenamiento en temperaturas por arriba de los 6 °C, existe la posibilidad de que se esté perdiendo viabilidad. Semillas de *Opuntia tomentosa,* al ser secadas o deshidratadas (13-14 % de humedad), muestran la formación de un orificio que permite la entrada de agua, con lo cual se pierde la latencia y se activa la germinación (Orozco-Segovia *et al.,* 2007).

La congelación de semillas puede tener una diferencia en la germinación en comparación con semillas frescas o recién colectadas (Martinková y Honék, 2007). En el caso de *A. victoriae-reginae* y *G. unicnatus*, no existieron bajos porcentajes de germinación tras su almacenamiento en nitrógeno líquido. Fue evidente que el almacenamiento a temperatura de -70 °C resultó la idónea según los análisis para las dos especies ensayadas. Sin embargo, si existe manera de almacenar criogénicamente las semillas, los costos de mantenimiento serán notablemente más económicos y no se presentarán dificultades por interrupciones de energía y descompostura de equipos; y los materiales biológicos conservados en nitrógeno líquido reducirán problemas asociados con enfermedades en el momento de la regeneración de las muestras, como pueden presentarse mediante un método más convencional de almacenamiento (Eberhart *et al.,* 1991). La refrigeración tiene otro factor en contra ya que la falta de energía eléctrica o la descompostura repentina expone a las semillas a temperaturas ambientes por el tiempo en que se restablezca el funcionamiento del equipo; esto puede afectar notablemente la viabilidad de las semillas almacenadas después de varias interrupciones. El desarrollo y uso de condiciones óptimas de

almacenamiento de semillas ortodoxas disminuye la frecuencia de las pruebas de viabilidad y las regeneraciones de los materiales.

Literatura citada

Baskin, J. M. y Baskin, C. C. 1998. Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press. California pp.545-566

Barbour, J.R., Bernard, R., y Parresol, P.D. 2003. Effect of liquid nitrogen storage on seed germination of 51 tree species. Seed Technology. 25(2): 181-188

Beardmore, T., Whittle, C. A. 2005. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. P.O. Box 4000, Fredericton, NB E3A 5P7, Canada 25(8): 965-972

CITES. 2008. Appendices I, II and III to the convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. US Fish & Wildlife Service, Washington, DC.

Crane, J., Miller A. L, Van Roekel J. W., y Walters C. W. 2003. Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of *Cuphea* seed. Planta 217: 699-708

Dickie, J. B, Ellis, R. H. Kraak, H. L, Ryder, K., y Tompsett, P. B. 1990. Temperature and seed storage longevity. Annals of Botany 65:197-204.

Eberhart, S. A., Roos, E. E., y Towill, L. E. 1991. Strategies for long-term management of germplasm collections. En: Falk, D. A. and Holsinger, E. K. 1991. Genetics and Conservation of Rare Plants. Oxford University Press. NY. 9:135-145

Ellis, R. H., Hong, T. D., y Roberts, E. H. 1985. Handbook of Seed Technology for Genebanks. Vol. I. Principles and Methodology. Handbooks for Genebanks: No. 2. IBPGR Secretariat, Roma, 210 pp.

Ellis, R. H. y Roberts, E. H. 1989. A comparison of the low moisture-content limit to the logarithmic relation between seed moisture and logevity in twelve species. Annals of Botany 63:601-611

Hartmann, H.T. Y Kester, D. E. 1988. Propagación de Plantas, Principios y Prácticas. Editorial Continental. México

ISTA. Internacional Seed Testing Association, 2009, http://www.seedtest.org

Martínez-Palacios A. 1998. Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae.* T. Moore y aplicaciones del cultivo de tejidos para su conservación. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM, México.

Martinková, Z., y Honék, A. 2007. The effect of cryopreservation on germination of Dandelion seeds. Plant Protect. Sci., 43: 63-67

Murashige, T y Skoog, K. 1962. A revised médium for repid growth and biossays with tabacco tissue cultura. Physiolgy Plantarum. 5: 473-497

Orozco-Segovia, A., Márquez, G. J., Sánchez, C. M. E., Gamboa de Buen, A., Baskin, J. M., y Baskin, C. C. 2007. Seed Anatomy and wáter uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). Annals of Botany 99: 581-592

Pérez, G. F y Pita, V. J. M. 2000. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Núm. 2112-HD. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Madrid, España. 15 pp.

Pritchard, H. W, 2000. Cryopreservation and global warming! Cryoltters 23:281-282.

Pritchard, H. W, 2007. Cryopreservation of desiccation tolerant Seeds. Pp 183-189 In: Day JG, Stacey GN (eds) Cryopreservation and freeze-drying protocols. Human Press Inc., Totowa, NJ.

Pritchard, H. W, 2008. Cryopreservation of Orthodox (Desiccation Tolerant) Seeds. Pp 485-501 In: Barbara M. Reed (Ed.), Plant Cryopreservation, A Practical Guide, Springer USA.

