

Universidad de Ciego de Ávila
“Máximo Gómez Báez”
Centro de Bioplantas


**Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)
modelo para caracterizar los efectos de la
crioconservación en la germinación, el
crecimiento y desarrollo de las plantas.**

***Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas***

INAUDIS CEJAS CALDERÓN

Ciego de Ávila

2014



Universidad de Ciego de Ávila
“Máximo Gómez Báez”
Centro de Bioplantas

**Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)
modelo para caracterizar los efectos de la
crioconservación en la germinación, el
crecimiento y desarrollo de las plantas.**

***Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas***

Autor: Ing. Inaudis Cejas Calderón MSc.

Tutores: Ing. José Carlos Lorenzo Feijoo Dr. C.

Ing. Marcos Edel Martínez Montero Dr. C.

Consultante: Ing. M^a de los Angeles Torres Mederos Dr. C.

Ciego de Ávila

2014

Citación correcta Norma ISO 690

Según Sistema de Referencia Numérico

Cejas-Calderón, Inaudis. Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) modelo para caracterizar los efectos de la criopreservación en la germinación, el crecimiento y desarrollo de las plantas. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Ciego de Ávila: Universidad "Máximo Gómez Báez", 2014.

Según Sistema de Referencia Apellido, año

Cejas-Calderón, Inaudis. 2014. Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) modelo para caracterizar los efectos de la criopreservación en la germinación, el crecimiento y desarrollo de las plantas. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Ciego de Ávila: Universidad "Máximo Gómez Báez".

Dedicatoria

A la memoria de mi padre

A mis dos amores Javier y Lisandra

A mami, a Ida y a Carly

Agradecimientos

A mi familia, por comprenderme y perdonarme todo el tiempo que no estuve presente.

A Jose (Dr. José Carlos Lorenzo) por ser un amigo y tutor excelente. Porque confió en mí, no dudó en ofrecerme su experiencia y fortaleza en este reto que hemos compartido juntos, tus criterios y conocimientos fueron esenciales.

Al crio (Dr. Marcos Edel Martínez) por aceptar un día la idea de ser mi tutor y estar ahí ofreciéndome sus consejos oportunos.

A Mery (Dra. María de los Ángeles Torres) y su madre Paula por sus sabios consejos.

A Carlí (Dr. Carlos Aragón) por ser buen amigo y darme parte de su valioso tiempo y los mejores consejos.

A Justo (Dr. Justo González) por guiarme, y aclarar mis dudas siempre que lo necesité.

A Yaima y Diego que cuidaron de mis experimentos como suyos y contribuyeron a mis resultados.

A Martha (Dra. Martha Hernández) porque puso en mis manos toda su sapiencia.

A Karel, mi alumno ayudante, por saber que puedo contar con él.

Al viejo (Dr. Reynaldo Trujillo) por dedicarme parte de su sabiduría infinita.

A Lurdita (Dra. Lourdes Yabor) gracias por ser amiga y siempre estar ahí para levantarme el ánimo.

A Maritza (Dra. Maritza Escalona) por ser la primera en guiarme en el camino de las ciencias.

A Richard (Dr. Ricardo Rodríguez) por darme ánimos y apoyarme siempre.

A Maribel y Rene por su tiempo y apoyo en el laboratorio.

Al Centro de Bioplasmas por abrirme sus puertas y contribuir en mi formación.

A Isamis, por estar siempre que lo necesité.

A Maita, Idania, Sara, Leya y Luly porque han estado al alcance de mis manos en esta larga travesía.

A Daya, María Emilia y Elizabeth por ser amigas incondicionales.

A Martha Delfín y su hijo Angelín por hacer de su casa la mía.

A Carolina y Luis, amigos de la República Bolivariana de Venezuela, por hacer más corta la distancia.

A Alitza, Julia y Ermis por su apoyo.

Al Chino de la imprenta por todas las molestias que le di y siempre tener un sí para mí.

A todos mis compañeros del departamento de Ciencias Básicas con los que diariamente comparto parte de mi vida.

A los amigos Enar y Jorge con los que comparto el café de los viernes y me ayudan a liberar el estrés.

A todos los que de una forma u otra han contribuido al desarrollo de esta obra.

MUCHAS GRACIAS!!!

Abreviaturas:

NL: *Nitrógeno líquido*

ANOVA: *Análisis de varianza*

Cfr: *Confróntese*

CVG: *Coeficiente de variación general*

Cl a: *Clorofila a*

Cl b: *Clorofila b*

ADN: *Ácido desoxirribonucleico*

SSR: *Secuencia simple repetida*

PCR: *Reacción en cadena de la polimerasa*

EROs: *Especies reactivas del oxígeno*

HR: *Humedad relativa*

dNTP: *Dinucleótido*

Unidades de medidas:

°C: *grados Celcius*

mm: *milímetro*

mL: *mili litros*

μmol: *micro mol*

μL: *micro litros*

m: *metros*

min: *minutos*

s: *segundos*

h: *horas*

nm: *nano metros*

§: *epígrafe*

SÍNTESIS

La pérdida de recursos genéticos adquiere cada día mayor importancia para la conservación en los bancos de germoplasma, donde el deterioro de las condiciones fisiológicas de las semillas almacenadas es un problema que aún está por solucionar. La crioconservación, es un método donde se logra detener los procesos metabólicos y los mecanismos fisiológicos responsables del envejecimiento de estas. En esta investigación se utiliza como modelo semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y se realiza un análisis de mecanismos fisiológicos y bioquímicos que afectan a las semillas ortodoxas una vez que son sometidas a la crioconservación, considerando las respuestas que en ellas se producen. No se observaron cambios visibles en las semillas de frijol, después de la descongelación; sin embargo, a nivel bioquímico sí ocurrieron variaciones significativas en los indicadores relacionados con el proceso de germinación. Fue en las raíces donde más se reflejó la variabilidad de los indicadores fisiológicos y bioquímicos por el efecto de la crioconservación de las semillas; aunque, no se produjeron modificaciones morfo-agronómicas en el crecimiento y desarrollo de las plantas, ni alteraciones apreciables en la región del ADN evaluado. Después de seis meses de conservación la viabilidad de las semillas que se almacenaron a 4°C fue significativamente menor que las crioconservadas y los 15 genotipos seleccionados para el ensayo respondieron bien a la crioconservación, en todos los casos se observó una germinación superior al 90%. Los resultados de la tesis permiten incrementar el nivel de confianza en esta técnica biotecnológica y se sientan las bases que permiten que el desarrollo de la crioconservación adquiera cada vez más confianza para usarse como técnica complementaria por los curadores de germoplasma.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Generalidades del cultivo del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	6
2.1.1. Taxonomía y origen	6
2.1.2. Breve reseña histórica sobre el origen del frijol. Su presencia en Cuba	7
2.1.3. Características botánicas y etapas de desarrollo de la planta de frijol	8
2.2. Desarrollo y maduración de la semilla.....	10
2.2.1. Viabilidad y deterioro de la semilla, aspectos biológicos relacionados con la preservación de los recursos genéticos	12
2.3. Conservación de los recursos fitogenéticos con énfasis en la crioconservación.....	14
2.3.1. Empleo de la crioconservación para la preservación de semillas ortodoxas	19
2.4. Estudios del germoplasma posterior a la crioconservación. Empleo de las técnicas de análisis para esclarecer las respuestas del germoplasma crioconservado.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.0. Generalidades.....	25
3.1. Determinación del efecto de la crioconservación en indicadores fisiológicos y bioquímicos en etapas tempranas de la germinación de semillas de frijol var. Milagro Villareño.....	26
3.1.1. Clasificación del Coeficiente de Variación General (CVG)	26
3.1.2. Análisis del efecto de la crioconservación en indicadores fisiológicos y bioquímicos después de la descongelación de semillas de frijol var. Milagro Villareño	30
3.2. Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol var. Milagro Villareño en el crecimiento y desarrollo de dos generaciones de plantas cultivadas en canteros.....	30
3.2.1. Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol en indicadores bioquímicos en raíces y tallos de plantas cultivadas en canteros	32

3.2.2. Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol en indicadores morfo-agronómicos de plantas cultivadas en canteros	32
3.2.3. Caracterización molecular de las plantas con el empleo de microsatélites (SSR)	33
3.3. Determinación del efecto de la crioconservación y el tiempo de almacenamiento en la viabilidad de las semillas de frijol var. Milagro Villareño.....	35
3.4. Determinación del efecto de la crioconservación en la germinación de diferentes genotipos de frijol.....	36
3.5. Análisis del efecto económico de la crioconservación de semillas de frijol.....	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1. Determinación del efecto de la crioconservación en indicadores fisiológicos y bioquímicos después de la descongelación de semillas de frijol var. Milagro Villareño.....	38
4.1.1. Clasificación del Coeficiente de Variación General (CVG)	38
4.1.2. Análisis del efecto de la crioconservación en indicadores fisiológicos y bioquímicos después de la descongelación de semillas de frijol var. Milagro Villareño	42
4.2. Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol var. Milagro Villareño en el crecimiento y desarrollo de dos generaciones de plantas cultivadas en canteros.....	74
4.2.1 Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol en indicadores bioquímicos en raíces y tallos de plantas cultivadas en canteros	74
4.2.2. Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol en indicadores morfo-agronómicos en plantas cultivadas en canteros	79
4.2.3. Caracterización molecular de las plantas con el empleo de microsatélites (SSR)	81
4.3. Determinación del efecto de la crioconservación y el tiempo de almacenamiento en la viabilidad de las semillas de frijol var. Milagro Villareño.....	85
4.4. Determinación del efecto de la crioconservación en la germinación de diferentes genotipos de frijol.....	89
4.5. Análisis del efecto económico de la crioconservación de semillas de frijol.....	92

5. CONCLUSIONES	95
6. RECOMENDACIONES	96
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1. INTRODUCCIÓN

Entre las semillas ortodoxas, las de leguminosas tienen un papel importante en la agricultura. Estas realizan su principal contribución a la dieta de hombres y animales pues los niveles de proteínas en las semillas superan tres veces la de los cereales (Gepts *et al.*, 2005). El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano de mayor importancia destinada al consumo humano en climas templados y tropicales. A nivel mundial, ocupa el tercer lugar en producción, con 23 millones de toneladas en el año 2011, superada solamente por la soya y el maní (FAOSTAT, 2012).

Para preservar los recursos fitogenéticos de muchos cultivos con semillas ortodoxas, se utiliza los bancos de germoplasma, cuyo objetivo fundamental es mantener accesiones de alta viabilidad durante períodos prolongados (Rao *et al.*, 2006). En ellos se proporciona la materia prima para el mejoramiento de los cultivos y cumplen una función vital en el desarrollo sostenible de la agricultura.

Las semillas ortodoxas se almacenan a temperaturas entre -18°C y -20°C por largos períodos (Rao *et al.*, 2006), aunque la conservación convencional normalmente incluye el almacenamiento a temperaturas comprendidas entre 5°C y -20°C. Tales condiciones reducen la actividad metabólica y los procesos relacionados con la pérdida de la viabilidad y el vigor. Sin embargo, aun en las mejores condiciones de almacenamiento, las semillas sufren un deterioro progresivo o envejecimiento (Cardoso *et al.*, 2000) que está relacionado con la acumulación de metabolitos tóxicos, la mezcla mecánica, el cruzamiento de los materiales y presiones de selección en poblaciones silvestres o variedades.

El deterioro de las semillas (Mc Donald, 1999) se produce por la pérdida de la integridad de la membrana celular y de orgánulos intracelulares, específicamente lo concerniente a la

alteración/degradación de los componentes lipídicos de las mismas y donde se afecta la actividad enzimática y ocurren perturbaciones metabólicas (respiración celular y el incremento de compuestos volátiles). Aunque, los mecanismos exactos que conducen a la pérdida de la viabilidad de las semillas no están completamente elucidados, la susceptibilidad a envejecer varía dentro de las familias y las especies (Walters *et al.* 2005; Niedzielski *et al.* 2009; Nagel y Borner 2010).

Para evitar la desaparición de recursos fitogenéticos, son necesarias políticas de conservación cada vez más eficaces en las que la incorporación de técnicas derivadas del desarrollo de la biotecnología pueden cumplir un papel esencial (Benson, 2008; Berjak *et al.*, 2011). Por ello, desde la década del 80 del siglo pasado, se utiliza la crioconservación como técnica complementaria dentro de los bancos de germoplasmas que garantizan la conservación de las especies (Benson, 2008).

Roberts (1973) clasifica las semillas como ortodoxas y recalcitrantes, y para ello se basa en su respuesta fisiológica, el contenido de humedad y su comportamiento en almacén. Las semillas ortodoxas o tolerantes a la desecación son capaces de mantener su viabilidad tras ser desecadas a menos de 5-10% de contenido en humedad.

La crioconservación vegetal es una disciplina científica relativamente nueva que surge a partir de que Sakai (1960) demuestra que ciertas yemas latentes pueden resistir la inmersión directa en nitrógeno líquido (NL), y es en 1968 cuando se publica el primer informe sobre crioconservación de material vegetal *in vitro* (Quatrano, 1968). Con este método, sin embargo, las semillas se almacenan a temperaturas inferiores a -130°C (Walters *et al.*, 2004), habitualmente mediante su inmersión en nitrógeno líquido (-196°C) con la capacidad de mantener su viabilidad por largos períodos.

En estas condiciones el metabolismo se detiene (Stanwood, 1985) y con ello, los procesos de deterioro responsables de la pérdida de viabilidad de las semillas y se asegura su conservación. A temperaturas criogénicas, la fluidez de las partes acuosas y no acuosas de las semillas se reducen (Walters *et al.*, 2004), lo que contribuye a su lento deterioro.

La crioconservación de semillas ortodoxas constituye una alternativa a los bancos de semillas convencionales (Engelmann 2000, 2004, 2010; Salinas-Flores *et al.*, 2008; Forni *et al.*, 2010; Berjak *et al.*, 2011; Engelmann y Rao, 2012), principalmente para muestras de las que no se dispone gran cantidad de semilla y de las que no es factible realizar nuevas recolecciones (Stanwood, 1985; Kulus y Zalewska, 2013). También se emplea para la conservación de muestras representativas de una colección entera, lo que permite una evaluación más eficiente de la diversidad genética y sirve para la identificación y reposición de accesiones de alto valor económico (Staub, 2002), donde se incluye la máxima variación genética de una colección entera con un mínimo de repeticiones (van Hintum *et al.*, 2000).

En especies de leguminosas se informa del uso de la crioconservación por varios investigadores. En todos los casos, la investigación se centra en la evaluación de parámetros, entre los que se encuentra el contenido de humedad de las semillas, tamaño, anatomía, las velocidades de enfriamiento (*cooling*) y recalentamiento (*rewarming*) (Stanwood y Bass, 1981; Vertucci, 1989; Engelmann, 2000), y a determinación la viabilidad (Cardoso *et al.*, 2000).

La técnica de crioconservación se utiliza ampliamente en especies con semilla recalcitrante (Berjak y Pammenter, 2008; Berjak *et al.*, 2011), donde se ha estudiado el comportamiento fisiológico y la estabilidad genética de plantas procedentes de ese material después de la

crioconservación; sin embargo, existen pocas referencias relacionada con la caracterización desde el punto de vista bioquímico, fisiológico y molecular del efecto de la crioconservación en semillas ortodoxas, tanto en la germinación como en la capacidad para producir plantas.

Problema científico:

La pérdida de recursos genéticos adquiere cada día mayor importancia para la conservación en los bancos de germoplasma. Sin embargo, en este contexto y desde el punto de vista agronómico, el deterioro de las condiciones fisiológicas de las semillas almacenadas en los bancos de germoplasma es un problema que aún está por solucionar. Por ello, el efecto de la crioconservación en la viabilidad de semillas ortodoxas crioconservadas, así como el crecimiento y desarrollo de plantas procedentes de estas, debe ser probado antes de usar esta técnica como forma de conservación a largo plazo.

A partir de la hipótesis: “La crioconservación de semillas de frijol permite conservar genotipos seleccionados con poco riesgo de variaciones morfo-agronómicas y genéticas, como contribución a los programas de mejoramiento”, el presente trabajo experimental abordó como *objetivo general*:

Demostrar que la crioconservación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) constituye una técnica complementaria que garantiza la conservación de semillas ortodoxas a largo plazo sin variaciones morfo-agronómicas ni genéticas.

Objetivos específicos:

2. Determinar el efecto de la crioconservación en la fisiología y en indicadores bioquímicos de las semillas de frijol durante la germinación y el crecimiento temprano.

3. Determinar el efecto de la crioconservación en la estabilidad fenotípica y genotípica de plantas de frijol.
4. Determinar el efecto de la crioconservación de semillas de frijol en el tiempo de almacenamiento y en diferentes genotipos.

NOVEDAD CIENTÍFICA: Para el desarrollo de esta investigación se utiliza como modelo semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), se realiza un estudio de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que afectan a las semillas ortodoxas una vez que son sometidas a la crioconservación y se analizan las respuestas que se producen en ellas. Los resultados de la tesis hacen un aporte al conocimiento de los procesos metabólicos que pueden afectar a la semilla una vez aplicada la crioconservación y se hace uso de técnicas de avanzada como los marcadores moleculares para validar la estabilidad genética de las plantas procedentes de semillas crioconservadas, lo que incrementa el nivel de confianza en esta técnica biotecnológica. Con estos resultados se sienta las bases para que el desarrollo de la crioconservación adquiera cada vez más confianza para usarse como técnica complementaria por los curadores de germoplasma.

VALOR PRÁCTICO: Los estudios realizados demuestran que, la crioconservación se puede aplicar para la conservación a largo plazo de semillas de frijol, y de esta forma, preservar genotipos seleccionados de una especie básica en la seguridad alimentaria, que puedan estar disponibles para su uso en programas de mejoramiento genético futuros.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades del cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

2.1.1. Taxonomía y origen

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) pertenece al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, orden *Fabales*, familia *Fabaceae* y constituye uno de los cultivos más antiguos de los que se tiene conocimiento (Kaplan, 1965). En el género *Phaseolus sensu stricto* (Delgado-Salinas, 1985) se han identificado 52 especies diferentes y su número cromosómico es $2n = 2x = 22$ (Singh *et al.*, 1996). Estudios sobre el origen de las especies de plantas cultivadas indican la existencia de dos grupos genéticos: el Mesoamericano y el Andino (Delgado-Salinas *et al.*, 2006; Blair *et al.*, 2007; Singh y Schwartz, 2010).

Estos dos grupos genéticos tienen varios centros de domesticación. Los cultivares del grupo genético Mesoamericano predominan en las regiones de México, América Central y Brasil (Blair *et al.*, 2007) y se encuentran divididos en tres razas: la Mesoamericana (M), que agrupa el frijol cultivado de México y Centro América y se caracteriza por ser cultivares de semillas relativamente pequeñas y adaptadas a zonas bajas y climas calientes; la raza Durango (D), compuesta fundamentalmente, por genotipos cultivables de semillas de tamaños medianos y adaptados a las zonas secas de México; y, por último, la raza Jalisco (J), que se puede encontrar en las regiones más húmedas de México y está compuesta en su mayor parte por cultivares con semillas de tamaño mediano (Beebe *et al.*, 2001).

El grupo genético Andino está subdividido también en tres razas (Blair *et al.*, 2007; Blair 2010). Una de estas razas es la Nueva Granada (N), cuyo origen se encuentra al norte de los Andes; y es la más cultivada del grupo. La raza Perú (P) por su parte, agrupa los frijoles adaptados, fundamentalmente, a ambientes de zonas altas por encima de 2000 msnm. Así mismo, la raza Chile (C) es típica de la zona de Chile y sus cultivares se caracterizan por el

tamaño mediano de su semilla comercial y su forma redondeada u ovalada, con colores claros (Beebe *et al.*, 2001; Rodiño *et al.*, 2001).

El frijol cultivado en el Caribe incluye representantes de los dos centros de origen. Probablemente, los primeros frijoles introducidos en Cuba fueron cultivares de semillas grandes, traídos por los Tainos, tribus Arawak, desde los Andes, pasando por las Antillas Mayores. Los de semillas pequeñas podrían haber llegado desde México, de las costas del Caribe de Colombia, Venezuela y Brasil (Blair *et al.*, 2007). Una segunda vía de introducción pudo haber ocurrido desde América Central, siguiendo la ruta desde Yucatán a Cuba y a la Española (Blair *et al.*, 2007).

2.1.2. Breve reseña histórica sobre el origen del frijol. Su presencia en Cuba

El género *Phaseolus* fue originalmente descrito por varios autores, pero su validez fue confirmada por Bertham (1840), quien lo colocó en la tribu *Phaseolae*, subtribu *Euphaseolae*, y se considera como carácter básico para ser reconocido la quilla espiralada. Años más tarde se elabora una revisión de las especies del género basada en la revisión genética de Bertham y establece cinco secciones. Actualmente se acepta que *Phaseolus* se originó en el continente americano, donde se extiende principalmente en las regiones intertropicales en latitudes intermedias.

En Cuba, su origen está ligado a la fundación, en abril de 1904, de la Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas, actual Instituto de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical Alejandro de Humboldt (INIFAT) del Ministerio de la Agricultura. En un estudio más acabado sobre el género *Phaseolus* en Cuba, Castiñeiras (1992) define que de las 13 especies informadas para el país, sólo tres pertenecen a este género y están representadas en la flora cubana: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L. y *P. coccineus* L.

Desde 1978, Cuba se integró al Programa Regional para Centroamérica y el Caribe (PROFRIJOL) que agrupa a once países. Además del apoyo científico del Centro Internacional de la Agricultura Tropical (CIAT) y otras instituciones científicas, existe un programa de mejoramiento genético del frijol y el país dispone de un potencial científico que puede contribuir a hacer más eficiente el trabajo de mejoramiento genético del cultivo. Estas son, sin lugar a dudas, fortalezas del Programa Nacional de Frijol Común (PNFC).

2.1.3. Características botánicas y etapas de desarrollo de la planta de frijol

El frijol es una planta dicotiledónea con un sistema radical superficial. Aunque generalmente se distingue la raíz primaria, el sistema radical tiende a ser fasciculado, fibroso en algunos casos, pero con una amplia variación incluso dentro de una misma variedad. *Phaseolus vulgaris* L. presenta nódulos distribuidos en las raíces laterales de la parte superior y media del sistema radical y la composición y el tamaño dependen de las características del suelo.

El tallo está formado por la sucesión de nudos y entrenudos, y se origina del meristemo apical del embrión de la semilla. Desde la germinación, y en las primeras etapas de desarrollo de la planta, este meristemo tiene fuerte dominancia apical y en su proceso de desarrollo genera nudos.

La disposición del meristemo terminal es el principal elemento para distinguir el hábito de crecimiento de las plantas de frijol. Las que tienen hábito de crecimiento de Tipo I poseen pocos nudos, terminan en inflorescencia, permanecen erectas, tienden a ser de semillas grandes, precoces, con período de floración corto, de bajo potencial de rendimiento (aunque se puede compensar con mayor densidad de plantas), de madurez uniforme, tallo fuerte y grueso, la altura de vainas es relativamente alta y tienen vainas largas. Las de Tipo II, por su parte, se mantienen erectas, presentan una pequeña guía en el tallo principal y las ramas

no producen guías, son de mayor potencial de rendimiento y mayor número de nudos (11 a 14) que las del Tipo I, tienden a ser de vainas y semillas chicas, y de ciclo biológico intermedio a tardío.

Las hojas del frijol son de dos tipos, simples y compuestas, insertadas en los nudos del tallo y las ramas. Las hojas primarias son simples, aparecen en el segundo nudo del tallo, se forman en la semilla durante la embriogénesis y caen antes de que la planta esté completamente desarrollada. Las hojas compuestas trifoliadas son las hojas típicas del frijol y tienen tres folíolos, un pecíolo y un raquis. En la inserción de las hojas trifoliadas hay un par de estipulas de forma triangular que siempre son visibles.

Las inflorescencias pueden ser terminales o axilares. Desde el punto de vista botánico, se consideran cimosas, es decir, un racimo principal compuesto de racimos secundarios, los cuales se originan de un complejo de tres yemas (tríada floral) que se encuentra en las axilas formadas por las brácteas primarias y el raquis. La flor del frijol es una típica flor papilionácea.

El fruto es una hoja carpelar con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido. Puesto que el fruto es una vaina, esta especie se clasifica como Leguminosa. Las legumbres pueden ser de diversos colores, uniformes o con rayas, dependiendo de la variedad.

La semilla no posee albumen, por tanto, las reservas nutritivas se concentran en los cotiledones. Así mismo, puede tener varias formas y colores, lo cual caracteriza, a las diferentes variedades. Basados en la morfología y en los cambios fisiológicos que suceden durante el desarrollo de la planta, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) establece una escala para diferenciar las etapas de desarrollo de este cultivo. Esta escala permite referir las observaciones y prácticas de manejo, o etapas de desarrollo fisiológico.

El ciclo biológico de la planta de frijol se divide en dos fases sucesivas: la fase vegetativa y la fase reproductiva (CIAT, 1981). La fase vegetativa se inicia cuando se le brinda a la semilla las condiciones para iniciar la germinación, y termina cuando aparecen los primeros botones florales o los primeros racimos. En esta fase se desarrolla la estructura vegetativa necesaria para iniciar la actividad reproductiva de la planta.

2.2. Desarrollo y maduración de la semilla

En el curso de la evolución de las plantas, la semilla aparece como resultado de la reproducción sexual (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009) para asegurar la supervivencia y perpetuación de la planta madre. Se forma por medio de la embriogénesis cigótica, en un proceso complejo regulado por hormonas y un programa amplio de desarrollo.

La biología de las semillas se divide en tres fases importantes: embriogénesis, dormancia y germinación (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009). La embriogénesis, incluye la morfogénesis y maduración de la semilla, etapa durante la cual el cigoto sufre una extensión y diferenciación celular, acompañado del desarrollo del endospermo, quien suministra reservas para el crecimiento del embrión y se mantienen o se reabsorben durante la maduración de las semillas (Finkelstein *et al.*, 2008). Por otro lado, en la maduración cesa el ciclo celular, disminuye el contenido de humedad, se sintetizan productos de reservas, se acumula ácido abscísico y se establece la dormancia primaria (Hilhorst, 1995; Hilhorst y. Toorop, 1997; Kermode, 2005).

La dormancia es un mecanismo de adaptación que asegura la supervivencia de las plantas, se desarrolla durante el último período de la embriogénesis y retarda la germinación durante largos períodos cuando las condiciones no son favorables (Matilla y Matilla-Vázquez, 2008). Su ruptura incluye cambios fisiológicos y moleculares que afectan la respuesta de la germinación.

Pues, el proceso de germinación incorpora eventos que comienzan con la toma de agua por la semilla y termina con la elongación del ápice embrionario (Bewley, 1997), en un proceso trifásico donde la entrada de agua provoca perturbaciones estructurales particularmente en la membrana, con una pérdida inmediata de solutos y metabolitos de bajo peso molecular. En esta fase ocurre una transición de los fosfolípidos de la membrana, de la fase de gel que se produce durante la maduración, a un estado normal de líquido cristalino (Matilla, 2008). En un período corto de rehidratación, las membranas retornan a su configuración estable, al tiempo que se corta la pérdida de solutos. Estudios realizados por Sandoval *et al.* (1995) demuestran que durante la imbibición de semillas de algodón, la cantidad de N-acetil-fosfatidiletanolamina, un fosfolípido con propiedades estabilizadores de la membrana, incrementa. Ello demuestra que tales moléculas están involucradas en el mantenimiento de su integridad.

Durante la imbibición, las semillas secas reanudan rápidamente su actividad metabólica, por lo que el contenido de humedad es fundamental en el proceso de germinación. De esta manera, semillas inmaduras de muchas leguminosas y de otras dicotiledóneas no son capaces de germinar cuando son separadas de la planta con altos contenidos de humedad; no obstante, pueden hacerlo después de ser secadas (Dasgupta *et al.*, 1982; Kermode *et al.*, 1986). Las semillas de *Phaseolus vulgaris*, sólo son capaces de germinar después que han adquirido la tolerancia a la desecación y alcanzan un máximo de masa seca.

Uno de los primeros cambios que ocurre cuando se reanuda la actividad metabólica es la reactivación de la respiración y el comienzo de la síntesis de proteínas (Weitbrecht *et al.*, 2011) que, además del agua, constituyen la fracción celular más importante. Algunas proteínas tienen propiedades catalíticas y actúan como enzimas; otras, funcionan como

elementos estructurales; y otras más, transportan, hacia o desde el interior de las células, señales específicas (Matilla, 2008).

Todos los componentes (excepto los polisomas que son necesarios para la síntesis de proteínas) están presentes en las semillas secas viables. Junto con la entrada de agua, desaparecen los ribosomas libres porque se integran en el complejo ternario de la síntesis proteica, lo que significa que la síntesis inicial de proteínas se produce sobre los ribosomas almacenados de las semillas secas (Bewley, 1997).

La emergencia radicular marca el fin de la germinación y el comienzo del crecimiento de la plántula (Bewley, 1997), este proceso es una consecuencia de la elongación y no de la mitosis, y es que se lleva a cabo porque los tejidos que envuelven la semilla sufren un proceso de ablandamiento, provocado por el desmantelamiento de la estructura de la pared celular (Matilla, 2008).