Sastry, D. V., Upadhyaya, H. D, y Gowda, C. L. L. 2007. Survival of groundnut seeds under different storage conditions. SAT ejournal. ICRISAT. Vol. 5 Issue 1

SEMARNAT 2001, http://www.semarnat.gob.mx (accesada en Mayo 2009)

SEMARNAT 2002, http://www.semarnat.gob.mx (accesada en Mayo 2010)

Silvertown, J.W. y Lovett-Doust, J. 1993. Introduction to plant population biology. Blackwell Scientific Publications. Oxford

Efecto de la crioconservación en la viabilidad de semillas de *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) y *Glandulicactus uncinatus* (Cactaceae), especies endémicas de México.

V. Bejarano-León[1], A. Martínez-Palacios[1], C. Sáenz-Romero[1], M. E. Pedraza-Santos[2], C. Philippe -Lobit[1] y V. Chávez-Ávila[3]
[1]Laboratorio de Biotecnología y Genética, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF-UMSNH), Km 9.5 carr. Morelia-Zinapécuaro C.P. 58880, Tarímbaro Michoacán México; [2] Facultad de Agrobiología, UMSNH, Uruapan Michoacán México; [3] Jardín Botánico, IB-UNAM

Resumen

Agave victoriae-reginae y *Glandulicactus uncinatus* se consideran en peligro de extinción además de estar en el apéndice II de CITES. Esta condición es debida principalmente a las colectas inmoderadas de semillas y plantas para uso ornamental, a partir de las limitadas poblaciones. El almacenamiento en nitrógeno líquido (criopreservación) de semillas es una técnica que ha permitido almacenar semillas ortodoxas con bajos contenidos de humedad por períodos prolongados, sin que estás pierdan su viabilidad. Con su germinación *in vitro* en medio MS basal, se evaluó el efecto de crioconservación (0.5 a 2160 días) sobre las semillas *Agave victoriae-reginae* y *Glandulicactus uncinatus*. En *A. victoriae-reginae* la estadística demostró que hubo diferencias significativas (P=0.0061) en los tiempos de inmersión en nitrógeno líquido, la cual no afectó la germinación de las semillas, ya que éstas mostraron porcentajes de germinación que iban desde 86 % hasta 97 %. Para *G. uncinatus* se registró significancia (*P*=0.0108) entre los tiempos de inmersión en nitrógeno líquido, los promedios de germinación oscilaron entre 86 y 98 %; por medio de una regresión de las medias del porcentaje de germinación se analizó la tendencia a la pérdida de viabilidad con el tiempo de almacenamiento, mostrando una ligera pérdida debido a la dispersión de los datos y los altos valores de germinación. En las dos especies estudiadas hubo malformaciones en el desarrollo de las plantas. Los resultados indican que el uso de la criopreservación de semillas puede ser un método adecuado para conservar especies en peligro de extinción y que se encuentran en condiciones similares a las ensayadas.

Palabras clave: crioconservación, semillas ortodoxas, agave, cactácea.

Abstract

Agave victoriae-reginae and *Glandulicactus uncinatus* are considered endangered in addition to being in Appendix II of CITES. This condition is mainly due to immoderate collections of seeds and plants for ornamental use, from the limited stocks. Storage in liquid nitrogen (cryopreservation) of seed is a technique that has enabled low-orthodox seed storage moisture content for extended periods without you were to lose their viability. With its germination in vitro in basal MS medium, we evaluated the effect of cryopreservation (0.5 to 2160 days) on seeds and *Agave victoriae-reginae Glandulicactus uncinatus*. In *A. victoriae-reginae* statistics showed significant differences (P = 0.0061) at the time of immersion in liquid nitrogen, which did not affect seed germination, as these showed germination percentages ranging from 86% to 97%. For *G. uncinatus* there was significance (P = 0.0108) between the times of immersion in liquid nitrogen, mean germination ranged between 86 and 98% by a regression of mean germination percentage was analyzed trends in the loss of viability with storage time, showing a slight loss due to scattering of data and the high values of germination. In the two species studied were no malformations in the development of plants. The results indicate that the use of cryopreservation of seeds may be an appropriate method to preserve endangered species and is found in conditions similar to those tested.

Keywords: cryopreservation, orthodox seeds, agave cactus.