Los avances en el estudio de la biología de las semillas ortodoxas, su fisiología y su comportamiento en almacenamiento, conducen al desarrollo de técnicas para manejar adecuadamente las mismas y su preparación para el almacén.

2.2.1. Viabilidad y deterioro de la semilla, aspectos biológicos relacionados con la preservación de los recursos genéticos

La viabilidad es la medida de cuántas semillas de un lote están vivas y pueden llegar a convertirse en plantas capaces de reproducirse en condiciones de campo adecuadas (Rao *et al.*, 2006). Es muy importante que las semillas almacenadas en un banco de germoplasma puedan producir plantas cuando se las siembre en el campo. Por tanto, las semillas deben tener una viabilidad alta al inicio del almacenamiento y mantenerla durante el tiempo que permanezcan en él.

Las semillas con una viabilidad inicial alta sobrevivirán también más tiempo en condiciones de almacén. No obstante, la viabilidad de las semillas se reduce lentamente al comienzo y luego rápidamente a medida que la semilla envejece (Rao *et al.*, 2006). Es importante saber cuándo ocurre esta reducción para tomar acciones conducentes a regenerar la accesión, pues el deterioro excesivo conducirá a la pérdida del material. Tal información se debe determinar antes de almacenarlas en el banco de germoplasma y a intervalos regulares durante el almacenamiento.

Las pruebas de viabilidad pueden tomar de unos cuantos días a varias semanas, dependiendo de la especie. De ser posible, los resultados de las pruebas de viabilidad deben estar listos antes de que las semillas se lleven a almacenamiento en el banco de germoplasma, de manera que las semillas de calidad deficiente se puedan identificar y regenerar.

Existen diferentes métodos para determinar la viabilidad de las semillas; el más exacto y confiable es la prueba de germinación. También existen pruebas bioquímicas, que tienen la ventaja de ser más rápidas, pero no son tan exactas como la prueba de germinación y requieren habilidades especiales para realizarlas e interpretarlas (Rao *et al.*, 2006). Según estos autores, no se recomienda el uso generalizado de estas pruebas para determinar la viabilidad de las semillas en un banco de germoplasma.

La longevidad de las semillas, por su parte, está determinada por interacciones de humedad, temperatura y factores celulares desconocidos que influyen en las reacciones de deterioro (Walters *et al.*, 2005). Las semillas almacenadas no muestran señales de deterioro en un inicio, pero eventualmente alcanzan un estado donde la viabilidad se pierde rápidamente (Walters *et al.*, 2004) y está en dependencia de la susceptibilidad que tenga la semilla para el deterioro. Para analizar la cinética y los mecanismos asociados al deterioro de semillas

Walters *et al.* (2005) utiliza la ecuación cinética de Avrami (1941), que se basa en las propiedades visco-elástica y donde se relacionan parámetros como el porcentaje de germinación, el tiempo y la temperatura de almacenamiento.

La variabilidad de la longevidad entre accesiones de una misma especie está condicionada a factores genéticos relacionados con eventos de maduración y a las condiciones ambientales durante el crecimiento y después de la cosecha. Existen evidencias que muestran que la degradación es mucho menor cuando las células son almacenadas a temperaturas criogénicas que a temperaturas de refrigeración (Walters *et al.*, 2004).

2.3. Conservación de los recursos fitogenéticos con énfasis en la crioconservación

La conservación de los recursos fitogenéticos se categoriza en dos grandes grupos: *in situ* y *ex situ*. El primero consiste en la conservación de las especies en su medio natural, lo cual reviste gran importancia, pues permite la progresión de procesos de evolución (Benson, 2008). El segundo grupo maneja la preservación fuera de su hábitat natural, lo que incluye jardines botánicos, zoológicos, acuarios y bancos de germoplasma.

Los bancos de germoplasma son depósitos de recursos fitogenéticos que proporcionan la materia prima para el mejoramiento de los cultivos (Rao, 2004; Rao *et al.*, 2006). Estos recursos cumplen una función importante en el desarrollo sostenible de la agricultura, en tanto ayudan a aumentar la producción de alimentos.

Las semillas que se almacenan en los bancos de germoplasma son un recurso vital e irremplazable, una herencia que se debe conservar para proveer opciones a la agricultura en el futuro (Berjak *et al.*, 2011). Seguir los procedimientos adecuados en el manejo de las semillas en un banco de germoplasma garantiza que las semillas almacenadas sean de calidad y conserven la máxima longevidad; el objetivo de un banco de germoplasma es mantener accesiones de viabilidad alta durante períodos prolongados.

La pérdida de material genético que está ocurriendo a nivel global y de la cual no está exento el cultivo del frijol, hace imprescindible su conservación en bancos de germoplasma *ex situ*. Esta es, ciertamente, una forma muy efectiva para la preservación de recursos fitogenéticos (Linnington y Pritchard, 2001).

El desarrollo de la biotecnología, por su parte, conduce a la producción de una nueva categoría de germoplasma que incluye clones obtenidos de genotipos élitos, líneas de células con atributos especiales y material genéticamente transformado (Engelmann, 1992). Estos germoplasmas son frecuentemente de un alto valor y de muy difícil procedimiento, el desarrollo de técnicas eficientes para garantizar su conservación es de suma importancia. A la luz de los problemas presentes en diferentes especies vegetales, se realizan esfuerzos para mejorar la calidad y la seguridad de la conservación que ofrecen los bancos de germoplasma y jardines botánicos (Engelmann, 2010), también para comprender y salvar especies de semillas y hacer que su conservación sea un método más sencillo.

Un método que se emplea para la conservación de recursos fitogenéticos es la crioconservación (Reed *et al.*, 2001; Benson, 2008; Reed, 2008a, b; Berjak *et al.*, 2011), donde se almacenan células viables, tejidos, órganos y organismos a temperaturas ultra bajas, usualmente en nitrógeno líquido a un mínimo de temperatura de -196°C . Este método de conservación también se aplica para almacenar diferentes semillas, dentro de las que se incluyen las ortodoxas.

A nivel global, es considerable el interés de diversos investigadores en el uso de las tecnologías de congelación y ultra congelación para la conservación del germoplasma (Berjak *et al.*, 2011), las mismas se aplican en un amplio rango de especies de algas y plantas (Reed, 2008). Day *et al.* (1999) consideran la importancia de la conservación *in*

vitro de micro-algas, incluyendo el uso de la crioconservación, un tópico más adelante explorado por Benson (2004, 2008).

De manera similar, el uso de la crioconservación y las tecnologías reproductivas para la conservación de la diversidad genética de animales fue discutida por Hiemstra *et al.* (2006), sin embargo, el procedimiento para plantas lo profundizó Reed *et al.* (2004). Panis y Lambardi (2006) informaron sobre la evolución de tecnologías para material vegetal, donde se incluyen suspensiones celulares y cultivo de callos de especies herbáceas, polen, brotes meristemáticos, especies forestales, semillas y embriones. También, Keller *et al.* (2008) aseguran que la crioconservación ofrece las mejores condiciones para mantener el material vegetal por largos períodos, principalmente para especies de propagación vegetativa.

El acceso a tecnologías de avanzada es considerado un aspecto prioritario para fortalecer el desarrollo de la ciencia en Cuba. En este sentido, las investigaciones dirigidas a la conservación de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura reciben especial atención y se benefician de apoyos mediante proyectos internacionales y nacionales de cooperación técnica, los cuales fomentan la formación de recursos humanos y la creación de infraestructuras tecnológicas en diferentes instituciones del país (Fundora *et al.*, 2007).

En el área de actividades dedicadas a la conservación *ex situ* se ha trabajado por más de 10 años en diversos bancos de germoplasma asociados al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos. Hasta el presente, la forma de almacenamiento más utilizada sigue siendo el resguardo en colecciones de campo y una pequeña cantidad de muestras es mantenida a largo plazo en bancos de semillas o *in vitro* a corto y mediano plazo mediante la reducción de crecimiento (Latournerie *et al.*, 2009).

Por esta razón, uno de los objetivos estratégicos actuales se refiere al establecimiento y uso de las técnicas de criopreservación como alternativa adicional a las colecciones de plantas enteras, pues se evitaría que el material se encuentre sometido a numerosos riesgos de carácter biótico y abiótico agudizados en los últimos años por el cambio climático en el planeta. Además, se trabaja en el ajuste de protocolos criogénicos sencillos que puedan ser aplicados satisfactoriamente a diferentes especies y que estén al alcance de la mayoría de los laboratorios del país que disponen de bancos de germoplasma (Fundora *et al.*, 2007).

En Cuba, los estudios sobre criopreservación en plantas se inician por un grupo de investigadores pertenecientes al entonces Laboratorio de Criobiología y Liofilización del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) de La Habana (Martínez-Montero *et al.*, 2013). Así mismo, y puede señalarse que se han definido metodologías para criopreservar varias formas cultivables *in vitro de* especies de importancia económica, alimentaria y biotecnológica como caña de azúcar, plátanos y bananos, ajo y papaya, aunque, cada metodología tiene sus peculiaridades en dependencia del centro de investigación donde se ha desarrollado.

Sin embargo, el deterioro de las condiciones fisiológicas de las semillas almacenadas en los bancos de germoplasma es un problema que aún está por solucionar. Es por ello que, los avances tecnológicos en la criopreservación de plantas revelan un posible método para el almacenamiento de semillas a largo plazo.

En una revisión a la literatura especializada desde 1986 hasta 2010, Berjak *et al.* (2011) encontraron numerosos trabajos que detallan el procedimiento de criopreservación para embriones cigóticos y ápices de especies que poseen semillas no ortodoxas. Muchos de los sistemas que se emplean en la criopreservación (suspensiones celulares, callos, meristemas y embriones) contienen alto contenido hídrico intracelular, por lo que son extremadamente

sensibles a daños por congelación (Engelmann, 2010). Esto hace necesario la deshidratación de las células para protegerse de daños causados por la cristalización del agua intracelular al convertirse en hielo (Mazur, 1984), lo que no ocurre en el caso de la crioconservación de semillas ortodoxas.

Las técnicas de crioconservación que se emplean y los mecanismos físicos en los que se basan son diferentes (Withers y Engelmann, 1998). Las clásicas, incluyen la deshidratación por congelación inducida; mientras que las nuevas se basan en la vitrificación, que se define como la transmisión de agua directamente de la fase líquida a la fase amorfa o de cristal (vítrea), y evita la formación de cristales de hielo (Fahy *et al.*, 1984).

La crioconservación clásica encierra un congelamiento lento denominado temperatura de pre congelación, seguida de una rápida inmersión en nitrógeno líquido. Con la reducción de la temperatura durante la congelación lenta, las células y el medio externo se sobre enfrían, a lo que sigue la formación de hielo en el medio (Mazur, 1984). En este caso, la membrana actúa como una barrera que impide que el hielo que se forma en la capa exterior viaje al interior de la célula, y que la célula se mantenga súper fría pero no congelada. Mientras las células y su presión de vapor exceden a su compartimento externo congelado, éstas compensan la pérdida de agua al hielo externo, lográndose de esta forma la deshidratación de las mismas.

Estas técnicas son generalmente operaciones complejas y caras (Kantha y Engelmann, 1994) que se aplican a suspensiones celulares, callos y a ápices de especies tolerantes al frío (Reed y Uchendu, 2008).

La deshidratación es un procedimiento simple que consiste en la deshidratación de las muestras y su rápida congelación en nitrógeno líquido. Esta técnica se emplea

principalmente en embriones zigóticos y ápices embrionarios (Engelmann, 1997 a, b). En el caso de las semillas, primero se desecan y después se introducen en nitrógeno líquido.

2.3.1. Empleo de la criopreservación para la preservación de semillas ortodoxas

Las semillas ortodoxas, son semillas que contienen 5% o menos de humedad (valores con una HR en equilibrio de 10-15% a 20°C) y se pueden almacenar a bajas temperaturas por largos períodos de tiempo (Roberts, 1973); las semillas, como las del frijol, están consideradas semillas ortodoxas a la hora de proceder a su forma de conservación. Toleran la desecación, lo que hace que se puedan conservar a muy bajas temperaturas y las hacen tolerantes a la exposición en nitrógeno líquido (Standwood y Bass, 1981; Stanwood, 1985). Estudios realizados por Walters *et al.* (2004) en semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) evidencia, que la escala de tiempo para los cambios biológicos a temperaturas criogénicas provee información en la eficiencia de los tratamientos de preservación y mecanismos de actividad biológica a temperaturas extremadamente bajas. Estos autores predicen escalas de tiempo en el orden de cientos o miles de años de conservación bajo estas temperaturas; en estas semillas el daño por formación de hielo es considerado improbable.

Otros investigadores (Walters *et al.*, 2005), basándose en la ecuación de viabilidad, plantean que los estimados de longevidad de las semillas a -18°C son aproximadamente de 46-70 años, lo que representa 74 años menos que a las temperaturas criogénicas, esto permite que se pueda mantener en nitrógeno líquido una sub-muestra de cualquier accesión de las que sistemáticamente se almacenan en condiciones clásicas en los bancos de germoplasma.

A estas temperaturas el material se puede almacenar sin alteración o modificación por largos períodos. Así mismo, se realiza en volúmenes pequeños protegidos de contaminación y requiere muy poco mantenimiento (Engelmann, 2004). Con la

crioconservación se puede preservar el ADN, tejidos y germoplasma, porque teóricamente las temperaturas extremadamente bajas frenan la actividad del material biológico (Walters *et al.*, 2004).

A nivel mundial existen varios centros donde se conservan, en colecciones crioconservadas, semillas de especies en riesgo de erosión genética. La conservación de material vegetal, y en particular las semillas con el empleo del NL, puede conducir a la realización de investigaciones destinadas a estudios biofísicos, bioquímicos, morfo-agronómicos y de estabilidad genética y molecular para estudiar su efecto sobre el genoma y la estabilidad genética de las plantas (Harding, 2004).

2.4. Estudios del germoplasma posterior a la crioconservación. Empleo de las técnicas de análisis para esclarecer las respuestas del germoplasma crioconservado

Las técnicas de crioconservación existen para más de 100 especies vegetales. El empleo de NL para la conservación a largo plazo expone el tejido a estrés físico, químico y fisiológico, lo que puede causar daños por las temperaturas ultra bajas (Harding, 2004). Aunque los efectos sobre el genoma es poco conocido, se plantea que, en plantas regeneradas de material procedente del cultivo *in vitro* y posteriormente crioconservadas, cualquier acumulación de ADN polimórfico está inducido como resultado de un proceso completo de cultivo-crioconservación-regeneración y no de la crioconservación *per se* (Harding y Benson, 2001).

El análisis de la integridad genética de las plantas procedentes de materiales crioconservados, se realiza mediante diferentes técnicas, a nivel fenotípico, histológico, citológico, bioquímico y molecular; y existen diferentes técnicas de análisis (Harding, 2004). Por consiguiente, en los últimos años los científicos que se dedican al estudio de las

diferentes técnicas de crioconservación sustentan sus resultados con el empleo de las técnicas de análisis.

Comprender cómo y por qué el germoplasma sobrevive o no en condiciones congeladas, se utiliza para comprender el proceso de crioconservación de plantas (Benson, 2008). Las yemas dormantes y los tejidos naturalmente aclimatados al frío, por ejemplo, sufren cambios estacionales en su metabolismo. Esta es una estrategia que se explota en la crioconservación (Sakai, 2004; Towill y Ellis, 2008).

La simulación de la aclimatación a temperaturas frías y notablemente templadas, en germoplasma de plantas tropicales también le confiere tolerancia al NL (Chang y Reed, 2000; Sakai, 2004). Entender los complejos mecanismos que permiten la supervivencia a las temperaturas bajas en la naturaleza, pueden potencialmente asistir al reconocimiento del estado criogénico. Con este fin, los avances en bioinformática y tecnologías moleculares (Morrison *et al.*, 2006; Rubin *et al.*, 2006; Keurentjes *et al.*, 2008) tienen un importante papel en las investigaciones que conducen al empleo de las técnicas de análisis en la respuesta del estrés (Thomashow, 1999, 2001; Xin, 2001; Sung *et al.*, 2003; Kaplan *et al.*, 2004; Gray y Heath, 2005; Hannah *et al.*, 2005; Renaut *et al.*, 2005, 2006; Yang *et al.*, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2006; Van Buskirk y Thomashow, 2006).

Un ejemplo del empleo de estas investigaciones es la aplicación de la proteómica al estudio del almacenamiento de germoplasma de plantas recalcitrantes, particularmente con respecto a la preservación de meristemas de plantas de propagación vegetativa (Carpentier *et al.*, 2005, 2006, 2007; Vertommen *et al.*, 2007). Como resultado, esta tecnología actualmente se emplea para examinar los efectos de la crioconservación y de tratamientos osmóticos en diferentes tipos de germoplasmas (Criel *et al.*, 2005; Carpentier *et al.*, 2006; Vertommen *et al.*, 2007).

En estudios realizados por Dhanaraj *et al.* (2007) para comprender los procesos relacionados con la tolerancia a la congelación se categorizan tres grupos de genes: los genes relacionados asociados con la tolerancia al estrés, los genes que codifican enzimas de la vía glicolítica y del ciclo de las pentosa-fosfato y los genes asociados con la síntesis de proteínas.

Otros estudios relacionados con los radicales libres y sus intermediarios, brindan una aproximación para monitorar el estrés por temperaturas bajas (Benson y Bremner, 2004). El estrés oxidativo puede producirse en plantas y algas crioconservadas (Fleck *et al.*, 1999, 2000, 2003), lo que indica que las especies reactivas del oxígeno y los radicales libres modulan la tolerancia de los componentes relacionados con protocolos de crioconservación de plantas (Benson, 2008).

Por su parte, las técnicas que se basan en el análisis molecular brindan una medida de la estabilidad genética (Harding, 2010), pues solamente una pequeña fracción del genoma se puede analizar por cualquiera de los métodos de análisis; particularmente, si estos estudios se emplean para dilucidar las conexiones entre procesos genéticos, epigenéticos y de estrés oxidativo que se producen como respuestas en el proceso de crioconservación de especies recalcitrantes.

Los marcadores moleculares son un potencial para detectar la diversidad genética y ayudan a mantener los recursos genéticos (Virk *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2003), revelan diferencias entre genotipos a nivel de ADN, brindan una herramienta más directa, segura y eficiente para la caracterización, conservación y mantenimiento de los bancos de germoplasma.

Un marcador de ADN, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que se utiliza para el análisis de la estabilidad genética de plantas procedente de material crioconservado, es los marcadores de microsatélites (Harding *et al.*, 2001; Urbanová *et al.*,

2006; Castillo *et al.*, 2010). Estos se valen de la abundante existencia en el genoma de Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSRs), que son regiones del genoma en las que una pequeña secuencia (de una a seis pares de bases) se repite un cierto número de veces, y que constituyen la base de los marcadores de SSR (Hardy *et al.*, 2003).

Cada locus de microsatélite puede tener alelos que difieren en el número de veces que repiten estas secuencias cortas, lo que determina que difieran en su tamaño y se traduce en bandas diferentes cuando la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas son amplificadas por el método de PCR y separados en un gel de poliacrilamida.

Los marcadores de microsatélites son codominantes, lo que permite diferenciar bandas de individuos homocigotos y heterocigotos. Además, tienen un alto nivel de polimorfismo (mayor que el de los RFLPs o los RAPDs) y son abundantes en los genomas de los organismos eucariotas. Por otro lado, estos marcadores presentan ventajas técnicas como una alta repetitividad, usan cantidades mínimas de ADN, las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicos y la variación en el largo de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas.

Como desventaja cabe señalar que el desarrollo de los cebadores requiere de tiempo, laboriosidad y altos costos, lo que sin embargo se compensa con el costo relativamente bajo, y la simplicidad y rapidez del uso de estos marcadores una vez que se dispone de los cebadores.

No obstante, para un análisis completo en la evaluación de los germoplasmas lo recomendable es emplear los marcadores morfo-agronómicos de conjunto con los moleculares, lo que permite complementar la información e incrementar el poder de resolución del análisis de la diversidad genética.

Los indicadores que se analizan en la tesis están relacionados con vías bioquímicas, fisiológicas y moleculares en la respuesta de los vegetales al estrés. Tales estudios brindan una imagen de los posibles efectos que ejerce la crioconservación en etapas tempranas de la germinación, el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol. Respecto a la crioconservación de semillas ortodoxas, y especialmente en plantas de frijol, hasta el momento no se tiene conocimiento de que datos similares hayan sido publicados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.0. Generalidades

Los experimentos que se describen en este capítulo se desarrollaron en el Laboratorio de Mejoramiento Genético y en áreas de adaptación de plantas del Centro de Bioplasmas de la Universidad “Máximo Gómez Báez” de Ciego de Ávila. Se usaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Milagro Villareño (Cfr. §.3.4, donde se usaron también otros genotipos), registrada en el listado oficial de variedades 2013 del Ministerio de la Agricultura de Cuba. La selección responde al potencial productivo alto y a que esta es una de las variedades recuperadas a través de un programa de mejoramiento participativo, que integró el Proyecto de Innovación Agropecuaria Local (PIAL) en el año 2008, con la participación de campesinos y productores de la provincia.

Las semillas tenían 12% de humedad (ISTA, 2005) y 97% de germinación. Se encontraban almacenadas en frascos de cristal (250 mL) herméticamente cerrados en un refrigerador comercial marca “Haier” con una temperatura de 4°C sin intercambio de aire y en un ambiente oscuro desde que fueron cosechadas y secadas (4 meses antes).

Las semillas del tratamiento control continuaron en las condiciones de almacenamiento antes descrito y las del tratamiento de crioconservación se colocaron en crioviales (5 mL de volumen, 12 semillas por criovial) y se sumergieron en NL durante dos semanas (Styles *et al.*, 1982). La recuperación de las semillas del NL se realizó con cuidado de no sacudir o derramar la semilla, con el empleo de guantes y pinzas. Se destaparon los crioviales y las semillas se colocaron sobre bandejas por espacio de 20 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente (25-27°C) (Stanwood y Bass, 1981). Así mismo, las semillas del tratamiento control se pusieron en bandejas hasta que alcanzaron la temperatura ambiente

antes del montaje de los experimentos. El número de semillas por tratamientos se describen en los experimentos de forma individual.

Para el tratamiento estadístico de los datos se empleó el *Statistical Package for Social Sciences* versión 12 (Pérez, 2005). En todos los casos se usaron diseños completamente aleatorizados y se tuvo en cuenta el principio de diferencia única. Las tablas y figuras en el acápite de Resultados y Discusión incluyen la información de las pruebas estadísticas que se realizaron en cada caso. Se efectuaron pruebas paramétricas (t-Student, ANOVA bifactorial, $p \leq 0,05$) después de chequear el ajuste de los datos a la distribución normal (Kolmogorov-Smirnov, $p \leq 0,05$) y la homogeneidad de varianzas (Levene, $p \leq 0,05$).

3.1. Determinación del efecto de la crioconservación en indicadores fisiológicos y bioquímicos en etapas tempranas de la germinación de semillas de frijol var. Milagro Villareño

3.1.1. Clasificación del Coeficiente de Variación General (CVG)

El experimento se realizó en el laboratorio a temperatura ambiente (25-27°C), con el objetivo de determinar el efecto de la crioconservación en indicadores fisiológicos y bioquímicos en etapas tempranas de la germinación y el crecimiento de plantas.

El experimento contó con dos tratamientos: semillas no crioconservadas (tratamiento control) y semillas crioconservadas (dos semanas en NL), tres repeticiones de 10 semillas por tratamientos, en un diseño completamente aleatorizado. Se establecieron tres momentos experimentales:

- 1) Inmediatamente después de la descongelación de las semillas. En este momento las determinaciones se realizaron a las semillas de ambos tratamientos después de haber alcanzado la temperatura ambiente.

2) 7 días después de la descongelación de las semillas. Las semillas se pusieron a germinar en placas de Petri (100 mm de diámetro) con 15 mL de agua destilada y en la oscuridad durante siete días (25-27°C). Los indicadores fisiológicos y bioquímicos se determinaron en raíces, cotiledones, tallos y hojas.

3) 14 días después de la descongelación. Las semillas se pusieron directamente a germinar en macetas (75 mm de diámetro) con 130g de zeolita con un fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad) bajo tubos de luz fluorescente con un FFF de $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (a temperatura de 25-27°C). Los indicadores fisiológicos y bioquímicos se determinaron en raíces, tallos y hojas de las plantas procedentes de ambos tratamientos.

Al terminar cada momento experimental se determinó la germinación de las semillas (%) (excepto para el momento 1), la masa fresca (g) y masa seca (g) de semillas, cotiledones, raíces, tallos y hojas, de forma independiente. Cada determinación bioquímica partió de tres muestras independientes, pesadas en una balanza analítica *Sartorius BL 1500* (0,1 g) e inmediatamente maceradas en NL. Las técnicas y procedimientos se describen a continuación:

Contenido de proteínas: La extracción se realizó con dos volúmenes de tampón Tris-HCl (0,01 mol·L⁻¹, pH 7,0) por gramo de muestra que se maceró previamente en NL. La cuantificación de proteínas solubles se siguió según el protocolo descrito por Bradford (1976). Se utilizó 0,1 mL del extracto, del que se prepararon diluciones seriadas y se hicieron reaccionar en cada caso con 1,0 mL de reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro UV-Vis (LKB-Pharmacia-Ultrospec III), se sustrajo la absorbancia no específica del reactivo de Bradford con el tampón sin extracto (blanco) y el contenido de proteínas se expresó en mg·g⁻¹ de masa seca, referidos a una curva patrón de Albúmina de Suero Bovino (SIGMA).

Contenido de malondialdehído y otros aldehídos: Se utilizó el procedimiento descrito por Heath y Packer (1968). El material vegetal se maceró previamente en NL, se mezcló con 1,4 mL de agua destilada y se agitó brevemente. Se adicionaron 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m:v; en ácido tricloroacético 20% (v:v)) y las muestras se incubaron en un baño termostatado a 100°C durante 25 minutos. Luego se colocaron en baño de hielo durante cinco minutos y se centrifugaron a 800×g durante 15 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 455, 532 y 600 nm en el espectrofotómetro UV visible. La absorbancia no específica del producto de la reacción (600 nm) se sustrajo de la absorbancia máxima a 532 nm para las mediciones de malondialdehído y de 455 nm para otros aldehídos.

Para calcular la concentración de malondialdehído se utilizó el coeficiente de extinción molar 155 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y para otros aldehídos 45,7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (promedio de los coeficientes de extinción del propanal, butanal, hexanal, y propanal-dimetilacetal) a 532 nm. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa seca.

Contenido de fenoles (ligados a la pared celular, soluble y total): El contenido de fenoles se determinó por el método de Gurr *et al.* (1992). Al material vegetal que previamente se maceró en NL se le adicionó 500 μL de metanol. El homogenato se agitó con vortex y se centrifugó a 17 400×g, durante 15 minutos. El precipitado se sometió a dos ciclos adicionales de extracción con metanol, con 250 μL cada uno hasta completar 1,0 mL de extracto. El sobrenadante se colectó siempre y se consideró como la fracción de fenoles solubles.

El precipitado se incubó con 250 μL de hidróxido de sodio 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 16 horas a 70°C. Se adicionaron 250 μL de ácido clorhídrico (2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) después de la incubación. Las muestras se centrifugaron a 17 400×g, durante 15 minutos. El precipitado se descartó y el

sobrenadante se colectó y se consideró la fracción enriquecida en fenoles ligados a las paredes celulares.

Para cuantificar los niveles de fenoles solubles y ligados a las paredes celulares, 20 μL de cada uno de los sobrenadantes se mezclaron con 980 μL de agua destilada. Se adicionaron 100 μL de reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu y las muestras se incubaron a temperatura ambiente (26°C) durante cinco minutos. Se adicionó 600 μL de bicarbonato de sodio (saturado con hidróxido de sodio $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). A los 60 minutos, se determinó la absorbancia a 725 nm en espectrofotómetro UV visible. La concentración de fenoles se expresó en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa seca, referidos a una curva patrón de ácido clorogénico ($\epsilon=0,00441 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}\cdot\text{cm}^{-1}$) (SIGMA).

Contenido de clorofilas (Porra, 2002): Se adicionaron 0,5 mL de acetona 80% (v:v), las muestras se centrifugaron a $17\ 400\times\text{g}$ a 4°C durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 647 nm y 664 nm. Las concentraciones de clorofilas se calcularon según las fórmulas:

$$\text{Cl } a=12.25\text{Abs}_{664 \text{ nm}} - 2.55\text{Abs}_{647 \text{ nm}} \qquad \text{Cl } b= 22.31\text{Abs}_{647 \text{ nm}} - 4.91\text{Abs}_{664 \text{ nm}}$$

$$\text{Cl } a+b=17.76\text{Abs}_{647 \text{ nm}} + 7.34\text{Abs}_{664 \text{ nm}}$$

Los resultados se expresan en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca.