Introducción

Agave victoriae-reginae y *Glandulicactus unciantus*, son especies en peligro de extinción y amenazada de acuerdo a la NOM-ECOL-059 y se ubican en el apéndice II del CITES, los factores más perturbantes son la colecta para uso comercial y el disturbio del hábitat natural. Desafortunadamente las estrategias de conservación in situ no han logrado el objetivo de mantenimiento de las poblaciones, por lo que recurrir a la conservación ex situ es una alternativa para preservar; las semillas son unidades adaptadas a la dispersión en el tiempo y, por tanto, capaces en la mayoría de los casos de permanecer viables de forma natural, durante largos periodos de tiempo (Chin, 1994). Los protocolos para el almacenamiento en nitrógeno líquido de semillas ortodoxas fueron establecidos por Stanwood y Bass (1981). Se ha podido comprobar que las semillas de un gran número de especies son capaces de sobrevivir a la crioconservación en nitrógeno líquido (Iriondo *et al.,* 1992). Un factor importante para que las semillas tengan una respuesta favorable a la exposición a nitrógeno líquido es el contenido de humedad este debe oscilar en rangos de 3-6 % (Vertucci, y Roos, 1993). Se ha informado que niveles de humedad tan bajos de temperatura ha reportado que interrumpen prácticamente la actividad metabólica del embrión, y prolongan la latencia de las semillas por tiempo indefinido (Pritchard, 2008). La criopreservación, en las últimas dos décadas ha sido ampliamente probada para diversas especies de interés agrícola y forestal (Beardmore y Whittle 2005; Pritchard 2000, 2007, 2008), estas técnicas han sido utilizadas con éxito en varias especies raras o amenazadas de climas áridos de España, como *Coronopus navasii, Vella pseudocytisus, Cistus osbeckiifolius* y *Helianthemun polygonoides* (González-Benito *et al.,* 1998); México siendo el cuarto país más diverso en plantas y primero en diversidad de cactáceas y agaves (Arias, 1993 ; García-Mendoza, 2007); para el caso de los cactus, en particular es el grupo que requiere mayor atención en conservación (CITES, 2008). Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la criopreservación en el almacenamiento de semillas de *Agave victoriae-reginae* y *Glandulicactus uncinatus*.

Materiales y métodos

Se colectaron frutos en campo de *Agave victoriae-reginae* y *Glandulicactus uncinatus,* se limpiaron y homogenizaron las semillas de estos para ser utilizadas en los diferentes tratamientos de almacenamiento establecidos. Se tomó una muestra de 500 semillas para realizar una prueba de su contenido de humedad, mediante el procedimiento establecido por el Internacional Seed Testing Association (ISTA, 2009); que consistió en el secado de una muestra de semillas en estufa durante 17 horas a 103 °C, previamente se registró el peso fresco de la muestra y posteriormente el peso tras su secado, las semillas se registraron 9 % de humedad. El resto de las semillas se sometió a deshidratación mediante una cámara de desecación con cloruro de calcio anhídrido ($CaCl_2$), durante un periodo de dos meses (Sakai y Noshiro, 1975; Sun, 2002; Hamilton *et al.,* 2005), con la finalidad de mantener de 3-4% de humedad relativa dentro del contenedor de semillas, se volvió a realizar prueba ISTA para corroborar este nivel. Para el almacenamiento de las semillas en nitrógeno líquido se tomó en cuenta la temperatura y tiempo de introducción de los crioviales con las semillas; se descendió 10 °C cada minuto, partiendo de 0 °C al ser introducidas al tanque criogénico, hasta la inmersión total en nitrógeno liquido, para lo cual se utilizó un termómetro digital con sensor de temperatura y cronómetro (Crane *et al.,* 2003). Una vez trascurrido el tiempo de almacenamiento las semillas se extrajeron del tanque y colocaron a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos para iniciar su desinfección; la cual consistió en colocar las semillas en alcohol a 70 % durante 1 minuto, para después pasarlas a una solución de hipoclorito de calcio a 50 % (blanqueador doméstico) por un periodo de tiempo de 20 minutos. Para las semillas de *G. uncinatus* previo a la solución de hipoclorito las semillas fueron escarificadas químicamente en una solución de HCl al 50 % por 30 segundos para producir la germinación adecuadamente. Una vez desinfectadas las semillas se llevaron a una campana de flujo laminar, se enjuagaron tres veces con agua estéril para ser sembradas *in vitro* en medio MS basal libre de hormonas (Murashige y Skoog, 1962) con 7 % de agar y pH 5.7. Para evaluar la viabilidad a través del porcentaje de germinación, las semillas de criovial se sembraron en 20 frascos, de forma equitativa. Los frascos con semillas

se incubaron en una cámara a 25±1°C; con un fotoperíodo de 16 horas luz (2000 lux de intensidad luminosa). Los porcentajes de germinación se trasformaron a arcoseno y se analizaron a través de un ANOVA y un análisis de regresión para conocer el efecto de criopreservación en la viabilidad con respecto al tiempo de almacenamiento. La viabilidad se evaluó hasta los 15 días de siembra para *A. victoriae-reginae* y 30 días en *G. uncinatus*. Durante 12 semanas se observó el desarrollo morfológico de las plántulas para descartar la posible expresión de malformaciones. Las plantas se establecieron bajo condiciones de invernadero, en charolas con una mezcla de arena de mina y agrolita (2:1 v/v), se sujetaron a niveles de 70-90 % de humedad relativa por 1 semana, posteriormente se redujo paulatinamente la humedad relativa, hasta quedar bajo las condiciones que prevalecían en el invernadero.

Resultados

Las de semillas de *A. victoriae-reginae* mostraron diferencias estadísticas significativas en su viabilidad, en los diferentes periodos de (0.5, 1, 2, 4, 16, 32, 72, 168, 360, 720 y 2160 horas), existió diferencia significativa (P= 0.0061; Cuadro 4); sin embargo, en relación al tiempo de almacenamiento, la última evaluación realizada (2160 horas) registró un valor de 88.5 %, el cual estaba por arriba de la media registrada, lo cual no reflejo una tendencia de pérdida de viabilidad indicada por el análisis de regresión de las medias (R^2=0.0627; Fig. 6) y la dispersión de los valores a lo largos de todas las evaluaciones de tiempo de inmersión en N2L, en todos las evaluaciones del tiempo de inmersión se obtuvieron porcentajes de germinación de 81.9-96.8 % (Cuadro 5).