Se realizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada indicador evaluado y para determinar los indicadores más variables producto de la crioconservación de las semillas, se calculó el coeficiente de variabilidad (CVG) según la fórmula: (Desviación estándar/media)*100 (Gómez-Pando *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2012). La desviación estándar se consideró a partir de los valores promedios de los dos tratamientos (semillas crioconservadas y no crioconservadas), por lo que se tomó la diferencia estandarizada entre los caracteres y se dividió entre la media de los tratamientos. El

resultado de este indicador representa la variabilidad entre tratamientos estandarizada a partir de la media del experimento.

El CVG, se agrupó en tres clases: para los valores menores a 36%, los efectos de la crioconservación se consideraron “bajos”, los valores entre 36 – 72% como “medios” y los valores mayores de 72% como “elevados”. Las clases se formaron restando el valor máximo (VM) al valor mínimo (vm) dividido por tres $((VM-vm).3^{-1})$.

3.1.2. Análisis del efecto de la crioconservación en indicadores fisiológicos y bioquímicos después de la descongelación de semillas de frijol var. Milagro Villareño

Con el objetivo de analizar el efecto de la crioconservación en indicadores fisiológicos y bioquímicos después de la descongelación de las semillas se tuvo en cuenta el valor del CVG y se realizó un análisis detallado en aquellos indicadores cuyos valores corresponden a las clases de “medios” y “elevados” para analizar las respuestas de las semillas en el proceso de germinación.

3.2. Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol var. Milagro Villareño en el crecimiento y desarrollo de dos generaciones de plantas cultivadas en canteros

Con la finalidad de determinar el efecto de la crioconservación de semillas de frijol en el crecimiento y desarrollo de plantas en canteros, se escogieron semillas de frijol de la variedad Milagro Villareño (30/tratamiento), procedentes de las condiciones de almacenamiento descrito en el §3.0 (semillas del tratamiento control y semillas crioconservadas), y se sembraron en canteros del área experimental del Centro de Bioplantas de la Universidad “Máximo Gómez Báez” de Ciego de Ávila en un diseño de bloque al azar con tres repeticiones.

Los canteros tenían 1 m de ancho x 20 m de largo x 0,5 m de alto (fig. 1), compuestos por suelo Ferralítico rojo compactado eútrico sobre caliza dura (Hernández *et al.*, 1999), cachaza (1:1, v:v) y 0,1 m de gravilla de fondo para facilitar el drenaje. La distancia de siembra fue de 0,70 m x 0,10 m y se empleó un sistema de riego *microjet* que realiza un suplemento de agua a las plantas de cinco minutos cada ocho horas.

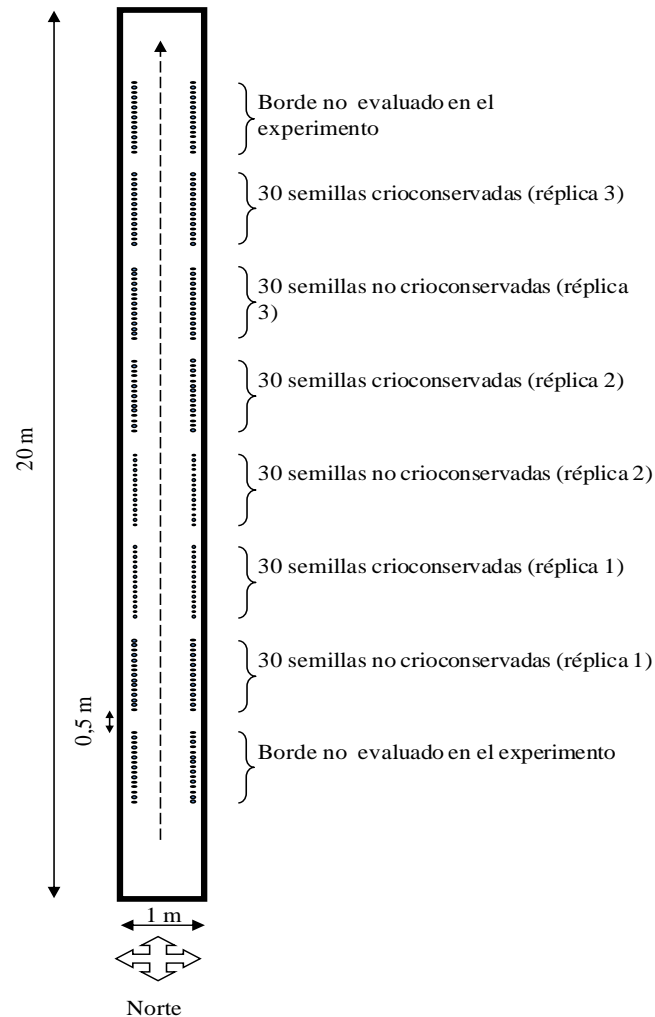


Fig. 1. Esquema de siembra de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Milagro Villareño en los canteros. (1 m de ancho x 20 m de largo x 0,5 m de alto) compuesto de suelo Ferralítico rojo compactado eútrico con suplemento de materia orgánica (1:1, v:v) y 0,1 m de gravilla para facilitar el drenaje. Los puntos simbolizan la disposición de los tratamientos (0,70 m x 0,10 m) y la línea discontinua en el centro el sistema de riego *microjet*, el cual realiza un riego a las plantas de cinco minutos cada ocho horas. Las plantas fueron cultivadas a pleno sol con un FFF de $458 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Las semillas se sembraron el 7 de diciembre de 2011 y 14 días después se determinó el porcentaje de emergencia de las plantas. El experimento se repitió en igual época de siembra en la campaña del año siguiente (12 de diciembre de 2012), con semillas procedentes de las plantas de ambos tratamientos. Los datos que se presentan son los más representativos de ambas campañas.

3.2.1. Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol en indicadores bioquímicos en raíces y tallos de plantas cultivadas en canteros

Considerando el principio de diferencia única, 32 días después de la emergencia, cuando las plantas estaban en fase R5 o prefloración (CIAT, 1981), se tomaron al azar muestras de raíces y tallos de las plantas procedentes de ambos tratamientos (siempre teniendo en cuenta el efecto de borde, el número aparece en el pie de las figuras en Resultado y Discusión) y se determinaron los indicadores bioquímicos con mayor variabilidad del experimento anterior: contenido de fenoles (ligados a la pared, solubles y total) en raíces, contenido de malondialdehído y otros aldehídos y contenido de proteínas en tallos. El procedimiento de las técnicas de análisis son las que se describieron en el §3.1. Este experimento se realizó con el objetivo de determinar si esos indicadores se mantenían con variabilidad en etapas posteriores a la germinación (crecimiento y desarrollo de las plantas). Se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada indicador evaluado.

3.2.2. Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol en indicadores morfo-agronómicos de plantas cultivadas en canteros

Para determinar el efecto de la crioconservación de las semillas de frijol en los caracteres morfo-agronómicos, se tomaron al azar tres repeticiones de diez plantas en cada tratamiento (siempre teniendo en cuenta el efecto de borde) y se evaluaron de acuerdo con las

instrucciones del descriptor de variedades de frijol común elaborado por el Centro de Investigaciones de Agricultura Tropical (CIAT) (Muñoz *et al.*, 1993): Altura de las plantas (cm), en el momento de la cosecha, con una regla graduada tomando como referencia la distancia entre el nudo cotiledonal y la última hoja trifoliada; Número de nudos por plantas a partir del nudo cotiledonal. El número de vainas por plantas se calculó por conteo directo en el tallo principal.

Para determinar el número de granos por vainas se tomaron todas las vainas de las diez plantas y se contó la cantidad de granos en cada una. La masa de 100 semillas (g) se determinó con el empleo de una balanza analítica *Sartorius BL 1500*. Cada determinación se repitió tres veces y se realizó la prueba t-Student para la comparación de las medias.

3.2.3. Caracterización molecular de las plantas con el empleo de microsatélites (SSR)

La estabilidad genética de las plantas se evaluó en la segunda generación de las plantas procedentes de semillas no crioconservadas y crioconservadas. Se seleccionaron cinco semillas (10/tratamientos) al azar de cada tratamiento y se pusieron a germinar en condiciones *in vitro* para la extracción y análisis del ADN. La extracción del ADN se llevó a cabo con el empleo del kit Qiagen Plant DNeasy Kit, acorde las instrucciones de sus productores (Qiagen, Valencia, CA, USA). El análisis de secuencia simple repetida (SSR) se realizó según Yu *et al.* (2000).

Se usaron seis combinaciones de cebadores (Feroni *et al.*, 2005), todos génicos y registrados en la base internacional de datos del banco genético que identifica la secuencia de SSR presentes en la secuencia de ADN del frijol (Yu *et al.*, 1999) los que corresponden al modelo de sustitución IAM (*Infinite-Allele Model*; Slatkin, 1995). Por último, se tuvo en cuenta la calidad, la cobertura del genoma y el contenido de información locus específico (tabla 1).

Tabla 1. Relación de los marcadores moleculares (SSR, microsatélites) que se usaron para el análisis de la estabilidad genética de la segunda generación de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Milagro Villareño.

Cebador	Grupo de ligamiento	Tipo de marcador	Tamaño esperado (pares de base)	Núcleo o Secuencia del motivo repetido	Secuencia del cebador sentido (dirección 5'→3')
PH9B2	B2	Génico	147	(CCT) ₇	CCAACCACATTCTTCCTACGTC
PH2B2	B2	Génico	74	(GCCACC) ₅	CGTTAGATCCCGCCCAATACT
PH3B4	B4	Génico	163	(GAAT) ₅	AAGGATGGGTTCCTGCTTG
PH5B5	B5	Génico	161, 171	(AT) ₅	CCGTTGCCTGTATTTCCCCAT
PH6B9	B9	Génico	192	(AT) ₁₂	AGTTAAATTATACGAGGTTAGCCTAAATC
PH10B11	B11	Génico	157	(CT) ₁₁	CAATCCTCTCTCTCATTTC AATC

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un volumen de 20 μL que contenía 1 \times de tampón de reacción, 2,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, 25 pM del cebador sentido marcado con FAM, 15 pM del cebador antisentido, 1 unidad de Taq polimerasa, y 30 ng de ADN genómico (Thibivilliers *et al.*, 2009). Los parámetros de la PCR se ajustaron según Sicard *et al.* (2005).

Los productos de la reacción se separaron en un ABI PRISM[®] 3130 DNA Analyzer, y la calibración por tamaño se llevó a cabo con el marcador de peso molecular GenScan[™] 500 ROX[™] Size Standard. Una vez obtenidos los datos, se determinaron los tamaños de los alelos con el empleo del software PeakScannerv. 1.2 (Applied Biosystems, Foster City, California).

3.3. Determinación del efecto de la crioconservación y el tiempo de almacenamiento en la viabilidad de las semillas de frijol var. Milagro Villareño

En el experimento se analizaron dos factores: 1) forma de almacenamiento de las semillas: semillas almacenadas a 4°C (control) y semillas crioconservadas y 2) tiempo de almacenamiento: 0, 6, 12, 18 y 24 meses. Las condiciones experimentales de selección, almacenamiento y recuperación de las semillas son las descritas en el § 3.0. Las semillas se pusieron a germinar en placas de Petri (100 mm de diámetro) con 15 mL de agua destilada y en la oscuridad por espacio de siete días. Se realizaron tres repeticiones de 15 semillas/tratamiento, lo que determinó el porcentaje de germinación de las semillas. Se realizó un análisis de varianza ANOVA bi-factorial para la comparación de medias. La variable germinación fue previamente transformada según la fórmula $y' = 2\arccos((y/100)^{0.5})$.

3.4. Determinación del efecto de la crioconservación en la germinación de diferentes genotipos de frijol

El efecto de la crioconservación se determinó en el porcentaje de germinación de diferentes genotipos de frijol. Se dispusieron de semillas procedentes de 15 variedades comerciales y pre-comerciales (tabla 2) con marcadas diferencias fenotípicas, procedentes de los bancos de germoplasma o colecciones de trabajo de dos instituciones cubanas que han realizado colectas del cultivo de frijol común con el objetivo de conservar las variedades tradicionales y promover su utilización, el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical y el Instituto Nacional de Ciencias Agropecuarias, con fecha de cosecha enero de 2013 y contenido de humedad de 12-15% (ISTA, 2005). Las condiciones experimentales fueron descritas en el capítulo de generalidades.

El tiempo de conservación de todas las semillas en crioconservación fue de dos semanas (Styles *et al.*, 1982). La germinación (%) se determinó después de siete días de descongeladas las semillas en placas de Petri (10/tratamientos) con tres repeticiones por tratamientos. Se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias.

3.5. Análisis del efecto económico de la crioconservación de semillas de frijol

Para determinar el efecto económico se tuvieron en cuenta los costos relevantes (Polimeni, 2002) o costos que difieren entre varias alternativas posibles, fueron valorados solo aquellos gastos que tienen comportamientos diferentes en dos variantes de conservación (la conservación tradicional en cámaras frigoríficas y la crioconservación). Para calcular el costo se tuvo en cuenta la clasificación de los gastos por su forma de inclusión (directos e indirectos) y se consideraron solo los elementos directos, pues los indirectos de la producción se consideran irrelevantes. Por no ser el costo una categoría abstracta, debe ser ajustada a un tiempo, y en la presente investigación se calculó para un año.

Tabla 2. Relación de genotipos que se usaron en el experimento.

Nombre	Color de la semilla	Hábito de crecimiento	Procedencia	Fecha de cosecha
Milagro Villareño	Negro	Tipo IIb	INCA	Enero 2013
Triunfo 70	Negro	Tipo IIb	INCA	Enero 2013
ICA Pijao	Negro	Tipo II	INCA	Enero 2013
San Francisco 219	Rojo	Tipo IIb	INIFAT	Enero 2013
Hatuey 24	Negro	Tipo II	INCA	Enero 2013
P2240	Negro b	Tipo II	INCA	Enero 2013
Chévere	Crema	Tipo II	INIFAT	Enero 2013
Bat 304	Negro	Tipo II	INCA	Enero 2013
P186	Rojo	Tipo IIb	INCA	Enero 2013
Velazco Largo	Rojo largo	Tipo I	INIFAT	Enero 2013
Rosa	Rojo mediano	Tipo I	INIFAT	Enero 2013
Lewa	Blanco	Tipo II	INIFAT	Enero 2013
Bonita 11	Blanco	Tipo II	INCA	Enero 2013
Bat 832	Negro	Tipo II	INCA	Enero 2013
Bolita 42	Negro	Tipo II	INCA	Enero 2013

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación del efecto de la crioconservación en indicadores fisiológicos y bioquímicos después de la descongelación de semillas de frijol var. Milagro Villareño

4.1.1. Clasificación del Coeficiente de Variación General (CVG)

Después de la descongelación, no se observaron cambios visibles en las semillas de frijol. Sin embargo, a nivel bioquímico sí ocurrieron variaciones significativas en los indicadores relacionados con el proceso de germinación de las semillas y el posterior desarrollo de las plantas. A través del cálculo del coeficiente de variación general se pudo comprobar cómo se manifestó la variabilidad de la crioconservación en semillas, cotiledones, raíces, tallos y hojas en los tres momentos experimentales, y cuáles fueron los que más se expresaron durante el proceso de germinación y desarrollo de las plantas, la tabla 3 muestra aquellos indicadores donde el efecto de la crioconservación se consideró elevado.

Tabla 3. Valores del Coeficiente de Variación General de los indicadores fisiológicos y bioquímicos evaluados en etapas tempranas de la germinación de semillas de frijol crioconservadas clasificados como “elevados”.

Órgano	Tiempo (días)	Indicador	CVG (%)
Tallos	14	Contenido de proteínas ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	106
Tallos	7	Contenido de otros aldehídos ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	89
Raíces	7	Contenido de fenoles ligados a la pared ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	81
Raíces	7	Contenido de fenoles totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	80
Raíces	7	Contenido de fenoles solubles ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	79

Coeficiente de variación general (CVG)= (Desviación estándar /Media)*100. Para calcular este coeficiente se empleó los valores medios de los tratamientos (semillas crioconservadas y control).

En ocho de los indicadores que se determinaron, el efecto de la crioconservación fue medio (tabla 4), según la clasificación del coeficiente de variación general. A excepción de los

cotiledones, el efecto medio de la crioconservación se manifestó en todos los otros órganos y en los tres momentos experimentales.

Tabla 4. Valores del Coeficiente de Variación General de los indicadores fisiológicos y bioquímicos evaluados en etapas tempranas de la germinación de semillas de frijol crioconservadas clasificados como “medios”.

Órgano	Tiempo (días)	Indicador	CVG (%)
Raíces	7	Contenido de proteínas (mg·g ⁻¹ masa seca)	72
Raíces	14	Contenido de proteínas (mg·g ⁻¹ masa seca)	67
Raíces	14	Contenido de otros aldehídos (μmol·g ⁻¹ masa seca)	65
Hojas	7	Contenido de clorofila <i>b</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	55
Tallos	14	Contenido de otros aldehídos (μmol·g ⁻¹ masa seca)	49
Semillas	0	Contenido de clorofila <i>b</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	47
Semillas	0	Contenido de clorofila <i>a+b</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	43
Semillas	0	Contenido de clorofila <i>a</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	36

Coeficiente de variación general (CVG)= (Desviación estándar /Media)*100. Para calcular este coeficiente se empleó los valores medios de los tratamientos (semillas crioconservadas y control).

Después de realizar el cálculo del coeficiente de variación general, en el resto de los indicadores que se evaluaron en el experimento, el efecto se consideró bajo (tabla 5).

Tabla 5. Valores del Coeficiente de Variación General de los indicadores fisiológicos y bioquímicos evaluados en etapas tempranas de la germinación de semillas de frijol crioconservadas clasificados como “bajos”.

Órgano	Tiempo (días)	Indicador	CVG (%)
Hojas	7	Contenido de clorofilas <i>a+b</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	30
Raíces	14	Contenido de fenoles ligados a la pared (mg·g ⁻¹ masa seca)	28
Cotiledones	7	Contenido de otros aldehídos (μmol·g ⁻¹ masa seca)	27
Raíces	14	Contenido de fenoles totales (mg·g ⁻¹ masa seca)	27
Raíces	14	Masa fresca (g)	26
Raíces	14	Contenido de fenoles solubles (mg·g ⁻¹ masa seca)	25
Semillas	0	Contenido de fenoles solubles (mg·g ⁻¹ masa seca)	25
Tallos	7	Contenido de fenoles solubles (mg·g ⁻¹ masa seca)	22
Cotiledones	7	Contenido de fenoles ligados a la pared (mg·g ⁻¹ masa seca)	22
Cotiledones	7	Contenido de fenoles totales (mg·g ⁻¹ masa seca)	21

Coeficiente de variación general (CVG)= (Desviación estándar /Media)*100. Para calcular este coeficiente se empleó los valores medios de los tratamientos (semillas crioconservadas y control).

Tabla 5. Valores del Coeficiente de Variación General de los indicadores fisiológicos y bioquímicos evaluados en etapas tempranas de la germinación de semillas de frijol crioconservadas clasificados como “bajos” (Continuación).

Órgano	Tiempo (días)	Indicador	CVG (%)
Raíces	7	Contenido de otros aldehídos ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	20
Hojas	14	Contenido de fenoles solubles ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	20
Hojas	7	Contenido de fenoles ligados a la pared ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	18
Hojas	14	Masa fresca (g)	17
Tallos	7	Contenido de proteínas ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	16
Cotiledones	7	Contenido de fenoles solubles ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	16
Tallos	14	Contenido de malondialdehído ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	15
Hojas	7	Contenido de fenoles totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	12
Hojas	14	Contenido de fenoles totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	12
Raíces	7	Masa fresca (g)	11
Tallos	7	Contenido de fenoles ligados a la pared ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	10
Tallos	14	Contenido de clorofilas $a+b$ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	9
Raíces	7	Contenido de malondialdehído ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	9
Hojas	14	Contenido de fenoles ligados a la pared ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	9
Hojas	7	Contenido de proteínas ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	9
Tallos	7	Contenido de fenoles totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	8
Tallos	14	Contenido de clorofilas a ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	7
Semillas	0	Contenido de otros aldehídos ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	7
Hojas	7	Contenido de fenoles solubles ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	7
Semillas	0	Contenido de proteínas ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	6
Hojas	7	Contenido de otros aldehídos ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	6
Tallos	7	Masa fresca (g)	6
Hojas	14	Contenido de otros aldehídos ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	6
Tallos	7	Contenido de clorofilas b ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	6
Hojas	7	Contenido de clorofilas a ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	6
Hojas	7	Masa fresca (g)	6
Hojas	7	Contenido de malondialdehído ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	5
Semillas	0	Contenido de malondialdehído ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	5
Tallos	14	Masa fresca (g)	5
Raíces	7	Contenido de clorofila b ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	5
Hojas	14	Contenido de malondialdehído ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	5
Raíces	14	Contenido de clorofila b ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	5
Tallos	7	Contenido de clorofila $a+b$ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa seca)	4

Coeficiente de variación general (CVG)= (Desviación estándar /Media)*100. Para calcular este coeficiente se empleó los valores medios de los tratamientos (semillas crioconservadas y control).

Tabla 5. Valores del Coeficiente de Variación General de los indicadores fisiológicos y bioquímicos evaluados en etapas tempranas de la germinación de semillas de frijol crioconservadas clasificados como “bajos” (Continuación).

Órgano	Tiempo (días)	Indicador	CVG (%)
Tallos	14	Contenido de fenoles totales (mg·g ⁻¹ masa seca)	4
Tallos	14	Contenido de fenoles ligados a la pared (mg·g ⁻¹ masa seca)	3
Tallos	7	Contenido de clorofila <i>a</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	3
Semillas	0	Contenido de fenoles ligados a la pared (mg·g ⁻¹ masa seca)	3
Cotiledones	7	Contenido de clorofila <i>a</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	2
Cotiledones	7	Contenido de proteínas (mg·g ⁻¹ masa seca)	2
Cotiledones	7	Contenido de malondialdehído (μmol·g ⁻¹ masa seca)	2
Cotiledones	7	Contenido de clorofila <i>a+b</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	1
	7	Germinación	1
Raíces	14	Contenido de clorofila <i>a</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	1
Raíces	14	Contenido de contenido de clorofila <i>a+b</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	1
Raíces	7	Contenido de clorofila <i>a</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	1
Hojas	14	Contenido de clorofila <i>a</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	1
Hojas	14	Contenido de clorofila <i>a+b</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	0,3
Raíces	14	Contenido de malondialdehído (μmol·g ⁻¹ masa seca)	0,3
Cotiledones	7	Contenido de clorofila <i>b</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	0,2
Hojas	14	Contenido de clorofila <i>a+b</i> (μg·g ⁻¹ masa seca)	0,1
Semillas	0	Masa fresca (g)	0

Coeficiente de variación general (CVG)= (Desviación estándar /Media)*100. Para calcular este coeficiente se empleó los valores medios de los tratamientos (semillas crioconservadas y control).

Conforme a la clasificación del coeficiente de variación general, la mayor variabilidad del efecto de la crioconservación de las semillas se observó en el contenido de proteínas del tallo de las plantas, 14 días después de la descongelación de las semillas, con valores que disminuyeron de 3,32 a 0,47 mg·g⁻¹ de masa seca (t-test, p≤0,05; CVG=106%), en el incremento significativo del contenido de otros aldehídos en los tallos de las plantas procedentes de semillas crioconservadas, 7 días posteriores a la descongelación, con valores que incrementaron de 93,66 a 419,90 μmol·g⁻¹ de masa seca (t-test, p≤0,05; CVG=89%) y en la reducción significativa del contenido de fenoles.

Los fenoles ligados disminuyeron de 7,07 a 1,93 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa seca, los solubles de 7,41 a 2,10 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa seca, y el contenido de fenoles total de 14,48 a 4,04 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa seca (t- test, $p\leq 0,05$).

4.1.2. Análisis del efecto de la crioconservación en indicadores fisiológicos y bioquímicos después de la descongelación de semillas de frijol var. Milagro Villareño

Después de la descongelación de las semillas, el 98% de las crioconservadas se convirtieron en plantas (t-test, $p\leq 0,05$), sin diferencias estadísticas con respecto a las semillas del tratamiento control (97%), la determinación del contenido de proteínas de estas semillas no difirió estadísticamente con las semillas crioconservadas inmediatamente después de la crioconservación (t-test, $p\leq 0,05$), y tampoco se presentaron diferencias significativas en los cotiledones de ambos tratamientos, 7 días después de la descongelación.

Sin embargo, sí se observó una disminución en raíces (fig. 2) y un aumento significativo en tallos (fig. 3) de las plantas procedentes de semillas crioconservadas en ese momento experimental.

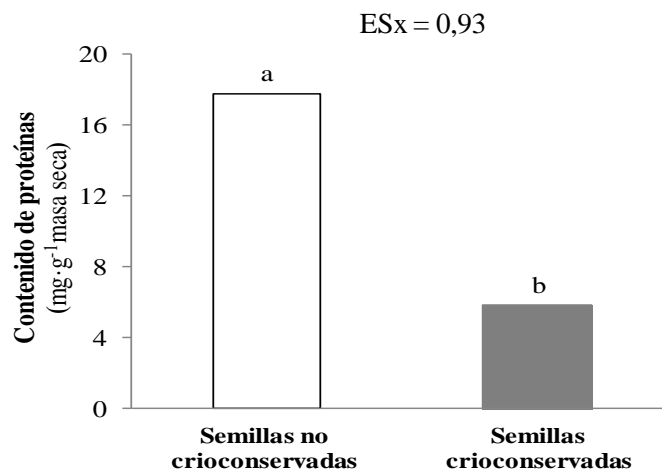


Fig. 2. Contenido de proteínas en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p\leq 0,05$, $n=6$). ESx=error estándar de la media.

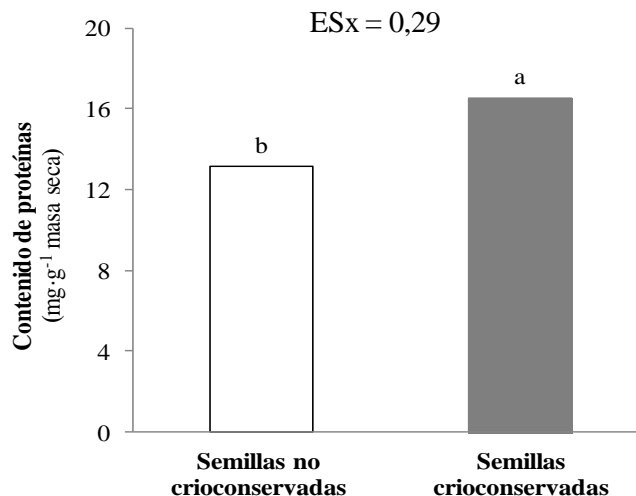


Fig. 3. Contenido de proteínas en tallos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

Durante determinados estados de desarrollo los vegetales sintetizan diferentes sustancias. De esta manera, en el proceso de maduración, las semillas ortodoxas acumulan cantidades masivas de proteínas que se consideran protectoras frente a varios tipos de estrés.

Las proteínas, son unos de los metabolitos primordiales para la absorción del agua en las semillas (Bazin *et al.*, 2011). En las de leguminosas, las proteínas de reservas forman más del 20% de su contenido. Del mismo modo, en cultivos como el girasol representan cerca del 25% de la masa seca. En ambos casos actúan en la disminución de la dormancia y en la respuesta a condiciones ambientales.

Diferentes estudios bioquímicos y genéticos suponen la inclusión de la fosforilación reversible de proteínas en la regulación de la respuesta de las plantas al estrés, frente a varios estímulos ambientales (Rock *et al.*, 2010). En condiciones naturales, muchas plantas adquieren tolerancia a la congelación a continuación de su exposición a temperaturas por debajo de 10°C. Este es un proceso llamado aclimatación (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008).

Numerosos cambios fisiológicos y moleculares ocurren durante tal proceso, principalmente la protección de las células al daño irreversible producto a fuerzas mecánicas generadas por los cristales de hielo, la deshidratación celular y el incremento de la concentración de solutos intracelulares (Rock *et al.*, 2010). Estudios recientes sobre los mecanismos moleculares de respuesta al estrés por bajas temperaturas, se realizaron en *Arabidopsis*, porque tienen una capacidad limitada para la aclimatación al frío.

Contrario a lo que ocurrió a los 7 días, en las plantas procedentes de semillas crioconservadas, 14 días después de la descongelación, se determinó un contenido mayor de proteínas en raíces (fig. 4), una disminución significativa en tallos (fig. 5) y un aumento en el contenido de proteínas en las hojas de las plantas procedentes de semillas crioconservadas (fig. 6).