Cuadro 4. Análisis de varianza de datos transformados (arcoseno) del porcentaje de germinación de *Agave victoriae-reginae.*

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	*F*	*P*
Tratamiento	10	1547.118	154.711	2.85	0.0061
Error	56	3038.507	54.259		
Total corregido	66	4585.626			

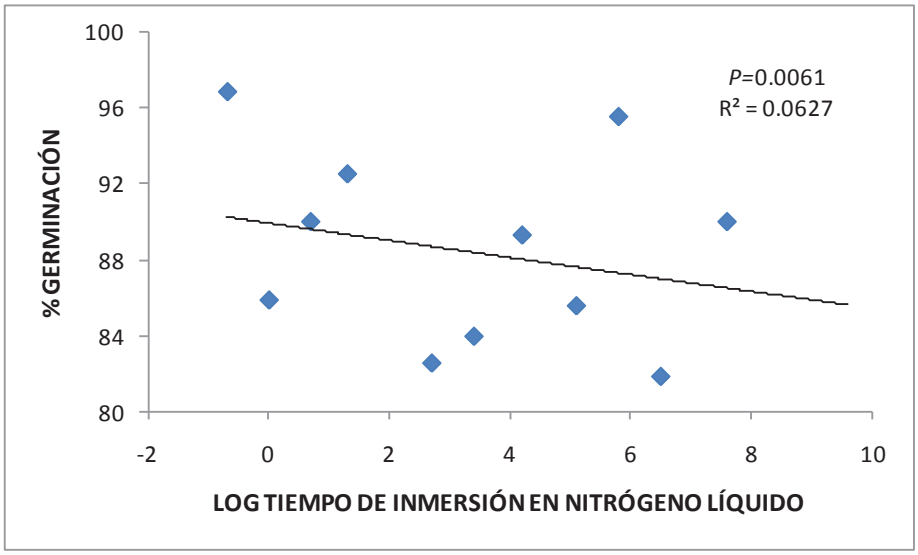

Figura 6. Análisis de regresión de las medias del porcentaje de germinación de *A. victoriae-reginae* de semillas almacenadas en nitrógeno líquido de 0.5 a 2160 horas

Cuadro 5. Viabilidad de semillas de *A. victoriae-reginae*, almacenadas en nitrógeno líquido de 0.5 a 2160 horas.

Criopreservación (horas)	Germinación (%) ± D.E
0.5	96.8 ± 04.7
1	85.9 ± 16.2
2	90.0 ± 10.9
4	92.2 ± 11.1
16	82.6 ± 14.4
32	84.0 ± 19.0
72	89.7 ± 12.6
168	85.6 ± 17.2
360	95.5 ± 06.8
720	81.9 ± 11.8
2160	90.0± 16.9

En el caso de *Glandulicactus uncinatus* el análisis de varianza del porcentaje de germinación de semillas después del almacenamiento en nitrógeno líquido por tiempos de 0.5, 1, 2, 4, 16, 32, 72, 168, 360, 720 y 2160 horas, registró diferencias significativas (P= 0.0108; Cuadro 6); los promedios de germinación oscilaron entre 86 y 98% (Cuadro 7), un análisis de regresión de las medias del porcentaje de germinación registró una ligera tendencia a la pérdida de la viabilidad conforme trascurre el tiempo (R= 0.0108; Fig. 8); sin embargo, esta tendencia se vio minimizada por la dispersión de los porcentajes de germinación, así como los altos valores de viabilidad que se reportaron en todos los tratamientos, incluso que el control de germinación fue de 75 %.

Cuadro 6. Análisis de varianza de datos transformados (arcoseno) del porcentaje de germinación de *Glandulicactus uncinatus.*

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	*F*	*P*
Tratamiento	10	787.455	154.711	2.62	0.0108
Error	56	1681.292	30.023		
Total corregido	66	2468.748			

Cuadro 7. Porcentajes de germinación de semillas de *Glandulicactus uncinatus,* almacenadas en nitrógeno líquido de 0.5 a 2160 horas.