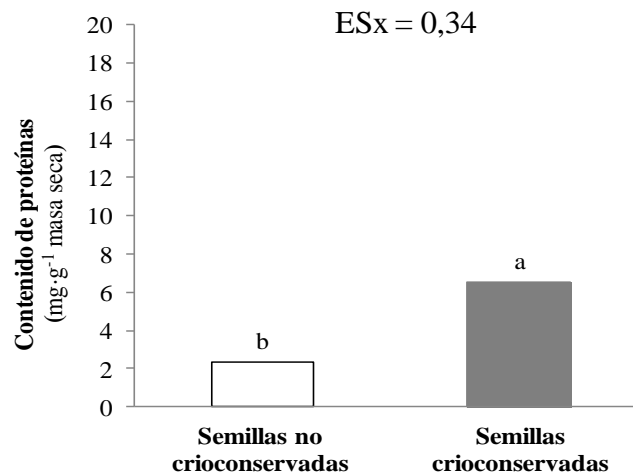


Fig. 4. Contenido de proteínas en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 14 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

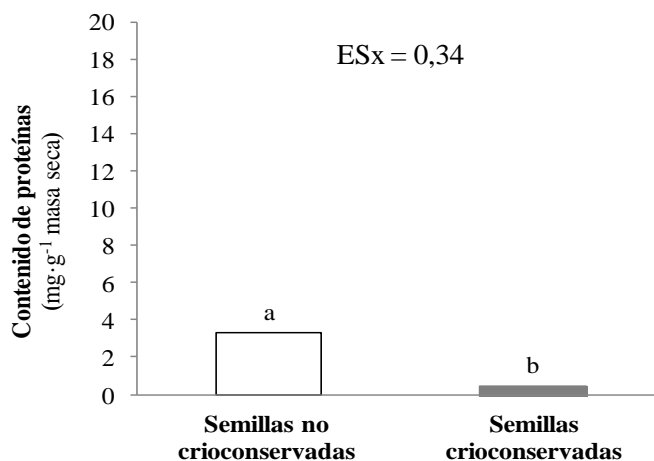


Fig. 5. Contenido de proteínas en tallos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 14 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

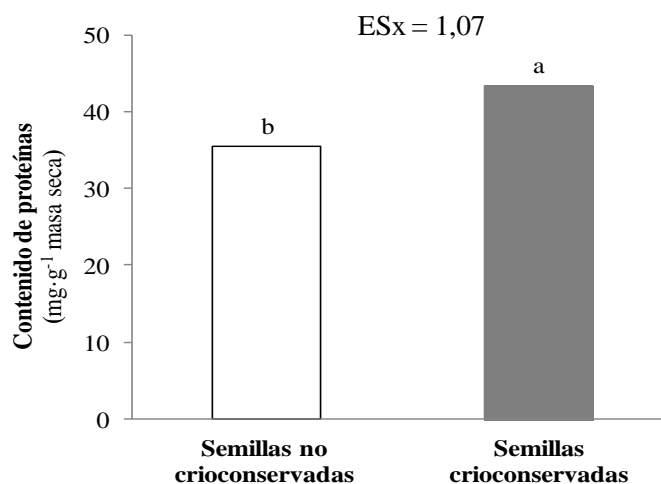


Fig. 6. Contenido de proteínas en hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 14 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx=error estándar de la media.

Bajo la recepción y transmisión de señales del estrés se altera un número de genes, principalmente los relacionados con la adaptación de las plantas al estrés. Existen muchos genes inducidos por estrés abiótico (Seki *et al.*, 2002, 2007). La mayoría de esos genes están clasificados en dos grupos: uno que funciona en la protección de la célula frente al

estrés, tales como las proteínas *LEA* (que también se encuentran vinculados a la tolerancia a la desecación en semillas y son degradados inmediatamente durante la imbibición); y otro grupo que funciona en la transducción de vías de señales, tales como enzimas generadas por mensajeros secundarios, fosforilación, remodelamiento de la cromatina y factores de transcripción.

Todos los componentes necesarios para la reanudación de la síntesis de proteínas después de la imbibición están presentes en el interior de los embriones de las semillas, aunque los polisomas estén ausentes (Bewley, 1997). En cuanto ocurre la rehidratación de las semillas, para lograr la germinación, se produce una disminución del número de ribosomas simples que actúan como reparadores en un complejo polisomal de síntesis proteica.

La síntesis inicial de las proteínas depende entonces de los ribosomas existentes, pero los nuevos ribosomas son producidos y usados poco tiempo después que comienza el ensamble de los polisomas. Los ARNm formados con anterioridad están también presentes en el embrión de las semillas secas (Bewley, 1997). Algunos de ellos son residuos asociados al proceso de desarrollo previo de la semilla y pueden ser usados durante los primeros estados de la germinación.

Tanto el estrés biótico como el abiótico (bajas temperaturas) pueden promover la síntesis de algunas proteínas e inhibir otras; sin embargo, autores como Ericson y Alfinito (1984), Palma (2002) y Forni *et al.* (2010) plantean que existe una tendencia general a la disminución de las mismas. En el experimento que se analiza, el efecto de la crioconservación de las semillas tuvo respuestas variables en el contenido de proteínas de los diferentes órganos y momentos experimentales, lo que está en correspondencia con lo que plantean Forni *et al.* (2010). Estas moléculas pueden sintetizarse o inhibirse como respuesta a señales externas que se dan a nivel de ARNm.

Existe información sobre cambios en niveles de algunas proteínas específicas producto del estrés por bajas temperaturas. Forni *et al.* (2010), detectan variaciones significativas en la expresión de proteínas e identifican seis proteínas relacionadas con la respuesta al estrés o involucradas en el ciclo celular durante la crioconservación de brotes de manzana procedentes del cultivo de tejidos. Estos autores relacionan el contenido de proteínas con la criotolerancia a través de cambios que se producen en el metabolismo y en la expresión de proteínas durante este proceso.

Martínez-Montero *et al.* (2002) encontraron altos niveles en el contenido de proteínas en la fracción microsomal de callos de caña de azúcar crioconservados durante los tres primeros días después de la descongelación, y lo relacionan con la inducción de diferentes genes que se expresan durante la exposición a las bajas temperaturas y la deshidratación de diferentes especies de plantas. La inducción de estos genes participa en numerosos procesos de protección de la membrana celular contra el estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Shinozaki *et al.*, 2003), a través de la producción de proteínas importantes. También Svensson *et al.* (2002) encuentran proteínas que responden a las bajas temperaturas, las cuales están dentro del grupo de las dehidrininas asociadas al sistema de endomembranas del citoplasma.

Sin embargo, Hamid *et al.* (2010) observan una disminución en el contenido de proteínas en *Phaseolus vulgaris* L. producto del estrés por metales pesados. Costa y Spitz (1997) y Mohan y Hosetti (1997), por su parte informan sobre la disminución en el contenido de proteínas en otros cultivos producto del estrés abiótico.

Una gran variedad de condiciones adversas incrementa la proteólisis intracelular (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008). Este efecto está dado, en parte, por el incremento de la actividad de un grupo particular de enzimas proteasas, que se sintetizan en el citoplasma como

preproteínas que contienen un péptido de tránsito y les permite permanecer en diferentes compartimentos celulares: vacuolas, cloroplastos o mitocondrias. Todo ello, coincide con Palma *et al.* (2002), quienes plantearon que la disminución en el contenido de proteínas puede ser el resultado de un incremento de la actividad de proteasas que se incrementa en condiciones de estrés. Las proteasas participan en la activación de proteínas relacionadas con la adaptación al estrés, así como la degradación de proteínas desnaturalizadas, ellas proporcionan aminoácidos libres para la síntesis de nuevas proteínas durante el proceso de crecimiento y desarrollo de las plantas.

Las señales que inducen los eventos diferentes, asociados a condiciones de estrés biótico o abiótico, condicionan el proceso de crecimiento y desarrollo futuro de los vegetales. La temperatura, por ejemplo, determina la velocidad de las reacciones químicas catalizadas enzimáticamente, modifica la estructura y la actividad de las macromoléculas, y determina el estado físico del agua. En las plantas que crecen en condiciones ambientales, el estrés, tanto por calor como por frío, provoca la pérdida de semi-permeabilidad, pues modifica la micro-viscosidad o fluidez de las membranas.

No se observaron diferencias estadísticas en el contenido de malondialdehído y otros aldehídos en las semillas (t-test, $p \leq 0,05$), pero se presentó un aumento significativo en el contenido de otros aldehídos en los cotiledones (fig. 7), las raíces (fig. 8) y tallos (fig. 9) de las plantas procedentes de semillas crioconservadas 7 días después de la descongelación. También se determinó un incremento en el contenido de otros aldehídos en las raíces (fig. 10) de las plantas procedentes de semillas crioconservadas 14 días después de la descongelación. A diferencia de estos resultados, en tallos (fig. 11), 14 días después de la descongelación, se observó un aumento en el contenido de otros aldehídos acompañado de un aumento en el contenido de malondialdehído.

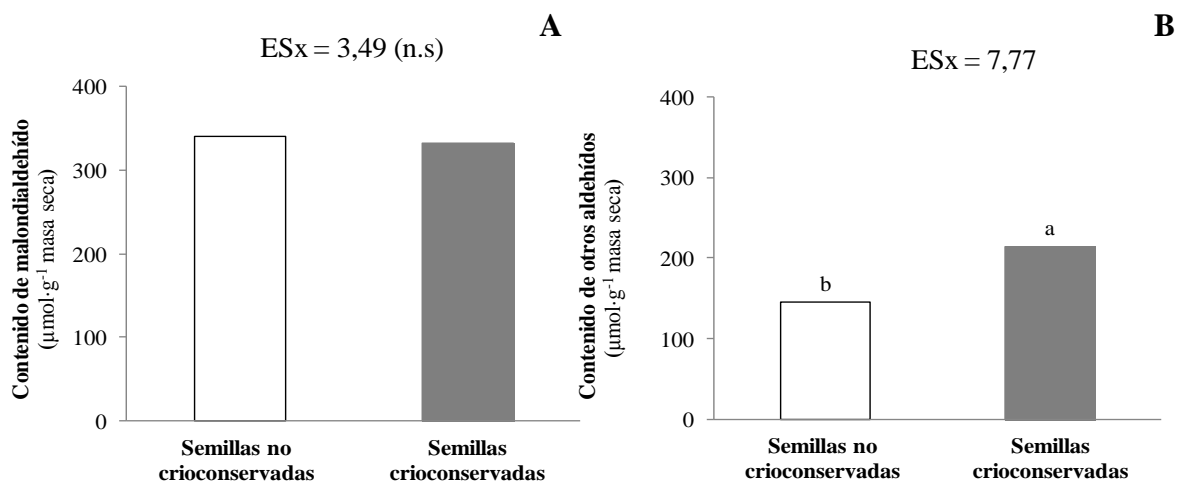


Fig. 7. A: Contenido de malondialdehído y **B:** Contenido de otros aldehídos en cotiledones de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

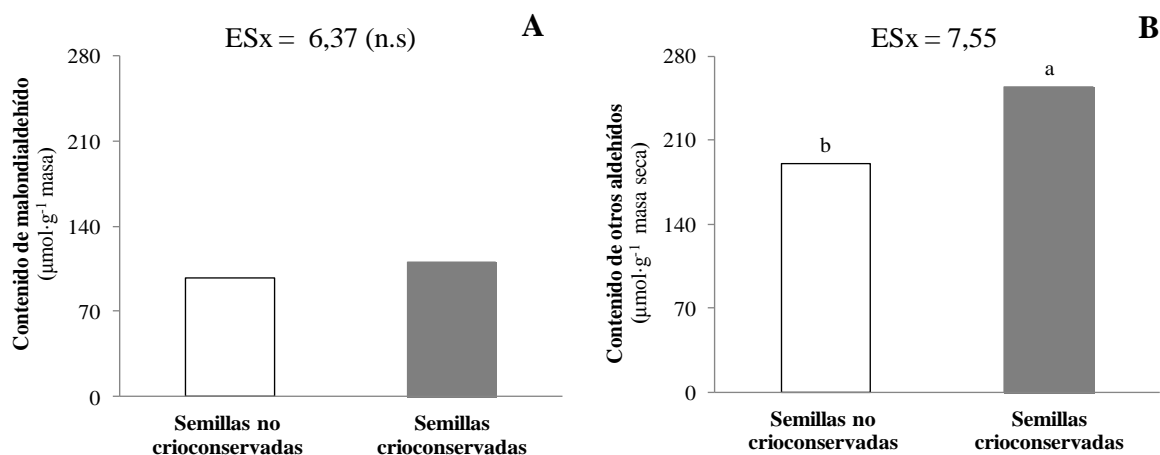


Fig. 8. A: Contenido de malondialdehído y **B:** Contenido de otros aldehídos en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

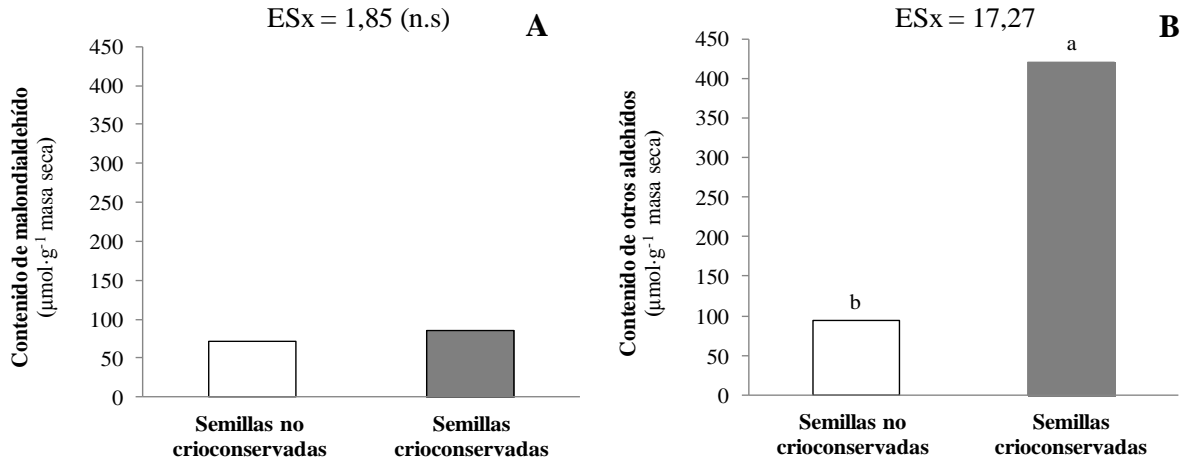


Fig. 9. A: Contenido de malondialdehído y **B:** Contenido de otros aldehídos en tallos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

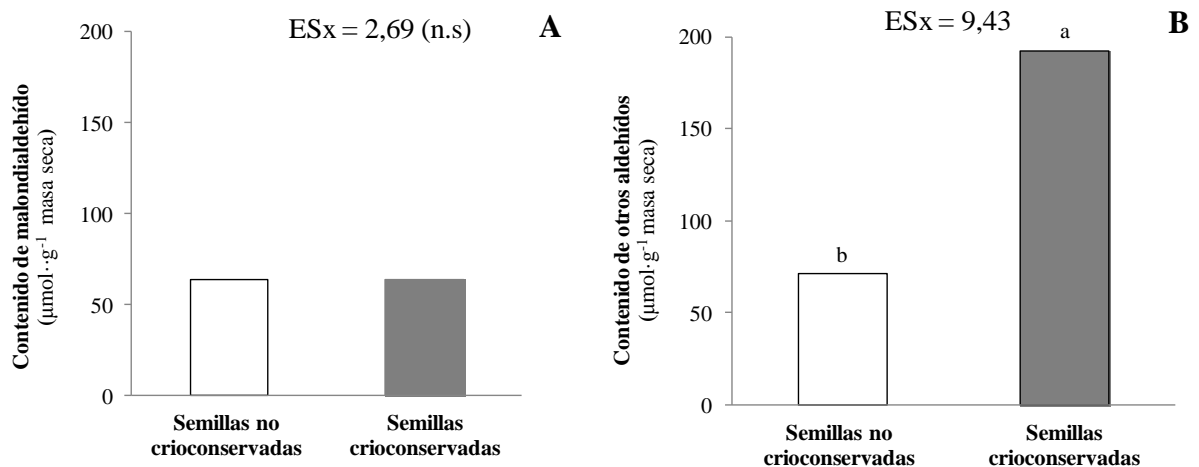


Fig. 10. A: Contenido de malondialdehído y **B:** Contenido de otros aldehídos en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 14 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

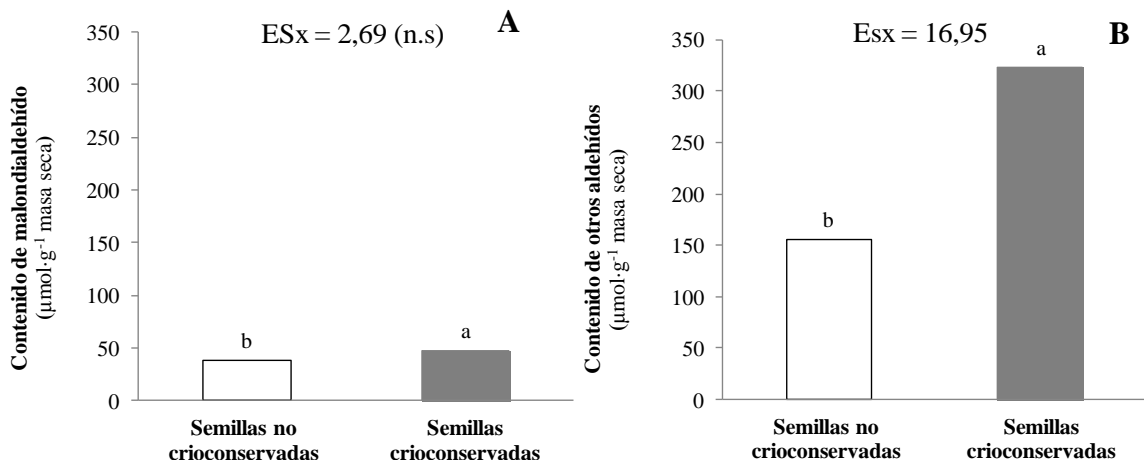


Fig. 11. A: Contenido de malondialdehído y **B:** Contenido de otros aldehídos en tallos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 14 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

Cuando se introducen las semillas en NL, se someten a un estrés por temperaturas bajas y como consecuencia, se producen señales a nivel celular que conducen a una reducción en el crecimiento o en el metabolismo (Greaves, 1996) como resultado directo de la exposición del umbral a las temperaturas bajas para la actividad bioquímica y fisiológica o el desarrollo morfológico.

Muchos autores han resumido los efectos metabólicos de las temperaturas bajas en plantas que crecen principalmente en condiciones ambientales (Layne, 1992; Palonen y Buszard, 1997; Revilla *et al.*, 2005), lo cual ocurre de forma análoga a lo que sucede en el material que se somete a la criopreservación. La capacidad de germinar de las semillas se relaciona entre otras, con la pérdida de la integridad de la membrana. Por tal razón, la acumulación y peroxidación lipídica de la membrana se consideran las principales causantes del deterioro de las semillas (Corbineau *et al.*, 2000, 2002; Merritt *et al.*, 2003; Bailly, 2004).

En las plantas, tanto el malondialdehído como los otros aldehídos están relacionados con procesos de estrés biótico (Companioni *et al.*, 2005) y abiótico (Yabor *et al.*, 2006, 2008,

2009; Pérez *et al.*, 2012). El malondialdehído se genera por la ruptura de los ácidos grasos poliinsaturados y se utiliza para determinar el grado de peroxidación lipídica en las membranas. Es un metabolito primario de respuesta al estrés en las plantas (Dumet y Benson, 2000), por lo que se considera un marcador del daño oxidativo. El aumento de su contenido indica la inducción exitosa del estrés oxidativo. De esta manera, la peroxidación lipídica también implica la formación y propagación de radicales lipídicos, pérdida de oxígeno y la eventual destrucción de las membranas, lo que genera una variedad de productos que incluye cetonas, alcoholes, éteres y aldehídos.

El daño por congelación induce la producción de radicales libres (Benson, 2008) que atacan la fracción lipídica de las membranas; resultando en la formación de Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) que están involucradas en varios aspectos de la fisiología de la semilla (Bailly, 2004; Berjak *et al.*, 2011; Weitbrecht *et al.*, 2011; Leymarie, 2012) y en otros procesos morfogénicos. Cuando los ácidos grasos poliinsaturados son peroxidados en la biomembrana, una gran diversidad de aldehídos se forman y algunos de ellos son altamente reactivos.

En el experimento que se analiza contrario a lo esperado, el incremento en el contenido de otros aldehídos, no estuvo aparejado al incremento en el contenido de malondialdehído en las primeras etapas de crecimiento y desarrollo de las plantas; sin embargo Martínez-Montero *et al.* (2002) sí encontraron diferencias en el contenido de malondialdehído unido al de otros aldehídos en la fracción microsomal de callos crioconservados de caña de azúcar cuando los compararon con callos no crioconservadas, durante los tres primeros días posteriores a la exposición al NL.

Numerosos factores abióticos inducen la formación de EROs (Weitbrecht *et al.*, 2011) desde que comienza en las semillas el proceso de maduración hasta su transformación en

plantas, lo que produce en las células y tejidos una condición pre-estresante, que sirve como premisa para originar respuestas fisiológicas rápidas durante las diferentes fases del desarrollo de las mismas.

Aun cuando en el experimento no se produjeron variaciones significativas en el contenido de malondialdehído, el estrés provocado por la crioconservación generó un aumento en el contenido de otros aldehídos, que se reflejó posteriormente en la germinación, acontecimiento altamente dependiente de procesos de distensión, síntesis y reparación de membranas celulares resultado de la entrada de agua en la semilla (Weitbrecht *et al.*, 2011).

Contrario a producir un efecto negativo, la crioconservación resultó favorable para las semillas de frijol, pues probablemente logró activar mecanismos asociados a la producción de un sistema antioxidante, el cual es esencial en la protección a las membranas de la peroxidación lipídica y en los procesos de longevidad y germinación de las semillas. Pues, como plantea Menon *et al.* (2014), el estrés por crioconservación incrementa el contenido de compuestos que son necesarios para la estabilización de la membrana como un mecanismo de tolerancia a la congelación.

Inmediatamente después de la descongelación (fig. 12), se observó un incremento en el contenido de fenoles solubles y totales en las semillas que se almacenaron a 4°C (control) respecto a las crioconservadas. En los cotiledones (fig. 13) de las plantas procedentes del tratamiento control, se observó también un aumento significativo en el contenido de todos los fenoles (ligados a la pared, solubles y total). Sin embargo, el mayor efecto de la acción del NL en este indicador se observó en las raíces de las plantas procedentes de semillas crioconservadas 7 días después de la descongelación (fig. 14; CVG= 80%), con una disminución significativa en el contenido de fenoles (ligados a la pared, solubles y total).

Cuando se realizó la determinación del contenido de fenoles en tallos, solo se observó un contenido mayor de los solubles (fig. 15) en las plantas procedentes de semillas crioconservadas, mientras que en las hojas fue significativo el aumento del contenido de fenoles ligados a la pared celular (fig. 16).

Después de la descongelación de las semillas (14 días), en raíces de las plantas procedentes de la crioconservación (fig. 17), disminuyó significativamente el contenido de fenoles (ligados a la pared, solubles y total), mientras que en tallos (fig. 18) y en las hojas (fig. 19) solo se observaron diferencias significativas en el contenido de fenoles solubles.

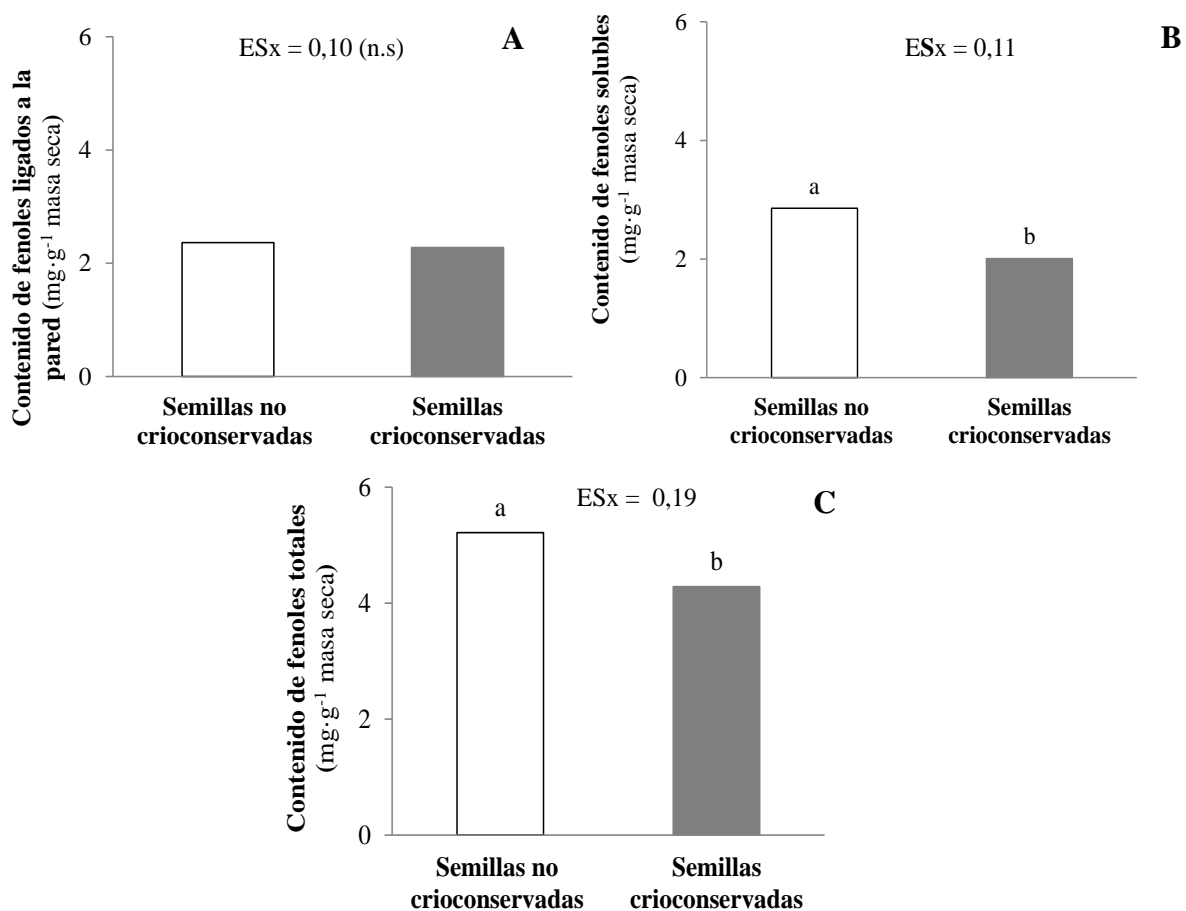


Fig. 12. Contenido de fenoles en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inmediatamente después de la descongelación. **A:** fenoles ligados a la pared; **B:** fenoles solubles; **C:** fenoles totales. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

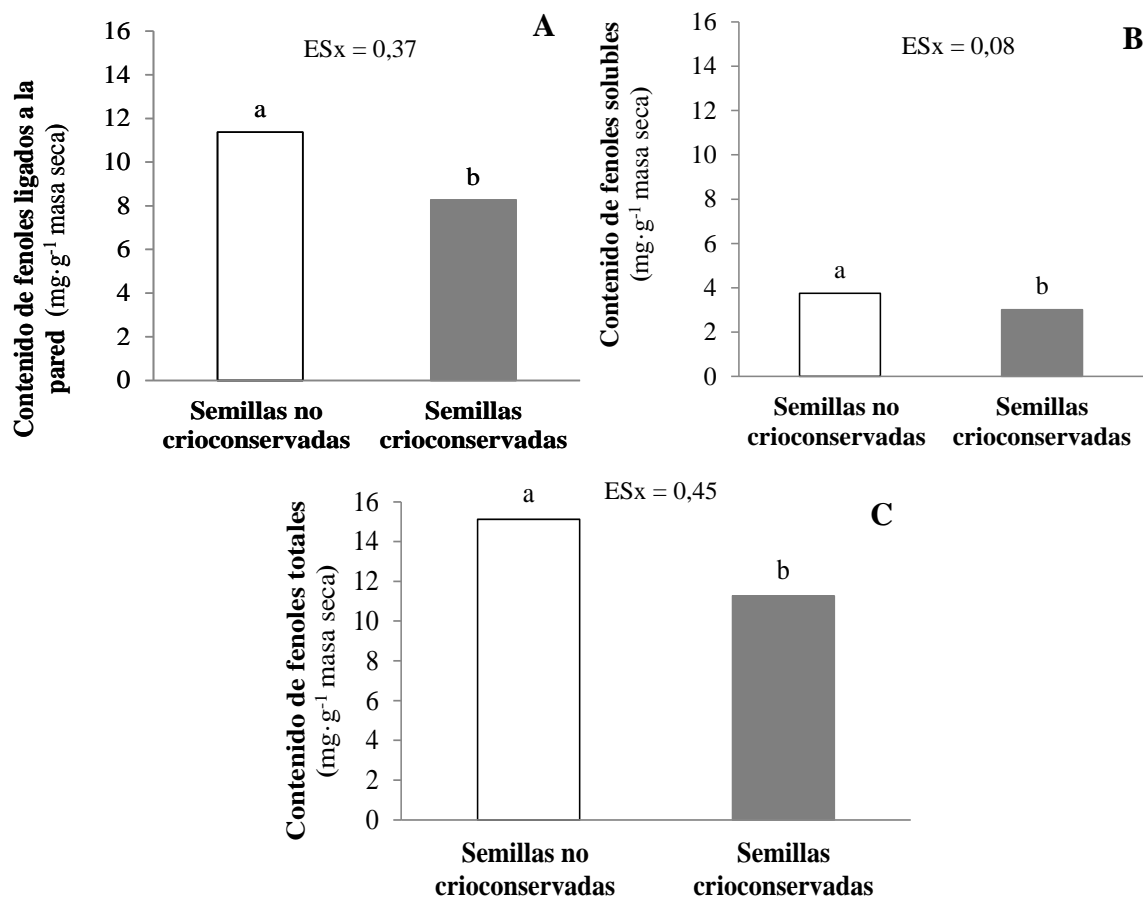


Fig. 13. Contenido de fenoles en cotiledones de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. **A:** fenoles ligados a la pared; **B:** fenoles solubles; **C:** fenoles totales. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx = error estándar de la media.

El frijol es un alimento funcional, contiene moléculas bioactivas como los polifenoles y los taninos que muestran capacidad antioxidantes (Parr y Bolwell, 2000; Dueñas *et al.*, 2005; Oomah *et al.*, 2005). Estos compuestos se almacenan fundamentalmente en el tegumento de las semillas por una razón principal, su actividad anti-fúngica y anti-microbiana, lo que le ofrece una mayor protección al ataque de insectos y patógenos; además prevén efectivamente la oxidación, y también actúan como factores protectores del daño oxidativo en humanos (Pszczola, 1998).

Polifenoles como los flavonoides, se encuentran presentes en casi todas las familias de plantas, principalmente en la epidermis de hojas, en tallos, raíces, flores, semillas y frutos. Por su condición de polifenoles, los flavonoides actúan como antioxidantes protegiendo a las plantas contra la radiación UV. Por otro lado, presentan un rol fundamental en la defensa de las plantas frente a depredadores y en el desarrollo, el crecimiento de otra planta vecina y frente a estreses ambientales. También se encuentran involucrados en la simbiosis vegetal (por inducción de la nodulación de bacterias fijadoras del nitrógeno).

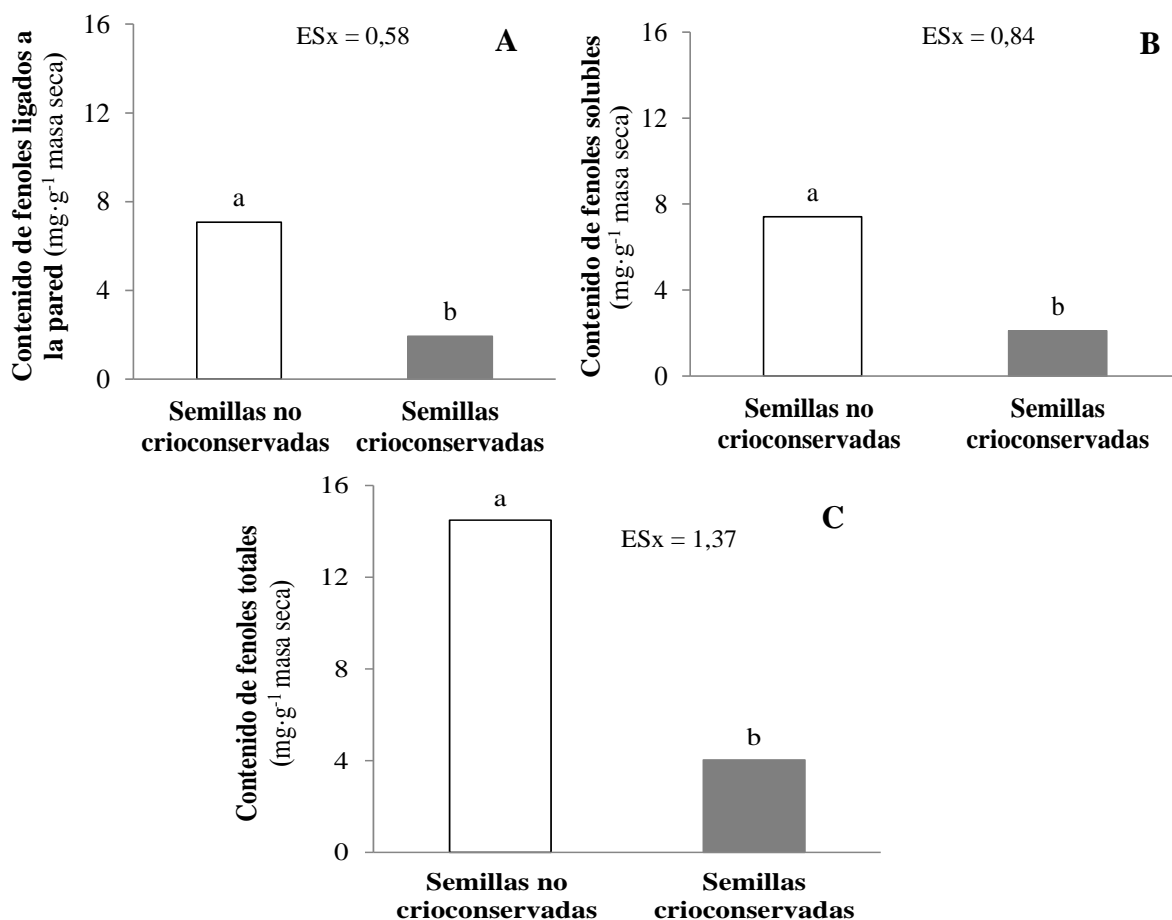


Fig. 14. Contenido de fenoles en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. **A:** fenoles ligados a la pared; **B:** fenoles solubles; **C:** fenoles totales. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

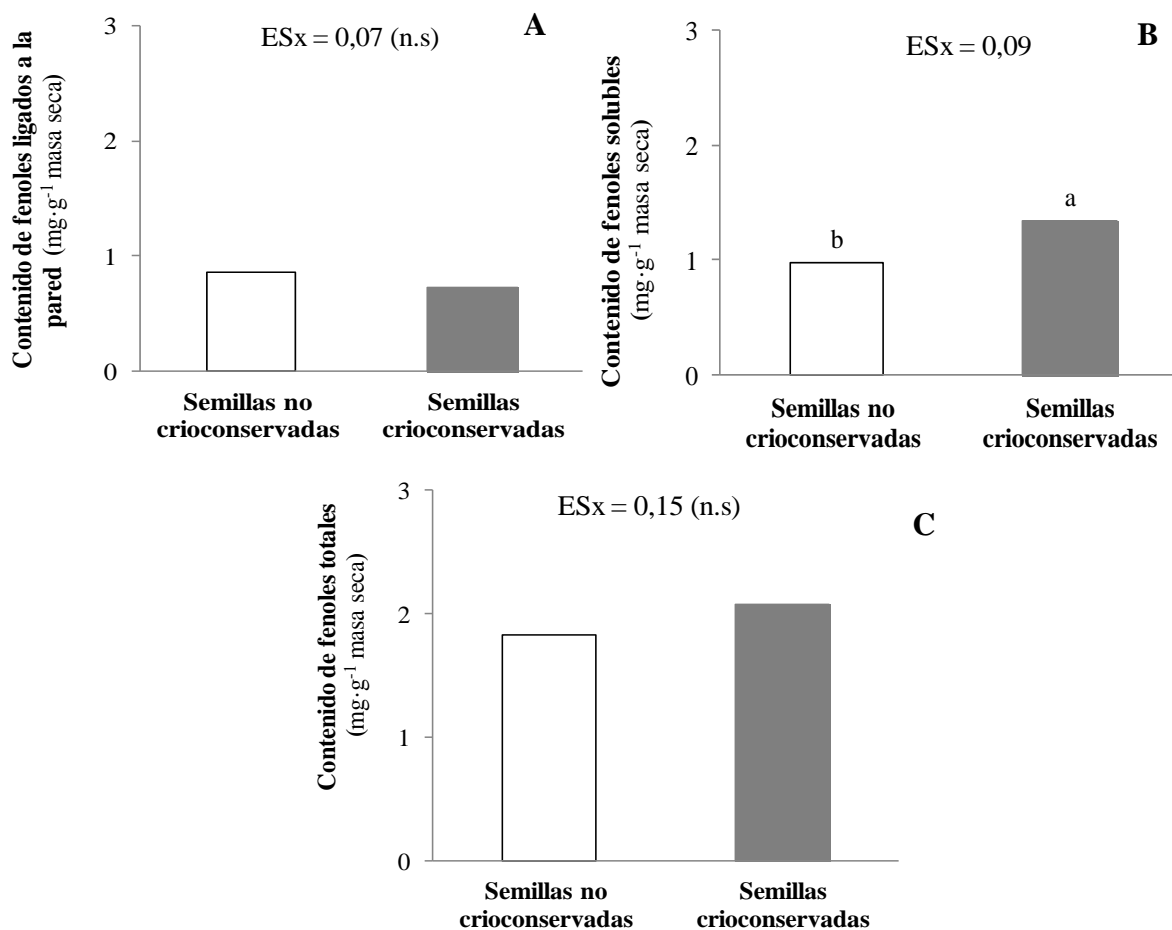


Fig. 15. Contenido de fenoles en tallos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. **A:** fenoles ligados a la pared; **B:** fenoles solubles; **C:** fenoles totales. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

En el cultivo de frijol se ha identificado y aislado un número grande de flavonoides (Kucera *et al.*, 2003; Dinelli *et al.*, 2006), los cuales son responsables del color de las semillas. De igual manera, en otras leguminosas como la soya se ha identificado una fluctuación en el número de compuestos fenólicos que, según autores como Tsukamoto *et al.* (1995), están en relación con las condiciones ambientales en las que se desarrolle el cultivo. Estos investigadores demuestran que el contenido de isoflavonas incrementa en las semillas de soya cuando su desarrollo ocurre a temperaturas moderadas; sin embargo, no ha sido propuesta una hipótesis única que justifique este fenómeno en frijol (Dinelli *et al.*, 2006).

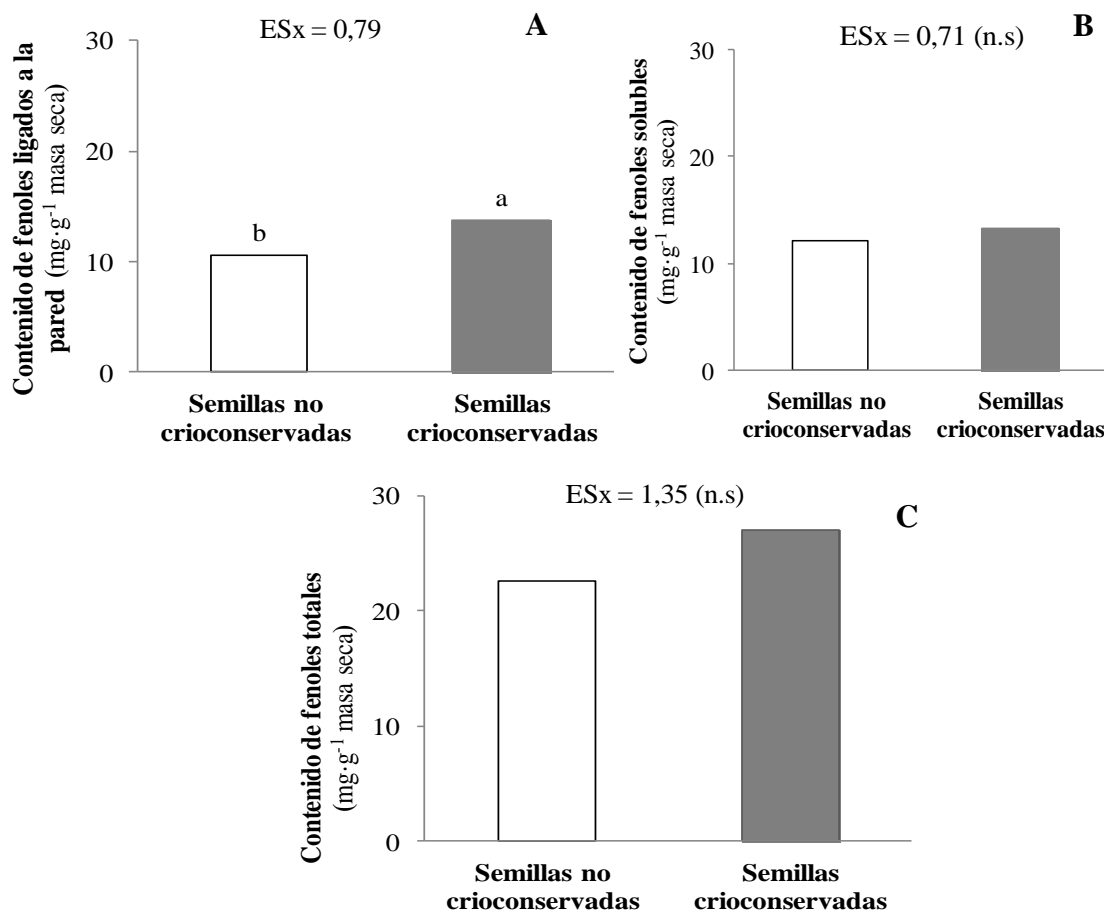


Fig. 16. Contenido de fenoles en hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. **A:** fenoles ligados a la pared; **B:** fenoles solubles; **C:** fenoles totales. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

Compuestos como los isoflavonoides y las fitoalexinas están relacionados con procesos de defensa de las plantas cuando están expuestas a estrés biótico. La fitoalexinas en particular, están involucradas en mecanismos de síntesis de resistencia adquirida (Kuc, 1995). Hoy día, existe una opinión común y es que, también en condiciones de estrés abiótico, actúan como elicitores, induciendo mecanismos de defensas en las plantas. Estudios moleculares demuestran que la transcripción de enzimas en la síntesis de estos compuestos es espacial y temporalmente coordinada (Dinelli *et al.*, 2006) y que las enzimas de transcripción son inducidas aun cuando las interacciones sean o no compatibles.

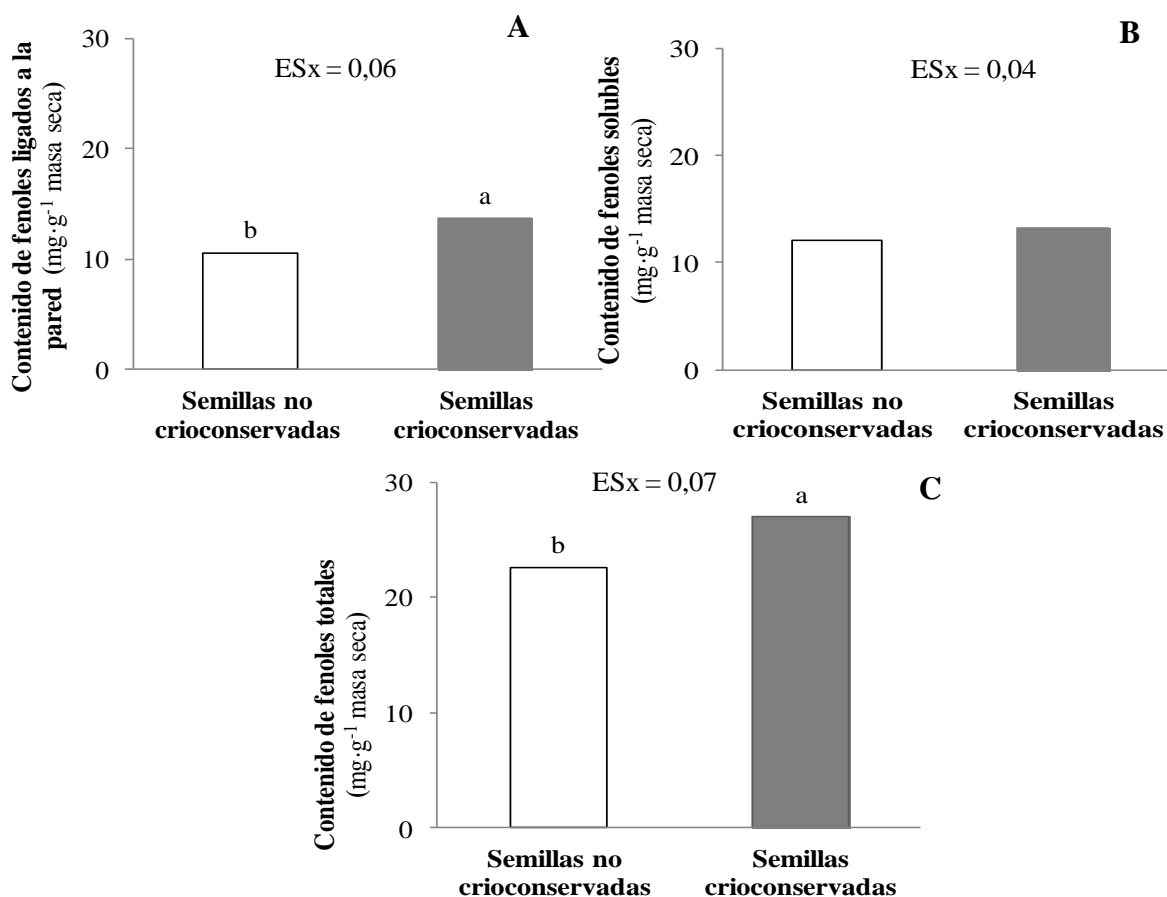


Fig. 17. Contenido de fenoles en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 14 días después de la descongelación. **A:** fenoles ligados a la pared; **B:** fenoles solubles; **C:** fenoles totales. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

No se tiene referencias sobre la influencia de la crioconservación en el contenido de fenoles, sin embargo, Dinelli *et al.* (2006) encuentran una gran variabilidad en el contenido de fenoles totales en cultivos de frijol, ellos sugieren que puede ser producto del genotipo y/o las condiciones ambientales en que se desarrolle el cultivo. De igual manera exhortan la realización de otras investigaciones para tener una comprensión exhaustiva de los mecanismos que influyen en la expresión de los compuestos fenólicos. Estas

investigaciones también pudieran servir para comprender la fluctuación en el contenido de estos compuestos producto de la crioconservación, como ocurrió en el experimento que se analiza.

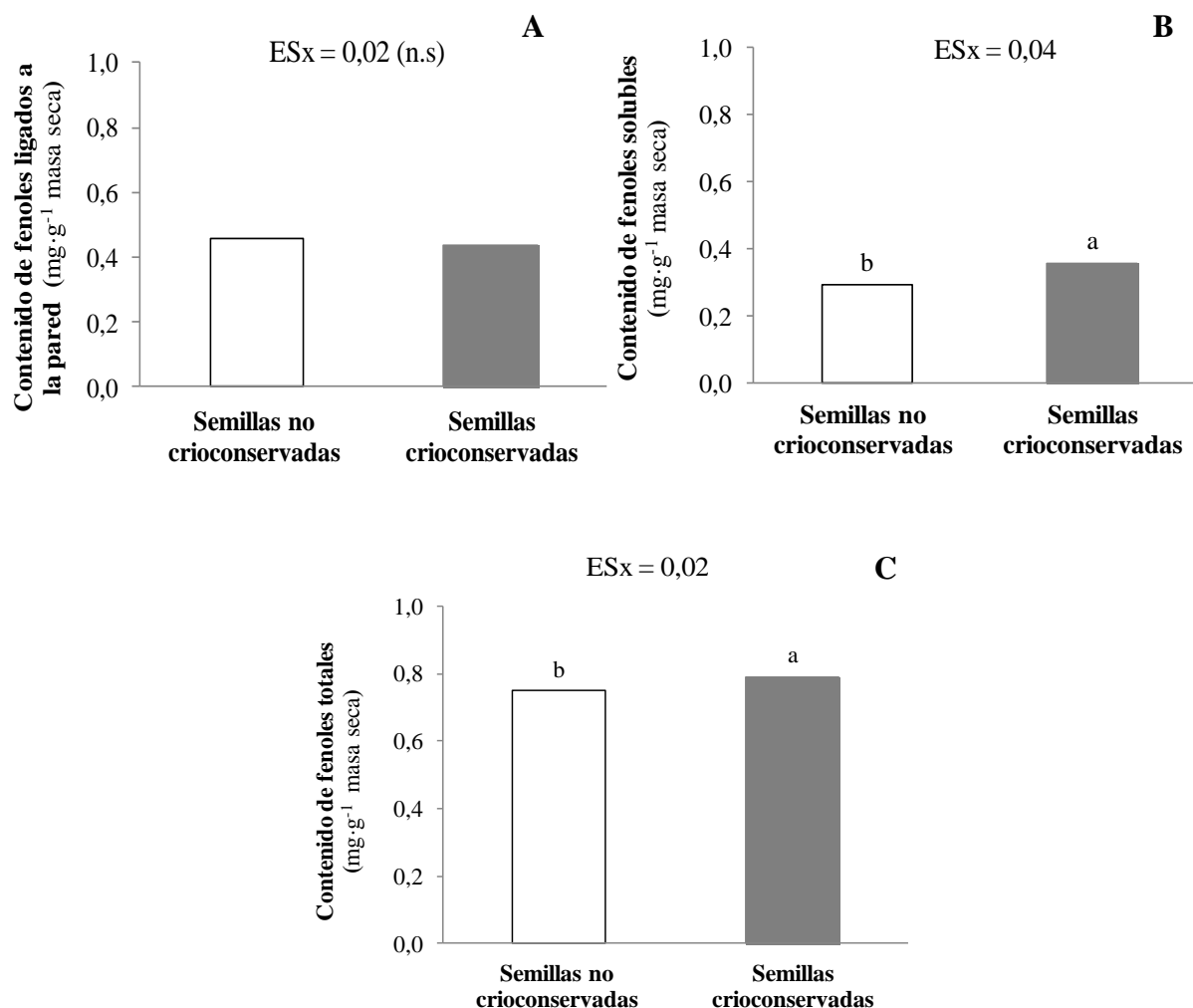


Fig. 18. Contenido de fenoles en tallos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 14 días después de la descongelación. **A:** fenoles ligados a la pared; **B:** fenoles solubles; **C:** fenoles totales. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

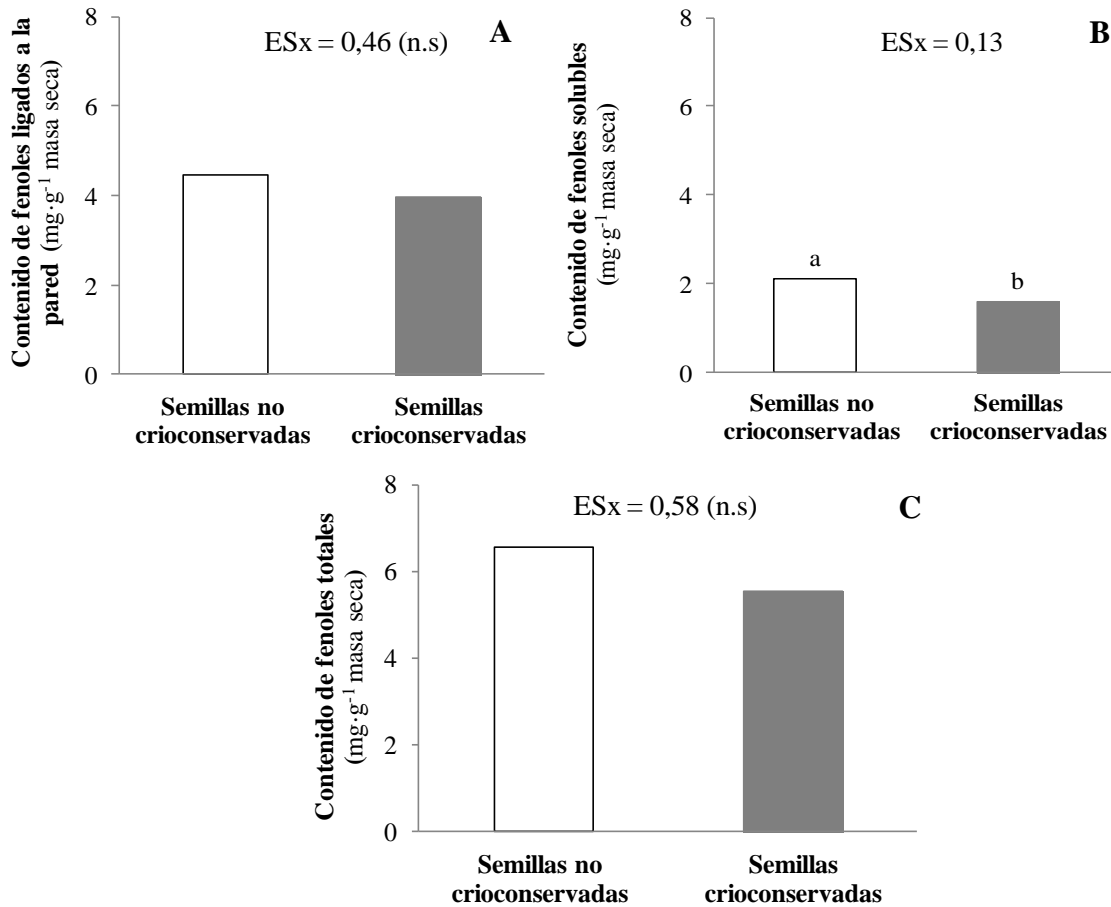


Fig. 19. Contenido de fenoles en hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 14 días después de la descongelación. **A:** fenoles ligados a la pared; **B:** fenoles solubles; **C:** fenoles totales. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

Inmediatamente después de la descongelación, las semillas del tratamiento control disminuyeron significativamente el contenido de clorofilas (*a*, *b*, *a+b*; fig. 20) con respecto a las semillas criopreservadas. El efecto del NL en las semillas se reflejó en una disminución del contenido de clorofilas en las raíces, 7 días después de la descongelación (fig. 21), y en un aumento de este indicador en las hojas de las mismas plantas (fig. 22).

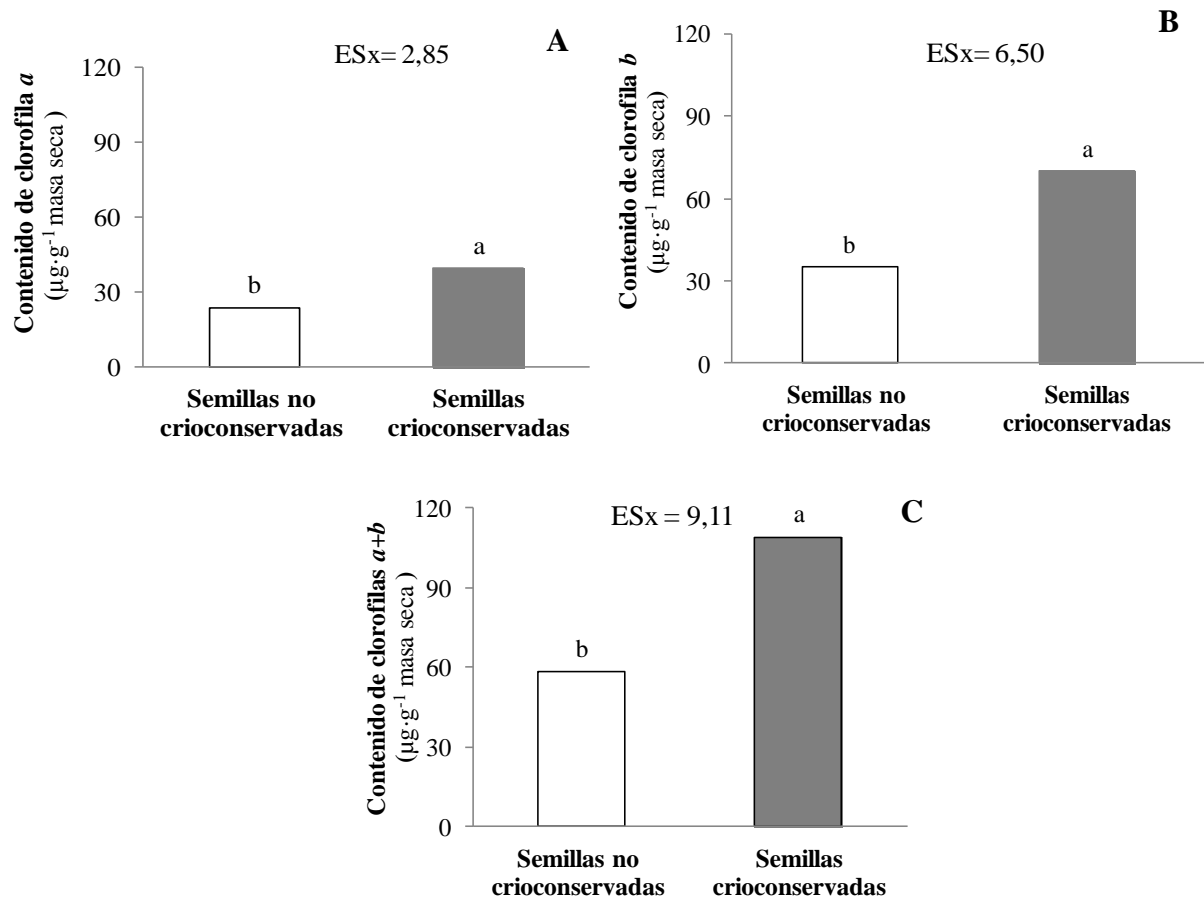


Fig. 20. Contenido de clorofilas en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inmediatamente después de la descongelación. **A:** clorofila *a*; **B:** clorofila *b*; **C:** clorofila *a+b*. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

El desarrollo de las semillas incluye tres estados, entre los que se encuentran la morfogénesis, crecimiento y deposición de los elementos de reservas, y por último, la maduración y secado (Matilla, 2008). Este desarrollo está regulado por una compleja red de señales endógenas que responden a cambios ambientales (Preston *et al.*, 2009; Nonogaki *et al.*, 2010), donde el resultado es un organismo viable y autónomo capaz de germinar cuando las condiciones internas y externas le son favorables.