Criopreservación (horas)	Germinación (%) ± D.E
0.5	97.5 ± 5.5
1	93.3 ± 6.5
2	94.7 ± 6.9
4	88.8 ± 13.4
16	91.6 ± 11
32	94.7± 8.4
72	87.6± 13.4
168	95.5 ± 8.2
360	91.5 ± 9.3
720	86.3 ± 15.3
2160	89 ± 12

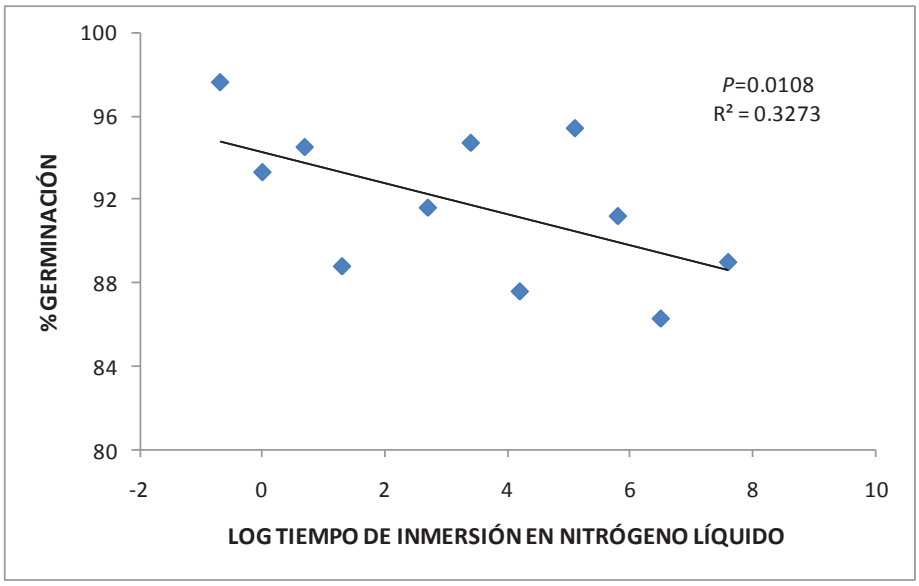

Figura 7. Análisis de regresión de las medias del porcentaje de germinación de semillas de *G. uncinatus* almacenadas en nitrógeno liquido de 0.5 a 2160 horas.

Las plántulas de *A. victoriae-reginae,* provenientes de las semillas sometidas al almacenamiento en nitrógeno líquido, no mostraron desarrollos morfológicos anormales de sus órganos (hojas y raíces). La supervivencia de las plántulas a las 2 semanas de su trasplante del medio de cultivo *in vitro* a sustrato *ex vitro,* fue de 70 %, este se mantuvo hasta por más de 8 semanas, logrando el establecimiento *ex vitro* de las plantas (Fig. 7).

a)

b)

Figura 8. Plantas de *A. victoriae-reginae*: **a)** a las 2 primeras semanas de trasplante de *in vitro* a *ex vitro*, **b)** Plantas a más de 8 semanas de establecidas bajo condiciones de invernadero. 1:10

Tras el seguimiento por 90 días de las plántulas de *G. uncinatus* generadas a partir de estas semillas criopreservadas, las diferencias observadas fueron en cuanto a los tamaños de las estructuras únicamente, fuera de estos valores no se registraron malformaciones en el desarrollo de las plantas en cuanto a sus órganos. La supervivencia de las plántulas a las 2 semanas del trasplante fue de 90 %, por más de 8 semanas, y se logró alcanzando el establecimiento total de las plantas bajo condiciones de invernadero (Fig. 9).

a)

b)

Figura 9. Plantas de *G. uncinatus:* **a)** Plántulas a 2 semanas de trasplante de *in vitro* a *ex vitro*, **b)** Plantas a más de 8 semanas de establecidas en invernadero. 1:80

Discusión

En conjunto los resultados obtenidos son coincidentes con los trabajos de Stanwood y Bass, 1981; y González-Benito *et al.,* 1998, que indican que la crioconservación puede ser un método adecuado para la preservación de semillas ortodoxas. De igual manera se corroboró que aún a niveles bajos de humedad las semillas logran mantener la viabilidad; el contenido de humedad de las semillas es un factor importante en el éxito de su congelación, este debe ser menor a 10 % para soportar la inmersión al N_2L, y garantizar que no se presenten daños por formación de cristales intracelulares (Pritchard 2008). Semillas de 11 especies de orquídeas con contenidos de humedad por debajo de 11 %, tras su crioconservación mantuvieron su capacidad germinativa cercana a 90 % (Pritchard, 1984); en semillas de *Calanthe vestia* y *Cymbidium spp* (Orquídeas), se obtuvieron porcentajes de germinación de 90 % y 93 % respectivamente tras su almacenamiento en nitrógeno líquido por un año (Cherevchenko y Kushnir, 1986); *A. victoriae-reginae* presentó un comportamiento similar al registrar porcentajes de germinación desde 81 hasta 97 % tras su criopreservación.

En semillas de *G. uncinatus* los porcentajes de germinación tras su inmersión a nitrógeno líquido fueron de 82 hasta 97 %, por lo que no fue necesario el uso de crioprotectores; en cactáceas la latencia es un comportamiento bien documentado, las condiciones de extremas sequía donde se desarrollan juegan un papel importante (Baskin y Baskin, 1998); es común que por las condiciones ambientales de sus hábitats naturales, por lo que la falta de agua, oxígeno, luz y altas temperaturas originan un estado quiescente (Baskin y Baskin, 1998), las semillas pueden presentar diferencias en los requerimientos para su germinación y en los procesos de latencia (Silvertown y Lovett-Doust, 1993); dentro de las cactáceas algunas especies de *Opuntia* tienen un periodo de latencias de 7 a 8 años para evitar la sequía e inician la germinación en el siguiente período de lluvia (Pimienta y Del Castillo, 2002), las semillas de *G. uncinatus* después de su colecta, muy probablemente presentaban cierto grado de latencia y al ser sometidas a las bajas temperaturas este efecto fue revertido, por lo que sus