Junto con la maduración y secado, las semillas pasan por un estado de dormancia. La transición del estado de dormancia a la germinación es un punto crítico, principalmente para el inicio del crecimiento vegetativo (Iglesias-Fernández *et al.*, 2011), y es similar en muchas especies vegetales (Linkies *et al.*, 2010). Las semillas pueden permanecer en estado de dormancia durante el almacenamiento; sin embargo, al mismo tiempo, en el interior de las semillas interactúan mecanismos fisiológicos que pueden desencadenar el proceso de germinación en cuanto las condiciones sean favorables (Bazin *et al.*, 2011).

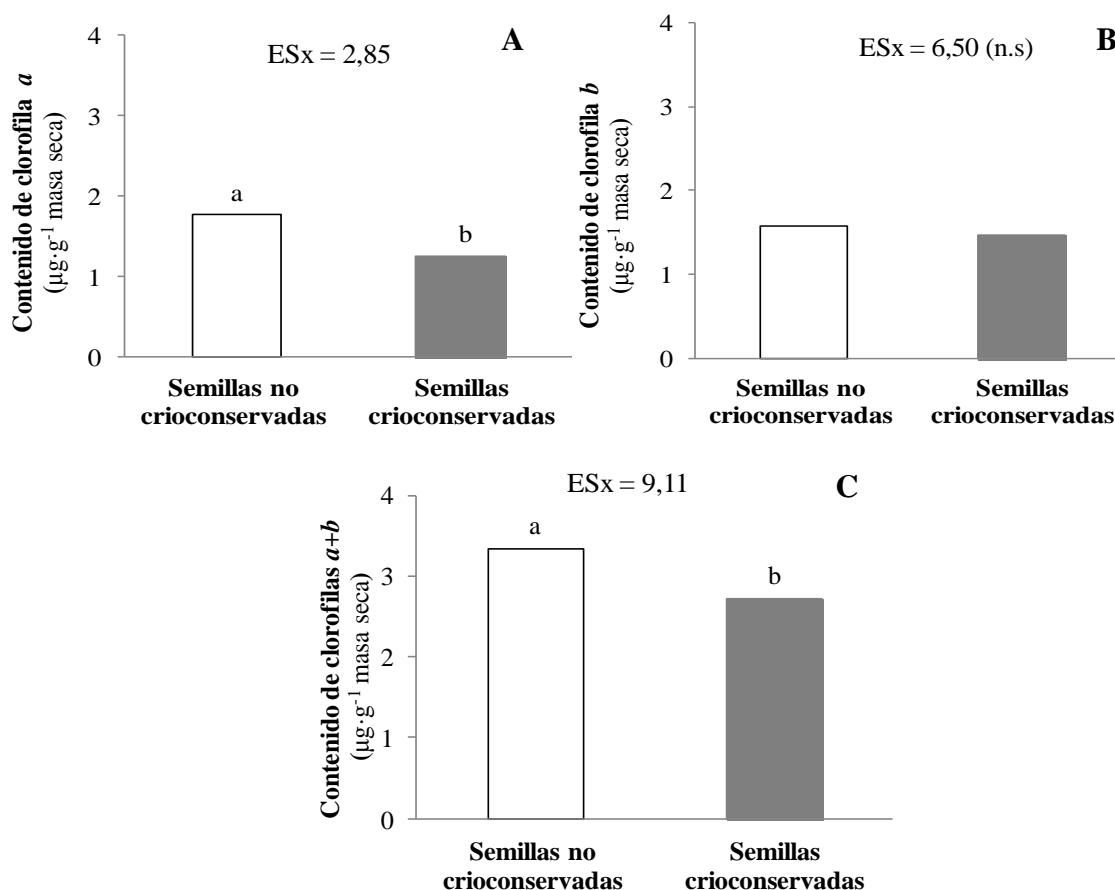


Fig. 21. Contenido de clorofilas en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. **A:** clorofila *a*; **B:** clorofila *b*; **C:** clorofila *a+b*. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

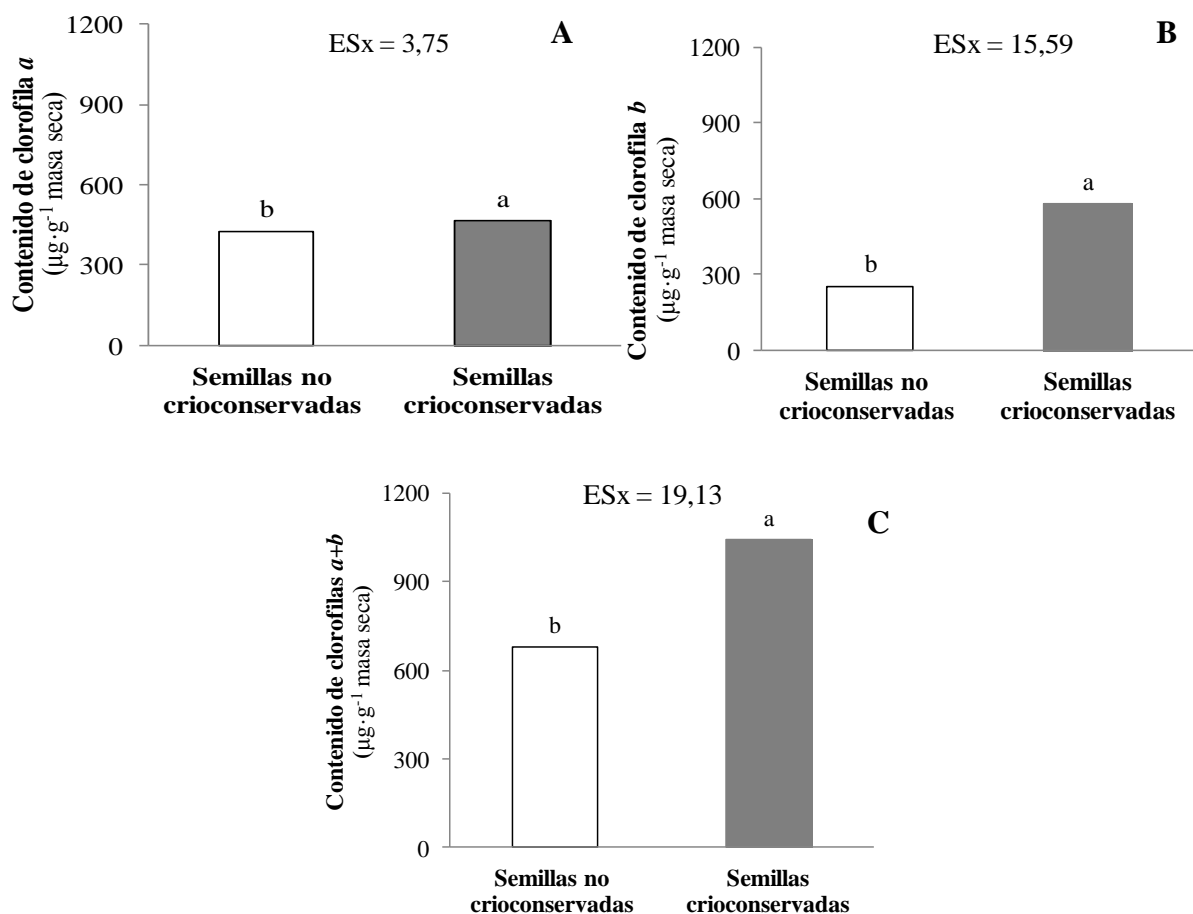


Fig. 22. Contenido de clorofilas en hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. **A:** clorofila a; **B:** clorofila b; **C:** clorofila a+b. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx = error estándar de la media.

Cuando las semillas se introducen en NL, la realización de los procesos fisiológicos y bioquímicos es menor (Stanwood, 1985); pero en las semillas que se almacenan a 4°C , la actividad metabólica continúa. Esto trae consigo que en tales semillas siga ocurriendo una serie de procesos capaces de disminuir el estado de dormancia (Mc Donald, 1999), lo que podría ser una causa de la disminución en el contenido de clorofilas de las semillas del tratamiento control con respecto a las semillas crioconservadas.

Según Iglesias-Fernández y Matilla (2009), estos eventos son producto de una variedad de estímulos químicos y ambientales que ocurren a través de una cadena común de señales de transducción que coordinan diversos receptores celulares.

La cantidad de clorofilas en la cubierta de las semillas disminuye durante la maduración o secado. El desarrollo de la envoltura de las semillas es uno de los estados más críticos durante el proceso de formación de este órgano (Jalink *et al.*, 1998a,b); no obstante, cualquier estrés ambiental adverso que ocurra en esta etapa trae consigo la acumulación de este pigmento y puede influir en su posterior calidad.

Las clorofilas, se rompen durante la última etapa de maduración de las semillas; sin embargo, los niveles de clorofila pueden afectarse no solo por condiciones ambientales, sino también por el genotipo (Ward *et al.*, 1995). Estos autores plantean que en la germinación se dan procesos secuenciados y sincronizados en un esquema tan organizado que los procesos catabólicos y anabólicos son simultáneos; No obstante, los mecanismos exactos que pueden estar relacionados con la pérdida de la capacidad germinativa (viabilidad) de las semillas aún no están dilucidadas.

Sanhewe y Ellis (1996a,b), en estudios sobre el desarrollo y maduración de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. y su capacidad para germinar, observan que, cuando estas semillas son cosechadas al final de la fase de maduración (momento en el cual disminuyen los contenidos de clorofilas), tienen un alto porcentaje de germinación normal y muestran mejor capacidad de almacenaje con respecto a las semillas que fueron cosechadas con bajo nivel de madurez. Jalink *et al.* (1998b), en semillas de *Brassica oleracea* L. con bajos contenidos de maduración, encuentran un mayor porcentaje de germinación y una producción normal de plantas.

Onyilagha *et al.* (2011) analizaron la influencia del contenido de clorofilas en el vigor de semillas de *Brassica napus* L. y concluyeron que la cantidad de clorofilas puede no tener un efecto significativo en la germinación de estas semillas, especialmente cuando se siembran bajo condiciones ambientales poco estresantes, aunque semillas con altos contenidos de clorofilas son más propensas al deterioro cuando las condiciones ambientales son adversas. Los altos contenidos de clorofilas pueden afectar el vigor y el desarrollo futuro de las semillas y las plantas en el campo, y la porosidad de la testa de las semillas es directamente proporcional al alto contenido de clorofilas que presenten las mismas.

Las clorofilas resultan clave para determinar el estado fisiológico de las semillas (Sanhewe y Ellis, 1996a,b). En el experimento que se analiza la cantidad de clorofilas en las semillas crioconservadas fue significativamente superior que en las del tratamiento control; sin embargo, esto no fue impedimento para que tuvieran un buen porcentaje de germinación. Ello indica que estas semillas habían alcanzado antes de su conservación en NL un nivel de madurez tal que les permitió obtener una buena germinación y producir plantas con calidad.

Las clorofilas son también un componente clave de la fotosíntesis y se requieren para la absorción de la luz. No obstante, producto de sus propiedades para absorber luz, las clorofilas pueden convertirse en potenciales fototoxinas celulares y resultan ser moléculas dañinas. Esto se pone de manifiesto en situaciones donde el aparato fotosintético de las plantas se sobreexcita, por ejemplo, bajo condiciones de alta intensidad de luz (Hörtensteiner y Krautler, 2011).

Producto del potencial de toxicidad, el metabolismo de las clorofilas es fuertemente regulado durante el desarrollo de las plantas. Esto hace que la bioquímica y la regulación de la biosíntesis de las clorofilas son intensamente estudiadas (Hörtensteiner y Krautler, 2011).

Durante la germinación, la ruptura de las clorofilas puede ser un prerrequisito de detoxificación de pigmentos potencialmente fototóxicos en el interior de las vacuolas con el fin de permitir la movilización del nitrógeno ligado a las proteínas de las clorofilas (Hörtensteiner, 2006), un proceso que pudo no ocurrir en las hojas de plantas procedentes de semillas crioconservadas.

El estrés producido por las bajas temperaturas durante la crioconservación de las semillas quizás pudo provocar señales que se expresaran en un incremento en los niveles de clorofilas de las semillas; sin embargo, el porcentaje de germinación y la buena calidad de las plantas que se obtuvieron en ambos tratamientos, demuestran que los niveles en el contenido de las clorofilas no fueron suficientes para causar toxicidad.

Esto resulta contrario a los resultados de Al-Sobhi *et al.* (2006), que evaluaron el efecto del estrés salino en el contenido de clorofilas de hojas de algodón de seda (*Calotropis procera*, Aiton) y observaron efectos de la salinidad en el contenido de clorofilas y en la calidad de las plantas, especialmente cuando los niveles eran de 160 y 320 mM NaCl. Tal razón indica la necesidad de otros estudios para poder lograr una mayor comprensión de este hecho.

En el experimento que se analiza, solamente se observó un incremento en la masa fresca de raíces 7 días después de la descongelación de las semillas, y en las hojas, 14 días de la descongelación en las plantas procedentes de semillas crioconservadas (figs 23 y 24). En cuanto a la masa fresca en otras partes de las plantas procedentes de semillas crioconservadas, no se observaron diferencias estadísticas con respecto a las procedentes del tratamiento control. A pesar de la variabilidad que se observó en algunos de los indicadores fisiológicos y bioquímicos que se determinaron en el experimento.

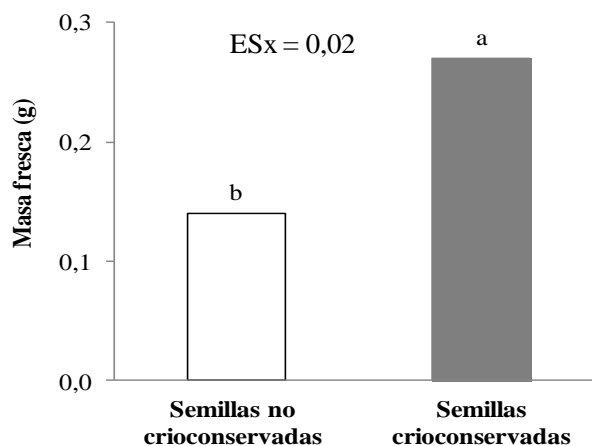


Fig. 23. Masa fresca de raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx=error estándar de la media.

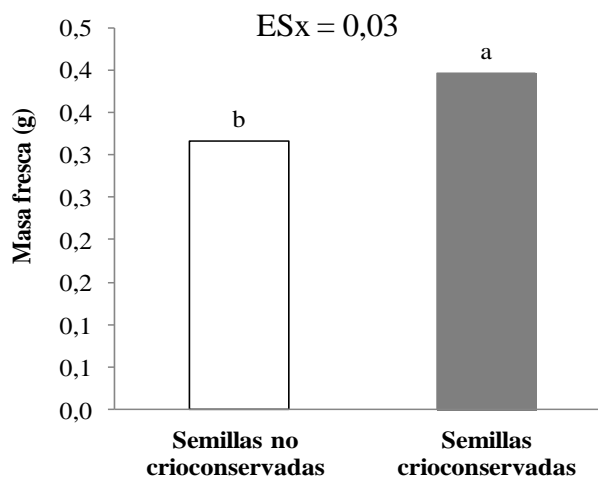


Fig. 24. Masa fresca de hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 14 días después de la descongelación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

La tabla 6 muestra el resultado de los indicadores en los cuales no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (t-test, $p \leq 0,05$).

Tabla 6. Valores de las medias de indicadores evaluados en semillas y órganos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes de semillas no criopreservadas y criopreservadas en los diferentes momentos de experimentación para los que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$).

Indicador	Semillas	Cotiledones	Raíces		Tallos		Hojas		Significación
			7 días	14 días	7 días	14 días	7 días	14 días	
Contenido de proteínas ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de masa seca)	61,2±1,07	82,95±0,82					113,6±3,09		NS
Contenido de malondialdehído ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ masa seca)	401,5±5,48						293,07±5,81	141,54±3,72	NS
Contenido de otros aldehídos ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ masa seca)	4,91±13,40						292,5±4,08	380±22,02	NS
Contenido de fenoles ligados a la pared celular ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ masa seca)									
Contenido de fenoles solubles ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ masa seca)									
Contenido de fenoles totales ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ masa seca)									
Contenido de clorofilas a ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ masa seca)		100,02±0,45	1,9±0,05	31,33±0,29	73,49±1,28			269,44±0,63	NS
Contenido de clorofilas b ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ masa seca)		50,67±0,45	1,36±0,11	17,96±0,17	42,06±1,31			449,17±0,78	NS
Contenido de clorofilas a+ b ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ masa seca)		150,7±0,87	3,26±0,16	49,29±0,44	115,56±2,52			718±1,06	NS
Masa fresca (g)	0,3±0,01	0,6±0,01	0,47±0,02	0,92±0,05	0,85±0,04	0,26±0,01			NS

El estrés por temperaturas extremas tiene diferentes efectos: reducción de la tasa de crecimiento, inhibición de la fotosíntesis y la respiración, activación de la senescencia y la abscisión, puesto que la mayoría de las situaciones de estrés influyen en el crecimiento vegetativo de la parte aérea de la planta cuando se presenta en condiciones ambientales. Cada cultivo posee un umbral óptimo de temperatura, los cultivos tropicales y subtropicales, como el frijol, pueden ser seriamente dañados por las bajas temperaturas (Thomashow, 1998). Cuando se producen temperaturas inferiores a las óptimas durante la fase de desarrollo, disminuye la productividad y la estabilidad en los rendimientos (Stamp, 1984, 1987).

La primera etapa en la aclimatación al estrés ambiental es la percepción del estrés y transducción de las señales (Yanesaki *et al.*, 2010). Los organismos y células individuales están equipados con sensores y traductores de señales que perciben y traducen señales resultado de cambios en el ambiente; sobre todo los sensores y las señales de traducción aparecen de forma específica en diferentes tipos de estrés ambiental.

La señal de estrés sigue un camino complejo hasta que se manifiestan las respuestas en las plantas. Esto implica la puesta en marcha de una secuencia de acciones complejas. Las respuestas, las adaptaciones y las acomodaciones al estrés tienen distinto significado fisiológico (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008). La respuesta posee un significado amplio que incluye los de adaptación y acomodación y no es más que cualquier alteración estructural o funcional que se produce en las plantas como consecuencia de un estrés. Sin embargo, adaptación y acomodamiento tienen un significado más restringido, pues hacen referencia a modificaciones heredables y, por tanto, incluidas en la información genética.

La activación de los mecanismos defensivos en las plantas o de respuestas conducen a la acomodación del metabolismo celular a las nuevas condiciones (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008), a la activación de los procesos de reparación de la maquinaria celular dañada y a la expresión de las adaptaciones morfológicas adecuadas. Martínez-Montero *et al.* (2002), no encontraron diferencias en el crecimiento y desarrollo de plantas de caña de azúcar procedentes de callos crioconservados cuando lo compararon con plantas procedentes de la propagación convencional en estados avanzados del desarrollo de las plantas.

En general, las respuestas y adaptaciones específicas a un determinado factor ambiental constituyen un pequeño porcentaje frente al gran número de respuestas comunes. Así, casi todas las condiciones de estrés modifican el patrón de crecimiento de la planta, estimulan la senescencia y la abscisión de los órganos deteriorados, y alteran el funcionamiento de las rutas más eficaces de producción de energía metabólica (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008).

Estas observaciones sugieren que los estímulos deben activar rutas de transmisión de la señal, idénticas, similares o convergentes hacia un mismo abanico de respuestas defensivas. Existe poca información de cómo se pueden recuperar los órganos de las plantas del estrés por temperaturas ultra bajas, fundamentalmente, cuando se produce en las semillas antes de germinar; sin embargo, pudiera pensarse en un proceso de adaptación o acomodamiento, por lo que el componente genético puede influir fuertemente en la respuesta.

En la tabla 7, se muestra un resumen de la influencia del NL en cada órgano y en los tres momentos experimentales. El indicador que más varió por acción del NL fueron los fenoles, su efecto se reflejó en todos los órganos (semillas, cotiledones, raíces, tallos y hojas) y en los tres momentos experimentales. Las raíces fueron el órgano que más se afectó por acción del NL con 65% de variación en los indicadores (13/20), a la vez que las hojas fueron las menos afectadas (35% de los indicadores, 7/20).

Tabla 7. Resumen del efecto de la crioconservación de semillas de *Phaseolus vulgaris L* en estadios tempranos de la germinación. Clasificación basada en t-test. (t-test, $p \leq 0,05$). SNC: Semillas No Crioconservadas.

ÓRGANO	Momentos experimentales	INDICADORES			Indicadores modificados (%)
		No modificados con respecto al tratamiento control (SNC)	Incremento con respecto al tratamiento control (SNC)	Disminución con respecto al tratamiento control (SNC)	
Semillas	0	5 indicadores: Masa fresca y contenido de fenoles ligados a la pared, proteínas, malondialdehído y otros aldehídos.	3 indicadores: Contenidos de clorofilas (<i>a</i> , <i>b</i> , <i>a+b</i>).	2 indicadores Contenido de compuestos fenólicos (solubles y totales).	50% (5/10)
Cotiledones	7	6 indicadores: Masa fresca y contenido de clorofilas (<i>a</i> , <i>b</i> , <i>a+b</i>), malondialdehído y proteínas.	1 indicador: Contenido de otros aldehídos.	3 indicadores: Contenido de compuestos fenólicos (solubles, ligados a la pared y totales).	40% (4/10)
Raíces	7	3 indicadores: Contenido de clorofilas <i>a</i> y <i>b</i> , y malondialdehído	2 indicadores: Masa fresca y contenido de otros aldehídos.	5 indicadores: Contenido de clorofilas (<i>a+b</i>), fenoles (solubles, ligados a la pared y totales) y proteínas.	60% (12/20)
	14	5 indicadores: Masa fresca, contenido de pigmentos de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , <i>a+b</i>), y malondialdehído.	2 indicadores: Contenido de otros aldehídos y contenido de proteínas.	3 indicadores: Contenido de fenoles (solubles, ligados a la pared y totales)	
Tallos	7	6 indicadores: Masa fresca y contenido de clorofilas (<i>a</i> , <i>b</i> , <i>a+b</i>), fenoles (ligados a la pared, totales).	4 indicadores: Contenido de fenoles solubles, proteínas, malondialdehído y otros aldehídos.		40% (8/20)
	14	6 indicadores: Masa fresca y contenido de clorofilas (<i>a</i> , <i>b</i> , <i>a+b</i>), fenoles (ligados a la pared y totales)	3 indicadores: Contenido de malondialdehído, otros aldehídos y fenoles solubles.	1 indicador: Contenido de proteínas.	
Hojas	7	6 indicadores: Masa fresca y contenido de malondialdehído, otros aldehídos, fenoles (solubles y totales) y proteínas.	4 indicadores: Contenido de clorofilas <i>a</i> , <i>b</i> , <i>a+b</i>) y fenoles ligados a la pared.		35% (7/20)
	14	7 indicadores: Contenido de fenoles (ligados a la pared, totales), pigmentos de clorofila (<i>a</i> , <i>b</i> , total), malondialdehído y otros aldehídos.	2 indicadores: Masa fresca y contenido de proteínas.	1 indicador: Contenido de fenoles solubles.	

Al realizar un balance de los resultados en los tres momentos experimentales se observó que, el 50% de los indicadores (5/10) se modificaron por la acción del NL en las semillas inmediatamente después de la descongelación; el 48% (19/40), 7 días después de la descongelación de las semillas; y el 43% (13/30) se modificó 14 días después de la descongelación de las mismas.

A medida que transcurrió el proceso de germinación se produjo una tendencia a disminuir el efecto de la crioconservación, lo que estuvo aparejado con el desarrollo de las plantas, pues al final del proceso solamente siete indicadores incrementaron su contenido en las plantas procedentes de semillas crioconservadas, seis disminuyeron con respecto al control y otros 17 indicadores permanecieron inalterables por acción de la crioconservación de las semillas.

Estos resultados fueron contrarios a los esperados. Siempre se pensó que las semillas, especialmente los cotiledones (por ser grandes estructuras con células diferenciadas) fueran los órganos más dramáticamente afectados por la inmersión en NL, pero no las raíces; en el proceso de germinación, la semilla absorbe agua y en este órgano especialmente ocurren procesos de división celular y una serie de reacciones bioquímicas que liberan los nutrientes de los cotiledones (Weitbrecht *et al.*, 2011).

Sin embargo, como las raíces son estructuras relativamente grandes, tienen un mayor volumen de células en la corteza y la médula, y generalmente poseen mayores vacuolas y células meristemáticas, pudiera pensarse que el daño está relativamente extendido en tales tejidos y que se relaciona con la variabilidad en los indicadores bioquímicos que se presentaron en esta investigación.

En el proceso de crecimiento y desarrollo de las plantas su capacidad de resistencia al estrés suele aumentar (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008), los órganos subterráneos (raíces, bulbos y rizomas) son más sensibles a los cambios de temperatura que las parte aéreas (tallos y hojas), lo que, probablemente pudiera también estar asociado con los resultados que se obtuvieron en este experimento.

Los órganos reproductivos, por su parte son muy sensibles; sin embargo, las semillas pueden soportar temperaturas extremas. En plantas que crecen al aire libre, el efecto del estrés por frío se agudiza en condiciones de baja humedad relativa (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008), pues las temperaturas bajas reducen la capacidad de las raíces para absorber agua y bloquean la función de los estomas.

Tomando en consideración los resultados del experimento y la variabilidad que se observó en los indicadores bioquímicos determinados en el proceso de germinación, se escogen aquellos donde el CVG se estimó de elevados para evaluarse en el crecimiento de las plantas.

4.2. Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol var. Milagro Villareño en el crecimiento y desarrollo de dos generaciones de plantas cultivadas en canteros

4.2.1 Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol en indicadores bioquímicos en raíces y tallos en plantas cultivadas en canteros

El contenido de fenoles (ligados, solubles y total; fig. 25) en las raíces fue superior estadísticamente en las plantas procedentes de semillas crioconservadas. No se encontraron diferencias estadísticas en el contenido de otros aldehydos en tallos, como se observa en la figura 26; sin embargo, el contenido de proteínas disminuyó con respecto al tratamiento control (fig. 27).

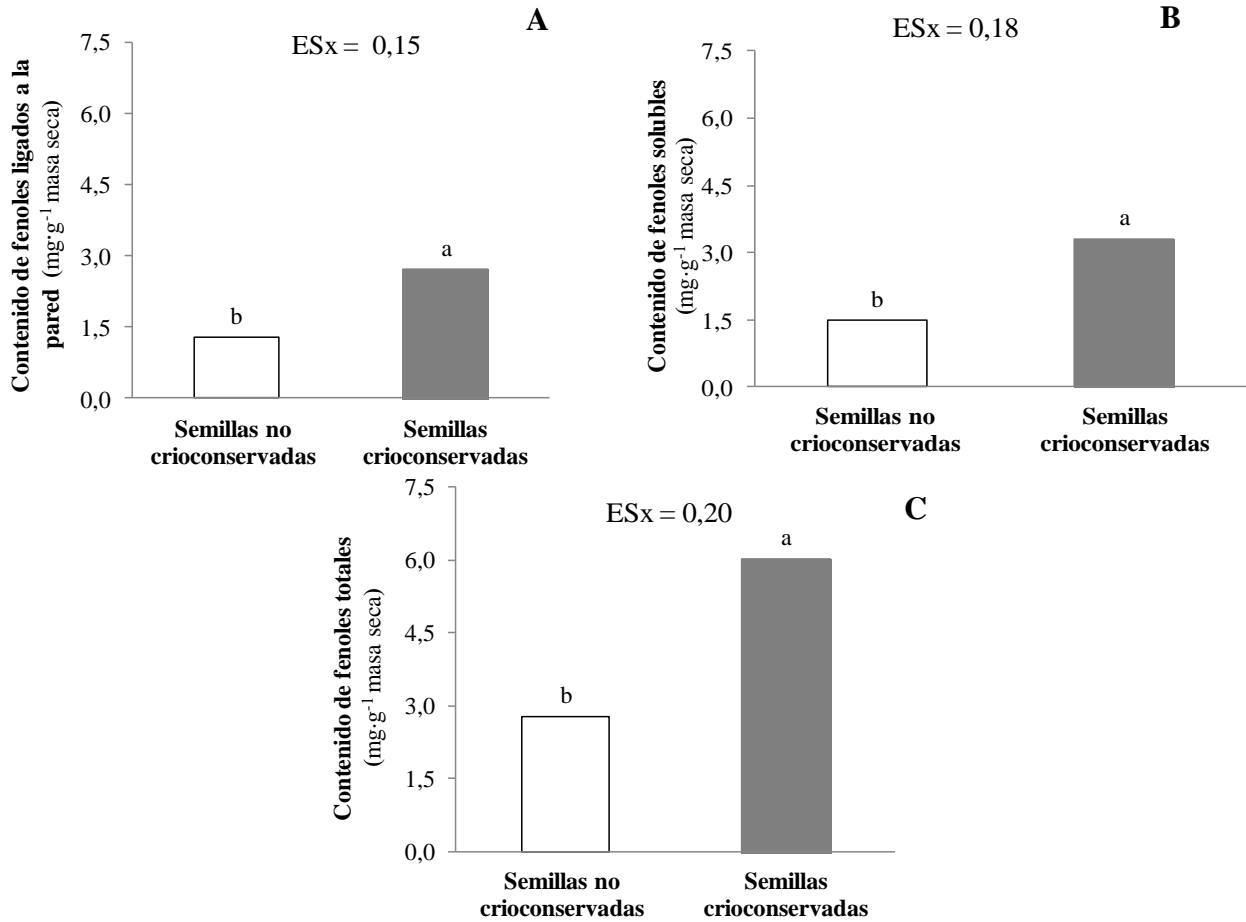


Fig. 25. Contenido de fenoles en raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 32 días después de la siembra **A**: fenoles ligados a la pared; **B**: fenoles solubles; **C**: fenoles totales. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

Una de las propiedades adaptativas más importantes de los vegetales es la capacidad que presentan las semillas de retener su viabilidad durante períodos largos de tiempo (dormancia morfológica), lo que le permite sobrevivir en condiciones adversas. Existen dos formas bajo las cuales las semillas manifiestan esta propiedad adaptativa, una de ellas es la incapacidad de germinar cuando las condiciones no son favorables. En el pericarpo de la semilla se encuentran inhibidores de naturaleza fenólica como el ácido salicílico, ácido *p*-hidroxibenzoico y el ácido cinámico.

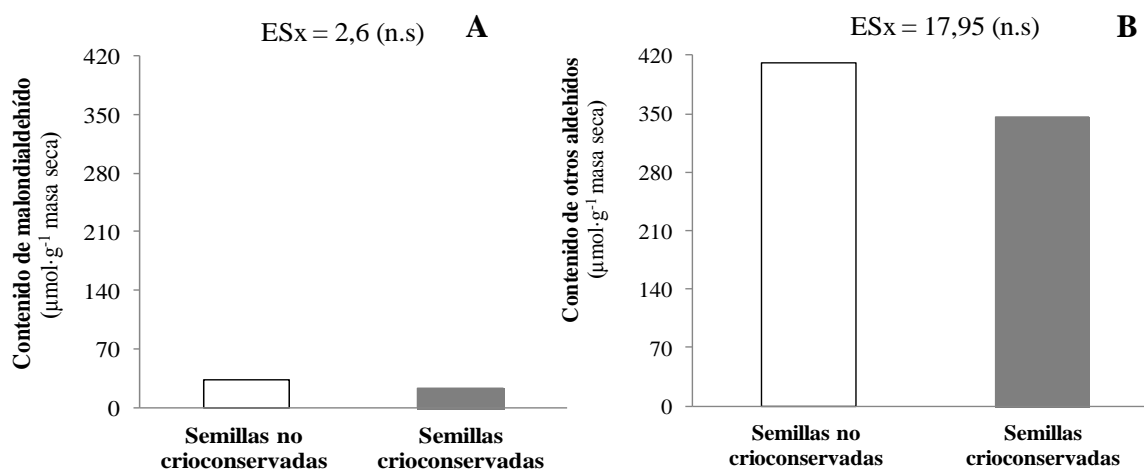


Fig. 26. A: Contenido de malondialdehído y **B:** Contenido de otros aldehídos en tallos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 32 días después de la siembra (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

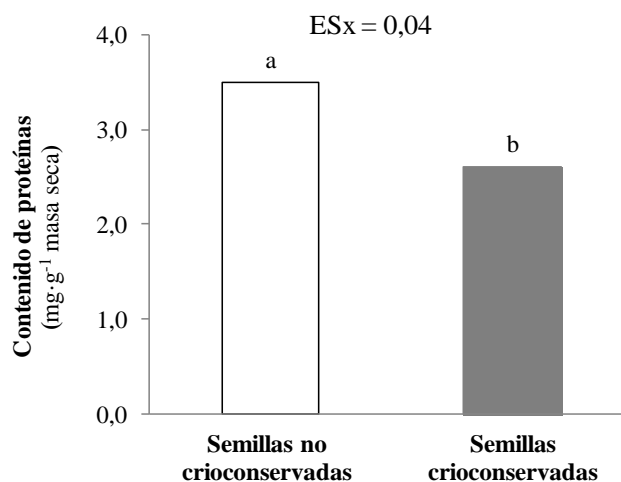


Fig. 27. Contenido de proteínas en tallos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 32 días después de la siembra. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=6$). ESx= error estándar de la media.

Estudios realizados para encontrar las bases metabólicas de la dormancia y la eliminación de la misma conducen a pensar que la ruta oxidativa implicada en romper la dormancia de las semillas es la ruta de las pentosas-fosfato, vía alternativa en la degradación de los

carbohidratos, pero que sirve de síntesis de los compuestos fenólicos. Muchos de ellos surgen de la ruta del ácido shiquímico y de sus reacciones.

Faivre-Rampant *et al.* (2000), en estudios realizados en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), obtienen mutantes que contenían niveles altos de auxinas protectoras denominadas ácido clorogénico (que es un dihidroxifenol), así como de fenoles solubles y totales. Estos autores señalan que existen muchas cumarinas (fenoles) que tienen efectos no bien conocidos en varios procesos bioquímicos y fisiológicos, con un comportamiento inestable, pues en ocasiones bajos niveles se comportan como estimuladores y niveles altos como inhibitorios.

Las proteínas en el frijol, junto con el agua, constituyen la fracción celular más importante. Algunas proteínas tienen propiedades catalíticas y actúan como enzimas; otras funcionan como elementos estructurales; y otras más transportan, hacia o desde el interior de las células, señales específicas (en el caso de los receptores o sustancias específicas y en el caso de las proteínas transportadoras). Son las proteínas, quizás las biomoléculas más versátiles de las que componen este cultivo.

Las proteínas disminuyeron por acción del NL en tallos de las plantas procedentes de semillas crioconservadas en los canteros, similar a lo que ocurrió en la germinación 14 días después de la descongelación de las semillas. Este resultado resulta lógico si se tiene en cuenta que las proteínas se degradan constantemente en todas las células para impedir la acumulación de proteínas anormales o no requeridas y para facilitar el reciclado de aminoácidos.

En las dicotiledóneas, la degradación de las proteínas de reserva se ha estudiado intensamente en plantas de *Phaseolus vulgaris* (Barceló *et al.*, 1992). En este cultivo, el máximo de actividad proteolítica se produce a los cinco días de la germinación, coincidentemente con el máximo de acumulación de aminoácidos libres.

El estrés abiótico está considerado como uno de los más tratados en la agricultura. Estudios realizados por mejoradores y biólogos moleculares han documentado claramente que la respuesta de las plantas hacia este tipo de estrés tiene una naturaleza multigénica. Las plantas poseen un mecanismo delicado que les sirve para competir con estas situaciones.

La disponibilidad de la secuencia del genoma y las técnicas para analizar la regulación a nivel de transcripción y proteica han revolucionado el camino de la biología del estrés. Estas investigaciones han dado un acierto en cómo las señales extracelulares son percibidas y transmitidas a través de señales en cascadas de transducción en una planta dada.

La crioconservación impone una serie de condiciones de estrés en el material vegetal que podrían inducir modificaciones en los cultivos crioconservados y en las nuevas plantas regeneradas (Engelmann, 2010). Por consiguiente, antes de utilizar esa técnica de forma rutinaria para la conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos, es necesario verificar que no se altere la estabilidad genética del material crioconservado.

La obtención de estos resultados conlleva a la evaluación de caracteres morfo-agronómicos en las plantas con el objetivo de determinar el efecto de la crioconservación de las semillas de frijol en otras etapas de su desarrollo.

4.2.2. Determinación del efecto de la crioconservación de semillas de frijol en indicadores morfo-agronómicos en plantas cultivadas en canteros

No se encontraron diferencias en los indicadores morfo-agronómicos entre las plantas procedentes de semillas crioconservadas y el tratamiento control (tabla 8).

Tabla 8. Caracteres morfo-agronómicos de las plantas de frijol var. Milagro Villareño. (SNC: Semillas no crioconservadas; SC: Semillas crioconservadas).

Indicadores	Plantas procedentes de SNC	Plantas procedentes de SC	Error estándar de la media	Significación
Emergencia (%)	75,00	77,50	0,04	n.s
Altura de la planta (cm.)	71,75	74,35	0,41	n.s
Número de nudos/planta	12,85	13,05	0,41	n.s
Número de vainas/planta	25,20	25,75	1,91	n.s
Número de granos/planta	99,25	106,50	9,18	n.s
Número de granos/vaina	3,91	4,06	0,13	n.s
Masa de 100 semillas (g)	25,98	26,47	2,72	n.s

t-test, $p \leq 0,05$, $n=10$; n.s: diferencia no significativa

La medición de los caracteres cualitativos y cuantitativos de alta heredabilidad, permite determinar el grado de similitud entre las accesiones por medio de su apariencia morfológica o fenotípica y el nivel de variabilidad en una colección.

La caracterización de la variabilidad genética de los recursos fitogenéticos está considerada entre las líneas de investigación estratégicas a nivel mundial por ser un factor de peso decisivo en la solución de los problemas actuales y futuros relacionados con la productividad de los cultivos comerciales, la adaptación a los cambios climáticos y el desarrollo de nuevas alternativas en la obtención de variedades (Cornide, 2002).

Resulta de utilidad caracterizar la diversidad genética de los sistemas de producción de frijol para determinar caracteres en los que deben enfatizar los diferentes programas de mejoramiento. Existen alternativas para estimar esta diversidad genética en cultivos como el frijol. Tradicionalmente se emplean marcadores morfológicos tales como el hábito de crecimiento, características de los granos, resistencia a plagas y enfermedades (Singh *et al.*, 2001). Estos marcadores, sin embargo, se afectan por el ambiente y el estado de desarrollo de la planta, tornando menos eficientes sus caracterizaciones (Tatineni *et al.*, 1996).

Aunque hasta el presente la validación genética de plantas procedentes de material crioconservado se basa fundamentalmente en estudios de variaciones fenotípicas en muestras recuperadas de la crioconservación y procedentes de material de cultivo *in vitro*, son pocos los informes que reflejan la existencia de modificaciones en las características fenotípicas productos de la crioconservación. No obstante, se conoce que el estado del germoplasma, antes de almacenarse en NL, tiene implicaciones importantes para su estabilidad y viabilidad futuras (Benson, 2008), sobre todo cuando se tiene en cuenta que el material que se almacena por largos períodos de tiempo incluye su propia estabilidad física y bioquímica (Reed, 2001).

En plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) procedentes de material crioconservado, Harding y Benson (1997) y Harding *et al.* (2009) realizaron estudios que incluyen características de las plantas, entre las que se encuentran: la altura, el tamaño de la hoja y la capacidad de tuberización; indicadores que utilizaron en la realización de análisis biométricos para evaluar la variación de estos caracteres, indicativos de cambios resultantes de la interacción total del genoma y de cambios temporales en la expresión de genes.

Contrario a los resultados de este experimento donde no se produjeron diferencias entre las plantas de ambos tratamientos en ninguna de las dos generaciones, Martínez-Montero *et al.* (2002), quienes compararon plantas de caña de azúcar originadas de callos embriogénicos crioconservados y plantas provenientes de la propagación convencional, informan diferencias entre los tratamientos. Los tallos producidos por el material cultivado *in vitro* tuvieron un menor diámetro y un menor tamaño comparado con los producidos de brotes de propagación convencional. Sin embargo, estos autores destacan que estas diferencias son transitorias, pues desaparecen transcurridos 12 meses de crecimiento en el campo.

Producto a las limitaciones que tienen los marcadores morfológicos y bioquímicos, se realizan trabajos que emplean los marcadores moleculares para caracterizar la diversidad del germoplasma (Franklin *et al.*, 2009). Estos son un potencial para detectar la diversidad genética y ayudan a mantener los recursos fitogenéticos (Virk *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2003), revelan diferencias entre genotipos a nivel de ADN, brindan una herramienta más directa, segura y eficiente para la caracterización, conservación y mantenimiento de los bancos de germoplasma.

En la actualidad, se emplean marcadores como los microsatélites (Igrejas *et al.*, 2009; Goncalves-Vidigal y Bechimol, 2011) para la caracterización de plantas de frijol, y para validar la estabilidad genética de plantas de muchos otros cultivos procedentes de material crioconservados.

4.2.3. Caracterización molecular de las plantas con el empleo de microsatélites (SSR)

Cinco de las seis combinaciones de cebadores detectaron un alelo por individuo y fueron consecuentemente considerados homocigóticos en los loci analizados (tabla 9).

Tabla 9. Pares de bases detectados por SSR con empleo de cebadores y obtenidos en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) procedentes de semillas no criopreservadas y criopreservadas.

Cebador	Grupo de ligamiento	Tipo de marcador	Tamaño esperado (pares de base)	Núcleo o Secuencia del motivo repetido	Semillas no criopreservadas	Semillas criopreservadas
PH9B2	B2	Génico	147	(CCT) ₇	147-147	147-147
PH2B2	B2	Génico	74	(GCCACC) ₅	74-74	74-74
PH3B4	B4	Génico	163	(GAAT) ₅	172-172	172-172
PH5B5*	B5	Génico	161, 171	(AT) ₅	161-161	161-161
					171-171	171-171
PH6B9	B9	Génico	192	(AT) ₁₂	198-198	198-198
PH10B11	B11	Génico	157	(CT) ₁₁	158-158	158-158

* Estado de heterocigosi del marcador.

En contraste, la combinación PH5B5 reveló dos alelos en el correspondiente locus, indicando el alto estado de heterocigocis del marcador. No obstante, se pudo observar que ninguno de los marcadores mostró cambios entre las semillas derivadas de plantas provenientes de semillas crioconservadas y el control en la región del ADN evaluado.

El análisis de las plantas procedentes de materiales crioconservados se lleva a cabo a nivel fenotípico, citológico, bioquímico y molecular. Müller *et al.* (2007), quienes emplearon técnicas de AFLP en algas (*Chlorella vulgaris*) para comparar muestras que permanecieron en crioconservación por 30 años con muestras que se mantenían en diferentes subcultivos, informan un ejemplo de ello. Estos autores no encuentran diferencias entre las procedentes del cultivo *in vitro* y las crioconservadas.

Los resultados mostraron que, el estrés que pudo producir la crioconservación en las semillas de frijol no fue suficiente para provocar cambios, al menos a nivel de la región del ADN objeto de estudio. Resultados similares informan Harding y Benson (2001), Urbanovà *et al.* (2006) y Castillo *et al.* (2010) quienes utilizan los microsatélites para el análisis de la estabilidad genética de plantas procedentes de la crioconservación. También Sánchez *et al.* (2008) plantean que la conservación en NL no afecta la estabilidad genética.

Tampoco se encontraron diferencias en los caracteres estudiados producto de la crioconservación en otros estudios donde se comparan el desarrollo vegetativo y floral en plantas de campo originadas de material crioconservado en especies como *Musa sp.* (Côte *et al.*, 2000), *Solanum tuberosum* (Mix-Wagner *et al.*, 2003) y en palma de aceite (Konan *et al.*, 2007).

Sin embargo, la última confirmación de la estabilidad genética de un material crioconservado puede ser la reintroducción en el ambiente y la producción de plantas

completas y fértiles. Esto implica que solamente muestras de alta calidad deban almacenarse en NL, lo cual requiere rigurosos procedimientos operacionales (Berjak *et al.*, 2011). El estado del germoplasma, antes ser sometido a las temperaturas ultra bajas, tiene importantes implicaciones para su estabilidad y viabilidad (Benson, 2008), dentro de lo que se incluyen la estabilidad física y bioquímica del sistema (Reed, 2001).

Por tal motivo y producto de la naturaleza variable y de la extensión del genoma, los microsatélites ofrecen un avance en el análisis de la variación genética a nivel molecular (Kalia *et al.*, 2011). Estas técnicas se emplean para medir los efectos de la selección natural (Rodrigues y Santos, 2006), develar la diversidad genética (Díaz y Blair, 2006; Asfaw *et al.*, 2009; Blair *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2011), medir estructuras de poblaciones (Ribeiro *et al.*, 2010; Albertini *et al.*, 2011), y en mapas de integridad genética, física y fisiológica (McClellan *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011). También se usan como marcador asistente de selección (Benchimol *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011; Kalia *et al.*, 2011), en el análisis de la diversidad del genoma en especies, y para evaluar relaciones entre individuos en colecciones núcleos de cultivos como el frijol (Goncalves-Vidigal y Bechimol, 2011).

Los resultados que se presentan en este experimento confirman que, la crioconservación de semillas de frijol no produce cambios en el crecimiento y desarrollo de la plantas, aunque experimentos con un número mayor de plantas se requieren para descartar posibles mutantes. Las técnicas de conservación *ex situ* son componentes fundamentales de un programa de conservación global que contemplan esencialmente las operaciones de almacenamiento y propagación de germoplasma. Sin embargo, el estado de dormancia presente en muchas semillas de especies reduce significativamente su eficacia.

4.3. Determinación del efecto de la crioconservación y el tiempo de almacenamiento en la viabilidad de las semillas de frijol var. Milagro Villareño

Las semillas seleccionadas para el estudio tenían un porcentaje de germinación cercano al 100%, sin diferencias estadísticas entre los tratamientos (fig. 28). Transcurridos los primeros seis meses de iniciado el experimento, se observó una ligera disminución en el porcentaje de germinación de ambos tratamientos, pero no se observaron diferencias estadísticas entre ellos. Solo después de los 12 meses de conservación se observaron diferencias estadísticas en el porcentaje de germinación entre los tratamientos, las que se mantuvieron hasta el final de la evaluación.

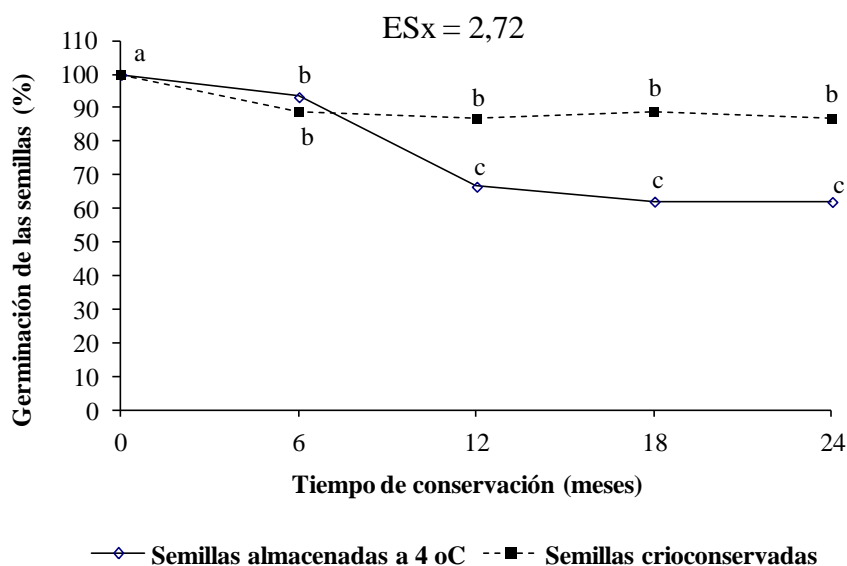


Fig. 28. Germinación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA bi-factorial, $p \leq 0,05$, $n=15$). ESx= error estándar de la media. Solamente para el procesamiento estadístico los datos se transformaron según la fórmula: $y' = 2\arccos(\sqrt{y/100})$.

El principio básico para la conservación de semillas es la limitación de los cambios químicos que son originados por el metabolismo o los procesos de envejecimiento; sin embargo, se sabe que las condiciones de baja temperatura y bajo contenido en humedad

prolongan la longevidad de las semillas (Iriondo, 2001). De acuerdo a las reglas de Harrington, existe una relación exponencial entre la longevidad de las semillas, la temperatura y el contenido de humedad de almacenamiento, de manera que la longevidad de una semilla se duplica por cada reducción de 5°C en la temperatura y por cada reducción de un 1% en el contenido de humedad.

Conforme con este modelo, las semillas conservadas a temperaturas muy bajas y con contenidos de humedad muy bajos deberían mantenerse viables durante milenios. Sin embargo, Vertucci y Roos (1990) y Ellis *et al.* (1990a,b), muestran que existen límites a los efectos beneficiosos de la desecación sobre la longevidad y que estos límites dependen de la composición química de la semilla. Por tal razón, los efectos de la temperatura y el contenido de humedad no son independientes (Vertucci y Roos, 1993). No obstante, el uso apropiado de estos dos factores proporcionan una vía aceptable para la conservación a largo plazo de muestras de semillas en bancos de germoplasma (Iriondo, 2001).

Independientemente de las condiciones de almacenamiento que se utilicen, la viabilidad de las muestras debe ser controlada periódicamente (Iriondo, 2001). Si el porcentaje de germinación es inferior al 85% del valor inicial en las muestras almacenadas en colecciones a largo plazo, y al 65% del valor inicial en colecciones activas, se recomienda su regeneración mediante nuevas recolecciones o por multiplicación a partir de las semillas viables.

Las semillas ortodoxas eventualmente pierden la viabilidad durante el almacenamiento (Mira *et al.*, 2010). El resultado de este experimento pudiera relacionarse con la cinética y los mecanismos de deterioro de semillas, similar a lo que informan Walters (1998) y

Walters *et al.* (2005). Las semillas que se encuentran en almacenamiento siguen un patrón sigmoidal de deterioro en la cual la viabilidad permanece por un período relativamente constante, seguido de una abrupta disminución y finalmente un período lento donde muchas de ellas se mantienen viables.

Predecir la duración de la fase inicial es muy importante para la regeneración de accesiones en los bancos de germoplasmas (Walters, 1998; Walters *et al.*, 2004). Sin embargo, los mecanismos exactos que conllevan a la pérdida de la viabilidad de las semillas no están completamente elucidados y la susceptibilidad de la semilla a envejecer varía dentro de las familias y las especies (Walters *et al.*, 2005; Niedzielski *et al.*, 2009; Nagel y Borner, 2010).

La duración de la fase inicial del deterioro de la semilla, depende de la humedad y temperatura durante el almacenamiento, de factores celulares desconocidos (Walters *et al.*, 2005), de la calidad de la semilla, antecedentes genéticos y condiciones ambientales en que se desarrollaron las mismas (Ellis y Roberts, 1980; Walters *et al.*, 2004). Sin embargo, esta es una fase asintomática difícil de medir (Mira *et al.*, 2010).

La cinética sigmoidal de deterioro de la semilla es indicativa de reacciones autocatalíticas o cooperadas (Walters, 1998; Walters y Koster, 2007). Este tipo de reacciones es antecedente de materiales viscosos en las semillas secas (Walters y Koster, 2007); la transición del estado del agua, por su parte, un factor que regula la naturaleza y cinética de las reacciones en las semillas secas (Walters *et al.*, 2005).

Las reacciones que ocurren en el interior de las semillas son las mismas que las implicadas en la degradación química: oxidación o peroxidación que ocurre en ausencia o presencia de

enzimas catalíticas (Walters, 1998; McDonald, 1999; Bailly, 2004; Job *et al.*, 2005; Kranner *et al.*, 2006). También la oxidación de macromoléculas puede provocar el escape de compuestos volátiles (Mira *et al.*, 2010).

Aunque se observó una disminución en el porcentaje de germinación de las semillas crioconservadas después de seis meses de almacenamiento, estas conservaron un porcentaje de germinación cercano al 90% hasta el final del tiempo de evaluación, lo que demuestra que, aun cuando los procesos de deterioro en las semillas ocurren irremediablemente, la crioconservación hace más lento el proceso. Day *et al.* (1997, 1998), informaron resultados similares al analizar la viabilidad de algas crioconservadas por más de 20 años y observar que la crioconservación produce una mayor conservación de la viabilidad.

Walters *et al.* (2004, 2005) realizaron uno de los estudios más significativos de longevidad en germoplasmas crioconservados. Estos autores informan sobre cambios medibles en la germinación de semillas secas en NL por más de 10 años. Demostraron que existe variabilidad en el deterioro entre las especies y en accesiones dentro de una misma especie. Ellos afirman que la longevidad de las semillas puede superar tiempos mayores a los 500 años; aunque, también concluyen que el almacenamiento a temperaturas criogénicas no es suficiente para parar el deterioro, principalmente si el estado inicial de envejecimiento ocurre a temperaturas mayores de almacenamiento antes de ser colocadas en NL.

El estudio de los mecanismos de envejecimiento de las semillas y la determinación de indicadores de calidad pueden salvar enormes cantidades de tiempo, esfuerzo y materiales en los bancos de germoplasma (Stanwood, 1985), preservando de esta forma la biodiversidad genética.

Además de los antecedentes antes descritos, la respuesta en la germinación de las semillas está relacionada, entre otros factores, con la forma y el color de la testa, la cual tiene una función protectora, ayuda a la dispersión, en el control de la germinación y constituye una barrera contra el daño físico y la luz ultra violeta. Algunas especies muestran dormancia impuesta por la testa, producto que es impermeable al agua o el oxígeno. Estas propiedades de la testa están relacionadas con su composición (Baskin *et al.*, 1998).

Numerosos autores han analizado la influencia que existe entre el color, la temperatura y el contenido de humedad de la semilla con la dormancia y la pérdida de la viabilidad (Puga-Hermida *et al.*, 2003; Mira *et al.*, 2005; 2011), así como las condiciones de almacenamiento. Sin embargo, se tienen pocas referencias de la relación entre el color de la semilla y la crioconservación, por lo que resulta de interés analizar cómo responden diferentes genotipos de frijol a la crioconservación.

4.4. Determinación del efecto de la crioconservación en la germinación de diferentes genotipos de frijol

El resultado del experimento corroboró que la crioconservación no afectó la viabilidad, pues no se produjeron variaciones en el porcentaje de germinación de las semillas en ninguno de los 15 genotipos objetos del análisis (fig. 29). En todos los casos se presentaron valores superiores al 90%, y no se observó diferencias significativas con aquellas del tratamiento control (semillas no crioconservadas).

La heterogeneidad de las semillas, definida como la producción de diferentes tipos de semillas por un individuo, aparece en muchas especies de angiospermas (Matilla *et al.*, 2005). La heterogeneidad morfológica está dada en el tamaño, forma y color (Baskin y Baskin, 1998), y puede afectar las propiedades fisiológicas de las semillas, la dormancia

(Duran y Retamal, 1989), la germinación (Puga-Hermida *et al.*, 2003) y la longevidad (Diederichsen y Jones-Flory, 2005).

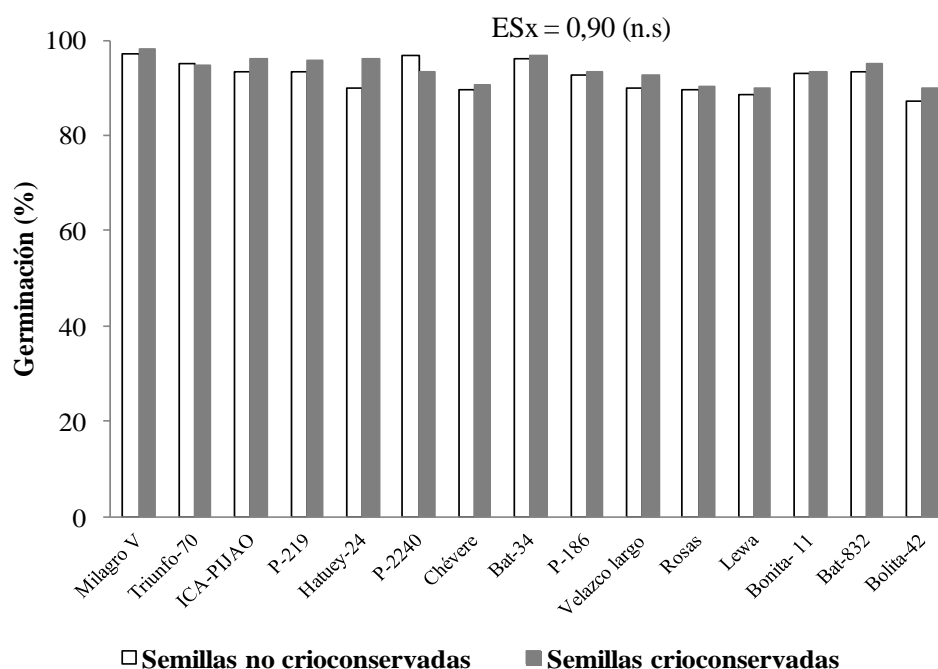


Fig. 29. Germinación de semillas de diferentes genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (t-test, $p \leq 0,05$, $n=15$). ESx= error estándar de la media.