porcentajes de germinación incrementaron. La congelación de semillas puede tener una diferencia en la germinación en comparación con semillas frescas o recién colectadas (Martinková y Honék, 2007); considerando que el porcentaje de germinación de *G. uncinatus* antes de ser sometidas a inmersión a nitrógeno líquido fue de 75 % tras su almacenamiento los porcentajes se incrementaron de 82-97 %; existen casos de semillas de orquídeas donde se reporta que tras su almacenamiento en nitrógeno líquido los porcentajes de germinación se incrementaron en casi 25 % con respecto al control (Nikishina *et al.,* 2001); el aumento de la capacidad germinativa de semillas desecadas de *Encholirium magalhaensii* y *E. subsecundum* (Bromeliaceae), después de su almacenamiento a 4 y -20 °C, se debió a la desecación natural que se produce antes de la germinación que es de 2.5 %, particularmente en las zonas con estaciones secas muy pronunciadas (Tarré *et al.,* 2007); además el aumento de la germinación de semillas almacenadas en frío se ha reportado como una estrategia de las especies para dispersar la germinación (Gosling, 1989), y una disminución en el contenido de ABA después de una estratificación en frío de semillas latentes para evitar pérdida de la germinación, esto descrito para semillas de *Malus* sp (manzana) (Lee y Looney, 1978) y *Acer* ssp L. (Pinfield *et al.,* 1987).

Otro factor importante para el éxito de la criopreservación es el bajo contenido de humedad de las semillas; de acuerdo a Standwood (1985), el rango del contenido de humedad debe ser entre 10-30 % para disminuir la formación de hielo intracelular durante el proceso de congelación y descongelación, los rangos que se mantuvieron para semillas de *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus* fueron de 3-4 % de contenido de humedad, lo que evitó daños intracelulares por congelamiento de agua, lo cual generalmente deriva en una pérdida de viabilidad (Vertucci, 1989).

El congelamiento de las semillas de *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus* no tuvo efecto perjudicial sobre el crecimiento de las plantas y su desarrollo. El seguimiento de 300 plantas de *Dianthus fischeri,* provenientes de semillas

criopreservadas no mostraron diferencias notables entre las respuestas del desarrollo de las plantas (Chetverikova *et al.,* 2006); las diferencias en alturas y raíces en el desarrollo de las plantas de *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus* fueron cambios temporales y probablemente debidos a la permeabilidad de las semillas que alteran la disposición de nutrientes y agua durante el proceso de congelación y descongelación (Tikhonova *et al.,* 1997). Podemos concluir que las semillas evaluadas son tolerantes tanto a la desecación como a las bajas temperaturas, lo que demuestra que la criopreservación puede ser considerada para ser utilizada para la conservación a largo plazo en especies de la familia Cactaceae y Agavaceae particularmente en aquellas que se encuentran en grave riesgo de extinción; además, este método puede ser una alternativa viable en cuanto a los costos de manutención de equipos de refrigeración.

Literatura citada

Arias, S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. Rev, Soc. Mex. Hist. 44:109-115

Baskin, J.M. y Baskin, C.C. 1998. Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press. California pp.545-566

Beardmore, T.,y Whittle, C. A. 2005. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. P.O. Box 4000, Fredericton, NB E3A 5P7, Canadá 25 (8): 965-972

Chetverikova, E.P., Shabaeva, E.V. y Yashina, S.G. 2006. The effect of seed freezing on morphological characteristics of four Pink species. Biofizika 51(1):136-143

Cherevchenko, T. M., y Kushnir, G. P. 1986. Orkhide v kul´ture (Orchids in the culture), Kiev: Naukova Dumka

Chin, H. F., 1994. Seed banks: conserving the past for the future. Seed Science and Technology 22:385-400.

CITES. 2008. Appendices I, II and III to the convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. US Fish & Wildlife Service, Washington, DC.

Crane, J., Miller, A. L., Van Roekel, J. W., y Walters, C. W. 2003. Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of *Cuphea* seed. Planta 217: 699-708

García-Mendoza, A. J. 2007. Los Agaves de México. [en línea] 2007, (julio-septiembre) : [fecha de consulta: 12 de diciembre de 2010]

Gonzáles-Benito, M. E.; Iriondo, J. M. y Pérez-García, F. 1998. Seed cryopreservation: an alternative method for conservation of Spanish endemics. Seed Science Technology 26: 257-262.

Gosling, P. G. 1989. The effect of drying *Quercus robur* acorns to different moisture contents, followed by storage, either with or without imbibitions. Forestry 62: 41-50

Grishchenko, V. I. y Alekseevskaya, E. I. 2003. Usp. Soverem Biol. 123, 435-444. En: Chetverokova, E.P., Shabaeva, E.V., and Yashina, S.G. 2005. The effect of seed freezing on morphological characteristics of four pink species. Biophysics Russian. 51(1):109-114

Hamilton, K. N.; Ashmore, S. E.; y Drew, R. A. 2005. Investigations on desiccation and freezing tolerance of *Citrus australasica* seed for *ex situ* conservation. Pp 157-161 En: Adkins SW, Ainsley PJ, Bellairs SM, Coates DJ, Bell LC (eds) Proceedings of the 5th Australian Workshop on Native Seed Biology, Brisbane, Quesland, June 2004, ACMER

ISTA. Internacional Seed Testing Association, 2009, http://www.seedtest.org (accesada en marzo 2009)

Iriondo, J. M., Pérez, C., y Pérez-García, F. 1992. Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and wild species. Seed Science and Technology 20:165-171

Lee, J. M. y Looney, N. E. 1978. Changes in abscisic acid and gebberellin levels in apple seeds durinh stratification and their relationship to genetic composition. Canadian Journal of Plant Science 58: 761-767

Martinková, Z., y Honék, A. 2007. The effect of cryopreservation on germination of Dandelion seeds. Plant Protect. Sci., 43: 63-67

Murashige, T., y Skoog, K. 1962. A revised médium for repid growth and biossays with tabacco tissue cultura. Physiolgy Plantarum. 5: 473-497

Nikishina, T.V. Popov, A.S., Kolomeitseva, G.L., y Golovkin, B.N. 2001. Effect of cryoconservation on seed germination of rare tropical Orchids. Russian Journal of Plant Physiology. 48(6):810-815

Pinfield, N. J., Stutchburry, P. A. y Bazaid, S. M. 1987. Seed dormancy in *Acer*: is there a common mechanism for all *Acer* species and what part is played in it by abscisic acid. Physiologia Plantarum 22: 845-850

Pimienta, B.E. y Del Castillo, R.F. 2002. Reproductive biology. Pp.75-90. En: Nobel, P.S. (ed). Cacti biology and uses. University of California Press, L.A., EUA.

Pritchard, H. W. 1984. Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. Cryoletters. 5:295-300

Pritchard, H. W. 2000. Cryopreservation and global warming! Cryoltters 23:281-282.

Pritchard, H. W. 2007. Cryopreservation of desiccation tolerant Seeds. pp 183-189 En: Day JG, Stacey GN (eds) Cryopreservation and freeze-drying protocols. Human Press Inc., Totowa, NJ.

Pritchard, H. W. 2008. Cryopreservation of Orthodox (Desiccation Tolerant) Seeds. pp 485-501 En: Barbara M. Reed (Ed.), Plant Cryopreservation, A Practical Guide, Springer USA.

Sakai, A y Noshiro, M. 1975. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquid nitrogen. pp 317-326 En: Frankel OH, Hawkes JG (eds) Crop Genetic Resources for today and tomorrow. Cambridge University Press, Cambridge UK.

SEMARNAT, 2002. http://www.semarnat.gob.mx (accesada en Mayo 2009)

Silvertown, J.W. y Lovett-Doust, J. 1993. Introduction to plant population biology. Blackwell Scientific Publications. Oxford

Stanwood, P. C. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: Karth, K. K. (ed). Cryopreservation of plant cells and organs. Boca Ratón, CRC Press

Stanwood, P. C. y Bass, L. N. 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. Seed Science and Technology. 9:423-437

Sun, W. Q. 2002. Methods for the study of water relations under desiccation stress. pp 47-91 En: Black M, Pritchard HW (eds.) Desiccation and survival in plants: Drying Withuot Drying CABI publishing, Wallingford, UK.

Tarré, E., Mendes-Pires, B., Mancano, G. A., Alves, C. L. Campostrini, F. R. y Mansur, E. 2007. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seed from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult & Schult. F. and *Dykia* Schult & Schult. F. species (Bromeliaceae). Acta botanica brasileña 21(4):777-783

Tikhonova, V.L., Lysykh, N.L., y Firsanova, V.M. 1997. Freezing effect on the viability of wild plants. Byull, Gl. Bot. Sada, Ross. Akad Nauk, 175: 83-90

Vertucci, C.W. 1989. Relationship between termal transitions and freezing injury in pea and soybean seeds. Plant Physiology 90: 1121-1128.

Vertucci, C. W., y Roos, E. E. 1993. Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperatura on optimal moisture levels. Seed Science Research 3:201-213

VI. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos corroboraron la hipótesis central establecida para esta investigación; en la que se establecía que las semillas ortodoxas mantenidas a bajos contenidos de humedad y bajas temperaturas en su almacenamiento, permitirían que mantengan su viabilidad a largo plazo, incluso en temperaturas por debajo del punto de congelación. Aún en temperatura ambiente (26 °C), las semillas de *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus* con 3-4 % de contenido de humedad mantuvieron porcentajes de germinación de 88.3 y 80 % respectivamente; lo que indica que mantener contenidos de humedad mínimos en semillas ortodoxas puede prolongar su viabilidad aunque estas se almacenen en temperaturas superiores a 26 °C; en semillas de *Arachis hipogea* (cacahuate) con contenido de humedad de 1.7 % se mantuvieron altos porcentajes de viabilidad (80 %) por más de dos años de almacenamiento a menos de 50 °C, a diferencia de los tratamientos que registraron 4.4 % o más de humedad (Sastry *et al.,* 2007). En *G. uncinatus* se observó una tendencia clara a la disminución de viabilidad conforme transcurre el tiempo de almacenamiento bajo todas las temperaturas ensayadas; posiblemente debido al efecto que produce la desecación de las semillas, lo que provoca que el canal de entrada de agua se vea obstruido y se reduzca notablemente la disponibilidad de agua para que la semilla logre germinar (Orozco-Segovia *et al.,* 2007).

La mejor temperatura de almacenamiento fue la de -70 °C con viabilidad de 92.3 % en *A. victoriae-reginae* y 93.5 % para *G. uncinatus*; sin embargo, esta alternativa de almacenamiento puede llegar a tener problemas si se suspende el suministro de energía eléctrica o el equipo se descompone, que pueden ocasionar pérdidas en la viabilidad de las semillas almacenadas en estos medios hasta el momento en que se logre solucionar el problema. Esto representa un gasto de mantenimiento elevado en comparación al uso de tanques criogénicos, donde sólo es necesario mantener el nivel adecuado de nitrógeno líquido de las muestras almacenadas. Los ensayos de criopreservación realizados para *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus,* no reflejaron bajos porcentajes de germinación al almacenar las

semillas en nitrógeno líquido, mostrando que éste es un método adecuado para preservar estas especies, siempre y cuando se sometan a desecación previa a su almacenamiento en rangos de 3-4 % de contenido de humedad, para garantizar mantener altos porcentajes de viabilidad; además de no tener que utilizar obligatoriamente crioprotectores. Hirano *et al.,* 2009, mencionan que en semillas de *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae), el uso de crioprotectores y un proceso de vitrificación es altamente recomendable para su almacenamiento en nitrógeno liquido, la falta de éstos afectó la viabilidad de las semillas deshidratadas a 5 % de humedad y almacenadas en N_2L, problema que no se presentó en *A. victoriae-reginae* y *G. uncinatus.* La criopreservación puede actuar en muchas especies de plantas como un estimulador de la germinación (Grishchenko and Alekseevskaya, 2003), esto si consideramos que en *G. uncinatus* el control de germinación fue de 75 % y tras el almacenamiento en nitrógeno líquido este incrementó entre 82-97 %.

En cuanto al desarrollo de las estructuras de las plantas provenientes de las semillas criopreservadas (almacenamiento en N_2L) de las dos especies, no se observaron anormalidades; sin embargo existieron diferencias en los volúmenes de las platas y longitudes de sus raíces (datos no mostrados), lo cual pudo deberse a los procesos de enfriamiento y descongelación que alteran la permeabilidad de las semillas y con ello diferentes niveles de absorción tanto de nutrientes como entrada de agua (Tikhonova *et al.,* 1997). Sin embargo, el proceso de almacenamiento en bajas temperaturas, no tuvo efectos perjudiciales sobre el desarrollo y crecimiento de las plantas tanto en *A. victoriae-reginae* como en *G. uncinatus.* Se puede concluir, que el descenso de la humedad en niveles de 3-4 % mantiene la viabilidad de las semillas de ambas especies aún en temperaturas ambiente, así como el almacenamiento a temperaturas por debajo del punto de congelación, siendo -70 °C la mejor temperatura la indicada por los análisis estadísticos; no obstante, se puede por recomendar por cuestiones económicas el uso de los métodos de criopreservación en nitrógeno líquido, ya que tienen la ventaja de ser más económicos y representar menos peligro de pérdida de materiales biológicos por descomposturas, además de que en espacios reducidos se puede tener

representada una alta diversidad y variabilidad genética de las especies más vulnerables o en amenaza de desaparecer; siempre y cuando se mantengan las condiciones necesarios de humedad para su criopreservación

Literatura citada

Grishchenko, V.I. y Alekseevskaya, E.I. 2003. Usp. Soverem Biol. 123, 435-444. En: Chetverokova, E.P., Shabaeva, E.V., and Yashina, S.G. 2005. The effect of seed freezing on morphological characteristics of fuor pink species. Biophysics Russian. 51(1):109-114

Hirano, T., Godo, T., MyosiI, K., Ishikawa, K., Ishikawa, M. y Mii, M. 2009. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervillaea.* Plant Biotechnol Rep. 3:103-109

Sastry, D.V., Upadhyaya, H.D, y Gowda, C.L.L. 2007. Survival of groundnut seeds under different storage conditions. SAT ejournal. ICRISAT. Vol. 5 Issue 1

Orozco-Segovia, A., Márquez, G. J., Sánchez, C. M. E., Gamboa De Buen, A., Baskin, J. M., y Baskin, C. C. 2007. Seed Anatomy and wáter uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). Annals of Botany 99: 581-592

Tikhonova, V.L., Lysykh, N.L., y Firsanova, V.M. 1997. Freezing effect on the viability of wild plants. Byull, Gl. Bot. Sada, Ross. Akad Nauk, 175: 83-90