La respuesta germinativa de las semillas también está relacionada con la forma, el tamaño o el color de la testa en muchas especies (Mira *et al.*, 2011). Además, la testa de la semilla tiene una función de protección, ayuda a la dispersión y en el control de la germinación, y constituye una barrera contra el daño físico y de los rayos ultra violetas (Bewley y Black, 1985). Las características físico-químicas de la testa de las semillas también están relacionadas con su protección frente a condiciones de estrés ambiental durante el tiempo de almacén (Debeaujon *et al.*, 2000).

No obstante, existen criterios diversos en cuanto a la relación del color de la testa de las semillas y su capacidad para germinar. Estudios de viabilidad realizados en semillas de *Spergularia diandra* (Guss) de diferentes colores (negro, marrón y amarillo) muestran diferentes niveles de dormancia (Gutterman, 1994a,b). En contraste, Doucet y Cavers (1997), realizaron estudios que relacionan el color de la testa de las semillas de cardo (*Cirsium vulgare* L.) con su capacidad germinativa y encontraron que, a pesar de las variaciones en el color de las semillas, la proporción de semillas dormantes no parece estar asociada con este factor.

Nasar-abbas *et al.* (2009) señalaron que las condiciones de almacén influyen grandemente en la estabilidad del color de algunas semillas de leguminosas como las de *Vicia faba*. Estos autores refieren que en este cultivo las semillas se oscurecen rápidamente y disminuye el contenido de fenoles cuando se almacenan en condiciones de altas temperaturas, humedad e intensidad lumínica.

En otras leguminosas, sin embargo, la temperatura, la humedad relativa, el contenido de humedad de las semillas, y la luz son los principales factores que afectan la estabilidad del color durante el período de almacén. Temperaturas superiores a 24°C y humedad relativa por encima de 80% aceleran el oscurecimiento de semillas de frijol común (Reyes Moreno *et al.*, 2000), mientras que bajas temperaturas y humedad relativa del 30% retienen el color original de las semillas.

La imbibición de las semillas está también relacionada con la permeabilidad y el color (Huang *et al.*, 1983; Powell *et al.*, 1986; Powell 1989; Arnold *et al.*, 1992; Puga-Hermida *et al.*, 2003) y, por tanto, influyen en la capacidad germinativa de las mismas. Estudios

realizados en semillas de *Sorghum halepense* L. por Benech-Arnold *et al.* (1992), demuestran que esta especie produce semillas no pigmentadas y con menos dormancia cuando se desarrollan en condiciones de secano. Por su parte, Khan *et al.* (1997) encuentran una disminución de la imbibición y la germinación en semillas oscuras de *Panicum miliaceum* L., las cuales correlacionan con las de mayor vigor. Por último, Powel (1989) informa sobre la disminución en el vigor de semillas no coloreadas de *Phaseolus* cuando las compara con semillas coloreadas.

Concluido el experimento, los resultados indican que los 15 genotipos que se seleccionaron para el análisis respondieron bien a la crioconservación, independientemente del color de la semilla. Esto puede ser un punto de partida para la aplicación de la crioconservación en los bancos de germoplasma de frijol, donde existe una amplia variedad de genotipos con diferencias marcadas en el color y el tamaño de las semillas.

No obstante los resultados obtenidos hasta aquí y aun cuando se ha demostrado la efectividad biológica del método de crioconservación de las semillas de frijol, se hace necesario realizar un análisis del efecto económico antes de recomendar el empleo de la misma en los bancos de germoplasma que resguarda una amplia diversidad del cultivo.

4.5. Análisis del efecto económico de la crioconservación de semillas de frijol

En la tabla 10 aparece el análisis del efecto económico que resulta de aplicar la crioconservación a semillas de frijol. El resultado fue del 68%, calculado como sigue: $(16,63 - 5,50) / 16,63 * 100$.

Tabla 10. Análisis del efecto económico de la crioconservación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Milagro Villareño.

Costo de la crioconservación en un año		
Elementos	Parcial	Importe
Materiales directos		\$ 55,00
NL	\$ 25,00	
Reposición de N (5 L.mes ⁻¹)	<u>30,00</u>	
Salario directos y otros		7 088,67
Costo directo total		<u>\$7 143,67</u>
Costo de la tecnología tradicional (en frigorífico) en un año		
Elementos	Parcial	Importe
Energía		\$ 360,00
Salario directos y otros		21 264,00
Costo directo total		<u>\$21 624,00</u>
Efecto económico para una producción de 1300 semillas conservadas anualmente		
Elementos	Crioconservación	Tradicional
Costo directo total	<u>\$7 143,67</u>	<u>\$21 624,00</u>
Costo unitario	<u>\$ 5,50</u>	<u>\$ 16,63</u>
Efecto económico	68,0%	

Se considera efecto económico anual de una innovación, invención o racionalización, el ahorro total de todos los recursos de la producción (humano, material y financiero) o el incremento de las ganancias, que es aportado a la economía nacional, como resultado de la introducción de las mismas y su manifestación finalmente en el incremento de la renta nacional (Jaramillo *et al.*, 2001).

El efecto económico es un indicador que se mide mediante el incremento de los beneficios o utilidades o por el ahorro, y puede ser considerado el margen de seguridad de la nueva tecnología. Mientras mayor resulta este, será indicativo de menor riesgo. El costo es la expresión monetaria de los gastos incurridos para producir un bien o un servicio (Horngreen, 2007) y es un indicador de resultado que generaliza la eficiencia con que se desempeña cualquier organización o estructura.

La criopreservación constituye una tecnología avanzada para la conservación de semillas. Para medir su eficiencia es necesario no solo valorar los desembolsos que la misma genera, sino que resulta adecuada su comparación con las técnicas tradicionales de conservación. También pueden ser considerados otros indicadores de carácter no financiero que justifican la viabilidad de la propuesta y que agregan valor a los productos resultantes de la tecnología propuesta, tales como mínimo deterioro y fácil manipulación, ocupa poco espacio y es de fácil movilidad, se reducen las causas de variabilidad genética, no tiene que ser sometida a test de germinación sistemáticos, y no genera afectaciones que permitan el deterioro progresivo de las semillas.

Por otro lado, no se considera prudente evaluar la inversión por el carácter operativo de la misma, es decir, no requiere construcción, y el montaje se realiza en un período corto, no genera flujos de efectivo, y los desembolsos para la compra del tanque y de una nevera de proporciones similares no tienen diferencias de relevancia.

Resultados similares a los que se obtuvieron en este trabajo son informados por Dulloo *et al.* (2009) quienes demuestran la efectividad de la criopreservación como método de conservación a largo plazo como alternativa o complemento en los bancos de germoplasma.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que las semillas de frijol pueden ser utilizadas como modelo para caracterizar los efectos de la criopreservación en procesos de germinación, crecimiento y desarrollo de plantas de semillas ortodoxas, y garantiza que la conservación aun cuando produce variabilidad en algunos indicadores bioquímicos relacionados con el estrés, éstas no son suficientes para producir variaciones morfo-agronómicas ni genéticas en las plantas. Además de tener un alto efecto económico, lo que lo hace factible para su empleo como técnica de conservación a largo plazo.

5. CONCLUSIONES

- 1) La crioconservación de las semillas de frijol produce variabilidad en los indicadores bioquímicos, pero no influye en el porcentaje de germinación.
- 2) Fueron en las raíces donde se manifestó el mayor efecto producto de la crioconservación de las semillas.
- 3) A pesar de las variaciones en los indicadores bioquímicos en etapas tempranas de la germinación, no se produjeron variaciones morfo-agronómicas en las plantas ni alteraciones apreciables en la región del ADN evaluado.
- 4) La viabilidad de las semillas que se almacenaron a 4°C fue significativamente menor que las crioconservadas después de transcurrido los primeros seis meses del experimento.
- 5) Todos los genotipos seleccionados respondieron bien a la crioconservación, con una germinación superior al 90% y sin diferencias a las semillas no crioconservadas.
- 6) El análisis de factibilidad económica de la aplicación de la crioconservación de semillas de frijol determinó un efecto económico del 68%, lo que lo hace factible para su empleo como técnica de conservación a largo plazo.

6. RECOMENDACIONES

- 1) Continuar el estudio del efecto de la criopreservación en relación con otros indicadores bioquímicos como los relacionados con el estrés oxidativo.
- 2) Tener en cuenta los resultados como referencia para interpretar la respuesta fisiológica en la aplicación de la criopreservación de otras semillas ortodoxas.
- 3) Incorporar los resultados obtenidos en futuras investigaciones relacionadas con la conservación del frijol.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albertini, E., Torricelli, R., Bitocchi, E., Raggi, L., Marconi, G., Pollastri, L., Veronesi, F. (2011). Structure of genetic diversity in *Olea europaea* L. cultivars from central Italy. *Molecular Breeding*, 27(4), 533-547.
2. Al-Sobhi, O. A., Al-Zahrani, H. S., Al-Ahmadi, S. B. (2005). Effect of salinity on chlorophyll & carbohydrate contents of *Calotropis procera* seedlings. *King Fasil University J*, 7, 105-115.
3. Arnold, R. B., Fenner, M., Edwards, P. J. (1992). Changes in dormancy level in *Sorghum halepense* seeds induced by water stress during seed development. *Functional Ecology*, 596-605.
4. Asfaw, A., Blair, M., Almekinders, C. (2009). Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the East African highlands. *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 1-12.
5. Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14(02), 93-107.
6. Baskin, J. M., Nan, X., Baskin, C. C. (1998). A comparative study of seed dormancy and germination in an annual and a perennial species of *Senna* (*Fabaceae*). *Seed Science Research*, 8(4), 501-512.
7. Bazin, J., Batlla, D., Dussert, S., El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C. (2011). Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower seeds during dry after-ripening. *Journal of Experimental Botany*, 62(2), 627-640. doi:10.1093/jxb/erq314.
8. Beebe, S., Rengifo, J. Gaitán, E. Duque, M. C. Tohme, J. (2001). Diversity and origin of Andean landraces of common bean. *Crop Science*, 41, 854-862.

9. Benchimol, L. L., Souza Jr, C. L. D., Souza, A. P. D. (2005). Microsatellite-assisted backcross selection in maize. *Genetics and Molecular Biology*, 28(4), 789-797.
10. Benech-Arnold, R. L., Fenner, M., Edwards, P. J. (1992). Changes in dormancy level in *Sorghum halepense* seeds induced by water-stress during seed development. *Functional Ecology*, 6, 596-605.
11. Benson, E. E. (2008). Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical reviews in plant sciences*, 27(3), 141-219.
12. Benson, E. E., Bremner, D. (2004). Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. *Life in the frozen state. CRC Press, Boca Raton*, 206-241.
13. Berjak, P., Bartels, P., Benson, E. E., Harding, K., Mycock, D. J., Pammenter, N. W., Wesley-Smith, J. (2011). Cryoconservation of South African plant genetic diversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 47(1), 65-81.
14. Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9(7), 1055-1066.
15. Blair, M.W. (2010). Diversidad de frijol común cultivado. Herramientas genómicas para el mejoramiento del frijol. *Curso-Taller. Programa Genoma-CYTED. La Antigua Guatemala. Guatemala; 19 al 23 de julio del 2010.*
16. Blair, M. W., Díaz, L. M., Buendía, H. F., Duque, M. C. (2009). Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 119(6), 955-972.
17. Blair, M. W., Pantoja, W. D., Hidalgo, R. (2007). Diversidad de faseolina en frijol común cultivado del Caribe. *Acta Agronomía*, 56(4), 171- 176.
18. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Annual Biochemical*, 72, 248-254.

19. Campos, T., Oblessuc, P. R., Sforça, D. A., Cardoso, J. M. K., Baroni, R. M., de Sousa, A. C. B., de Souza, A. P. (2011). Inheritance of growth habit detected by genetic linkage analysis using microsatellites in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 27(4), 549-560.
20. Cardoso, F., Pita, J.M., Gomes, J.P. (2000). Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. *Revista Brasileira de Productos Agroindustriais, Campina Grande*, 2(1), 67-71.
21. Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., Panis, B. (2005). Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5(10), 2497-2507.
22. Carpentier, S., Witters, E., Laukens, K., Swennen, R., Panis, B. (2006). 128. Proteome research of banana meristems to study cryoprotection. *Cryobiology*, 53(3), 422.
23. Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Van Onckelen, H., Swennen, R., Panis, B. (2007). Banana (*Musa* spp.) as a model to study the meristem proteome: acclimation to osmotic stress. *Proteomics*, 7(1), 92-105.
24. Castillo, N.R., Bassil, N. V., Wade, S., Reed, B. M. (2010). Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 46(3), 246-256.
25. Castiñeiras, L. (1992). Estudio de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en Cuba: Colecta, Caracterización.- Tesis (Doctor en Ciencias Agrícolas) INIFAT, La Habana p 100.

26. Chang, Y., Reed, B. M. (2000). Extended alternating-temperature cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. *Cryobiology*, 40(4), 311-322.
27. Chen, L., Zhao, Z., Liu, X., Liu, L., Jiang, L., Liu, S., Wan, J. (2011). Marker-assisted breeding of a photoperiod-sensitive male sterile japonica rice with high cross-compatibility with indica rice. *Molecular Breeding*, 27(2), 247-258.
28. Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J. K. (2006). Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*, 126 (1), 52-61.
29. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). (1981). Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. En: A. van Schoonhoven y Pastor-Corrales, M. A.(eds.) Palmira, Colombia p 56.
30. Companioni, B., Mora, N., Díaz, L., Pérez, A., Arzola, M., Espinosa, P., Hernández, M., Ventura, J., Pérez, M.C., Santos, R., Lorenzo, J. C. (2005). Identification of discriminant factors after treatment of resistant and susceptible banana leaves with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense culture filtrates. *Plant Breeding*, 123, 1-8.
31. Corbineau, F., Picard, M. A., Fougereux, J. A., Ladonne, F., Côme, D. (2000). Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. *Seed Science Research*, 10(03), 329-339.
32. Corbineau, F., Gay-Mathieu, C., Vinel, D., Come, D. (2002). Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. *Physiology Plant*, 116, 489-496.
33. Cornide, M. T. (2002). Marcadores moleculares, nuevos horizontes en la genética y la selección de plantas, Editorial Felix Varela. 202 p.

34. Costa, G., Spitz, E. (1997). Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. *Plant Science*, 128, 131-140.
35. Côte, F., Goue, O., Domergue, R., Panis, B., Jenny, C. (2000). In field behaviour of banana plants (*Musa AA sp*) obtained after regeneration of cryopreserved embryogenic cell suspensions. *Cryoletters*, 21(1), 19-24.
36. Criel, B., Carpentier, S., Renaut, J., Panta, A., Swennen, R., Panis, B., & Hausman, J. F. (2005). Cryopreservation and abiotic stress tolerance in potato: a proteomic approach. In *COST 843 final conference/COST 843 and COST 851 joint meeting*. p 1-263.
37. Dasgupta, J., Bewley, J. D., Yeung, E. C. (1982). Desiccation-tolerant and desiccation-intolerant stages during the development and germination of *Phaseolus vulgaris* seeds. *Journal of Experimental Botany*, 33, 1045-57.
38. Day, J. G., Fleck, R. A., Benson, E. E. (1998). Cryopreservation of multicellular algae: problems and perspectives. *CryoLetters*, 19, 205-206.
39. Day, J. G, Benson, E., Fleck, R. A. (1999). *In vitro* culture and conservation of microalgae: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 35, 127-136.
40. Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K. M., Koornneef, M. (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122(2), 403-414.
41. Debouck, D. G. (1994). Beans (*Phaseolus spp.*). En: *Plant Production and Protection*. J. E. Hernándo Bermejo & J. León (eds.), *Neglected Crops: 1492 from a different perspective*. Series 26. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. p 47-62.

42. Delgado-Salinas, A. (1985). Systematic of the genes *Phaseolus* (*Leguminosae*) in North y Central America. PhD Thesis; University of Texas; Austin; Texas; USA, 363 pp.
43. Delgado-Salinas, A., Bibler, R., Matt, J. (2006). Phylogeny of the genus *Phaseolus* (*Leguminosae*): A recent diversification in an Ancient Lyscape. *Systematic Botany*, 31(4): 779 – 791.
44. Dhanaraj, A. L., Alkharouf, N. W., Beard, H. S., Chouikha, I. B., Matthews, B. F., Wei, H., Rowland, L. J. (2007). Major differences observed in transcript profiles of blueberry during cold acclimation under field and cold room conditions. *Planta*, 225(3), 735-751.
45. Díaz, L. M., Blair, M. W. (2006). Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(1), 143-154.
46. Diederichsen, A., Jones-Flory, L. L. (2005). Accelerated aging tests with seeds of 11 flax (*Linum usitatissimum*) cultivars. *Seed Science Technology*, 33:419-429.
47. Dinelli, G., Bonetti, A., Minelli, M., Marotti, I., Catizone, P., Mazzanti, A. (2006). Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food Chemistry*. 99, 105–114. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.028.
48. Doucet, C., Cavers, P. B. (1997). Induced dormancy and colour polymorphism in seeds of the bull thistle *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. *Seed Science Research*, 7(4), 399-408.
49. Dueñas, M., Fernández, D., Hernández, T., Estrella, I., Muñoz, R. (2005). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L.). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 *Journal of Science and Food Agriculture*, q 85, 297-304.

50. Dulloo, M. E., Ebert, A. W., Dussert, S., Gotor, C., Astorga, C., Vazquez, N., Rakotomalala, J. J., Rabemiafara, A., Eira, M., Bellachew, B., Omondi, C., Engelmann, F., Anthony, F., Watts, J., Qamar, Z., Snook, L. (2009). Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for Coffee genetic resources. *Crop Science*, 49, 2123-2138.
51. Dumet, D., Benson, E. E. (2000). The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. En: *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. Engelmann, F., Takagi, H., (eds.) Rome, Tsukuba: JIRCAS, IPGRI: p 43-56.
52. Duran, J. M., Retamal, N. (1989). Coat Structure and Regulation of Dormancy in *Sinapis arvensis* L. Seeds. *Journal of plant physiology*, 135(2), 218-222.
53. Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H. (1990a). An intermediate category of seed behaviour? 1. *Coffee*. *Journal of Experimental Botany*, 41, 1167-1174.
54. Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H., Tao, K. L. (1990b). Low moisture limits to relations between seed longevity and moisture. *Annals of Botany*, 65, 493-504.
55. Engelmann, F. (1992). Cryopreservation of embryos. In *Reproductive biology and plant breeding*. Springer Berlin Heidelberg. 281-290.
56. Engelmann, F. (1997a). Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genet Resour Newsl*, 112, 9-18.
57. Engelmann, F. (1997b). *In vitro* conservation methods. En: *Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use*. Ford-Lloyd B. V.; Newbury J. H.; Callow J. A. (eds.) CABI, Wellingford, p 119-162.

58. Engelmann, F. (2000). Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En Engelmann F.; Takagi H. (eds.) Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and applications. JIRCAS, Tsukuba, p 8-20.
59. Engelmann, F. (2004). Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 40, 427-433.
60. Engelmann, F. (2010). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. Review. doi: 10.1007/s11627-010-9327-2.
61. Engelmann, F., Ramanatha Rao. V. (2012). Major research challenges and directions for future research. En: *Conservation of Tropical Plant Species*. M.N. Normah, H.F. Chin and B.M. Reed (eds.). *Springer Verlag*, Berlin. In press.
62. Ericson, M. C., Alfinito, S. H. (1984). Proteins produced during salt stress in Tobacco cell culture. *Plant Physiology*, 74, 506-509.
63. Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A., Meryman, H. T. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21, 407-426.
64. Faivre-Rampant, O., Kevers, C., Gaspar, T. (2000). IAA-oxidase activity and auxin protectors in non-rooting, rac mutant shoots of tobacco *in vitro*. *Plant Science*, 153, 73-80.
65. FAOSTAT (2012). "FAO Statistics Division". Disponible en URL: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Visitado 18 de Abril de 2013).
66. Finkelstein, R. R, Reeves, W., Ariizumi, T., Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review Plant Biology*, e 59, 387- 415.

67. Fleck, R. A., Day, J. G., Clarke, K. J., Benson, E. (1999). Elucidation of the metabolic and structural basis for the cryopreservation recalcitrance of *Vaucheria sessilis*, Xanthophyceae. *CryoLetters*, 20, 271–282.
68. Fleck, R. A., Benson, E., Bremner, D. H., Day, J. G. (2000). Studies of free radical-mediated cryoinjury in the unicellular alga *Euglena gracilis* using a non-destructive hydroxyl radical assay: A novel approach for developing protistan cryopreservation strategies. *Free Radical Research*, 32, 157–170.
69. Fleck, R. A., Benson, E., Bremner, D. H., Day, J. G. (2003). A comparative study of antioxidant protection in the cryopreserved unicellular algae *Euglena gracilis* and *Haematococcus pluvialis*. *CryoLetters*, 24, 213–228.
70. Forni, C., Braglia, R., Beninati, S., Lentini, A., Ronci, M., Urbani, A., Provenzano, B., Frattarelli, A., Tabolacci, C., Damiano, C. (2010). Polyamine concentration, transglutaminase activity and changes in protein synthesis during cryopreservation of shoot tips of apple variety Annurca. *CryoLetters*, 31(5), 413-425.
71. Foroni, I., Rao, R., Woeste, K., Gallitelli, M. (2005). Characterization of *Juglans regia* L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the ‘Sorrento’ landrace. *Journal Horticulture Science Biotechnology*. 80, 49-53.
72. Frankel, E. N. (1983). Volatile lipid oxidation-products. *Progress in Lipid Research*, 22, 1-33.
73. Franklin, C. J., Sudheer Mohammed, M. M. Thomas, G., Varghese, G., Selvaraj, N., Dorai, M. (2009). Genetic diversity and conservation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., *Fabaceae*) landraces in Nilgiris. *Current Science*, 9(2), 227-235.
74. Fundora, Z., Castiñeiras, L., Shagarodsky, T., Barrios, O., Fernández, L., Moreno, V., Cristóbal, R., García, M., Giraudy, C., Hernández, F., Arzola, D., de Armas, D.,

- García, R., Fuentes, V. (2007). Destinos de la producción de diferentes cultivos en fincas rurales de dos zonas de Cuba. *Agrotecnia de Cuba*, 31(2), 269-275.
75. Garcia, A., Calvo, E. S., Kiihl, R. A. S., Souto, E. R. (2011). Evidence of a susceptible allele inverting the dominance of rust resistance in soybean. *Crop Science*, 51, 32-40.
76. Gepts, P. (1988). A middle American and an Andean common bean pool. In: ed. P. Gepts, Genetic Resources of Phaseolus Beans. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 375-390.
77. Gepts, P., Bliss, F. A. (1988a). Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris* Fabaceae) deduced from phaseolin electroforetic variability. II Europe and Africa. *Economic Botany*, 42 (1), 86-104.
78. Gepts, P., Kmiecik, K., Pereira, P., Bliss, F.A. (1988b). Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris* Fabaceae) deduced from phaseolin electroforetic variability. *The Americas Economic Botan.*, 42 (1), 73-85.
79. Gepts, P., Beavis, W., Brummer, E., Shoemaker, R., Stalker, H., Weeden, N., Young, N. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross legume advances through genomics conference. *Plant Physiology*, 137, 1228-1235.
80. FAOSTAT (2012). “FAO Statistics Division”. Disponible en URL: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Visitado 18 de Abril de 2012).
81. Gomez-Pando, L. R., Jiménez-Dávalos, J., Eguiluz, A., Aguilar- Castellanos, E., Falconi-Palomino, J., Ibañez-Tremolada, M., Varela, M., Lorenzo, J. C. (2008). Field performance of new in vitro androgénesis – derived double haploids of barley. *Euphytica*. doi: 10.1007/s10681-008-9840-0.

82. Gonçalves-Vidigal, M. C., Benchimol, L. (2011). Development and application of microsatellites in plant breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 1, 66-72.
83. Granito, M., Paolini, M., Perez, S. (2008). Polyphenols and antioxidant capacity of *Phaseolus vulgaris* stored under extreme conditions and processed. *LWT*. 41, 994-999. doi:10.1016/j.lwt.2007.07.014.
84. Gray, G. R., Heath, D. (2005). A global reorganization of the metabolome in *Arabidopsis* during cold acclimation is revealed by metabolic fingerprinting. *Physiology Plant*, 124, 236–248.
85. Greaves, J. A. (1996). Improving suboptimal temperature in maize: The search for variation. *Journal Experimental Botan.*, 47, 307-323.
86. Grosch, W. (1987). Reactions of hydroperoxides: products of low molecular weight. En: *Autoxidation of unsaturated lipids*. Chan, H. W. S. (ed.). London: Academic Press Inc., p 95–139.
87. Guan, R., Chang, R., Li, Y., Wang, L., Liu, Z., Qiu, L. (2010). Genetic diversity comparison between Chinese and Japanese soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) revealed by nuclear SSRs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57, 229-242.
88. Gurr, S., McPherson, J., Bowles, D. (1992). Lignin and associated phenolic acids in cell walls. In D. L. Wilkinson, ed. *Molecular Plant Pathology*. Oxford Press, Oxford. p. 51-56.
89. Gutterman, Y. (1994a). Long-term seed position influences on seed germinability of the desert annual, *Mesembryanthemum nodiflorum* L. *Israel Journal Plant Science*, 42, 197-205.
90. Gutterman, Y. (1994b.) Strategies of seed dispersal and germination in plants inhabiting deserts. *Botany. Review*, 60, 373-425.

91. Hamid, N., Bukhari, N., Jawaid, F. (2010). Physiological responses of *Phaseolus vulgaris* to different lead concentration. *Pakistan Journal Botany*, 42(1), 239–246.
92. Hannah, M. A., Heyer, A. G., Hinch, D. K. (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 1, 0179–0196.
93. Harding, K. (2004). Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A Review *CryoLetters*, 25, 3-22.
94. Harding, K. (2010). Plant and algal cryopreservation: issues in genetic integrity, concepts in cryobionomics and current applications in cryobiology. *Journal Molecular Biology. Biotechnology*, 18(1), 151-154.
95. Harding, K., Benson, E. E., Clacher, K. (1997). Plant conservation biotechnology: an overview. *Agro food Industry*, 8(3), 24-29.
96. Harding, K., Benson, E. E. (2001). The use of microsatellite analysis in *Solanum tuberosum* L. *in vitro* plantlets derived from cryopreserved germplasm. *CryoLetters*, 22: 199–208.
97. Harding, K., Johnston, J. W., Benson, E. (2009). Exploring the physiological basis of cryopreservation success and failure in clonally propagated *in vitro* crop plant germplasm. *Agricultural and Food Science*, 18, 103-116.
98. Heath, R., Packer, J. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 125, 189-198.
99. Hernández, A.; Pérez, J.; Bosch, D.; Rivero, L. (1999). Nueva Versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. Editorial AGRINFOR. Educación, La Habana. p 64-71.
100. Hiemstra, S. J.; van der Lende, T.; Woelders, H. (2006). The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources

- conservation strategies. En: Ruane J.; Sonnino A. (eds.) *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*. FAO, Rome, p 45-59.
101. Hilhorst, H.W.M. (1995). A critical update on seed germination. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5, 61-73.
 102. Hilhorst, H.W.M., Toorop, P.E. (1997). Review on dormancy, germinability, and germination in crop and weed seeds. *Advance Agronomy*, 61, 111-165.
 103. Horngreen, C. T., Foster, G., Srikant, M., Datar (2007). Contabilidad de costos: un enfoque gerencial. 12^{va} Edición. En: *Pearson Educación* (ed.). ISBN: 9702607612,9789702607618. p 868.
 104. Hörtensteiner, S. (2006). Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review Plant Biology*, 57, 55-57.
 105. Hörtensteiner, S., Krautler, B. (2011). Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 977- 988.
 106. Huang, G., McCrate, A. J., Varrianomarston, E., Paulsen, G. M. (1983). Caryopsis structural and imbibitional characteristics of some hard red and white wheats. *Cereal Chemical*, 60, 161-165.
 107. Iglesias-Fernández, R., Matilla, A. (2009). After-ripening alters the gene expression pattern of oxidases involved in the ethylene and gibberellin pathways during early imbibition of *Sisymbrium officinale* L. seeds. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1645–1661. doi:10.1093/jxb/erp029.
 108. Igrejas, G., Carnide, V., Pereira, P., Mesquita, F., Guedes-Pinto, H. (2009). Genetic diversity and phaseolin variation in Portuguese common bean landraces. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 7(3), 230–236 doi: 10.1017/S1479262109264124.

109. Iriondo, J. M. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). *Investigación Agrícola: Productos Proegidos*, 16 (1), 5-24.
110. ISTA (2005). International Rules for Seed Testing. Edition 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza. On line. <http://www.seedtest.org>. visitado enero 2012.
111. Jalink, H., Frandas, A., van Der Schoor, R., Bino, J. B. (1998a). Chlorophyll fluorescence of the testa of *Brassica oleracea* seeds as an indicator of seed maturity and seed quality. *Scientia Agrícola*, 55, 88-93.
112. Jalink, H., van Der Scoor, R., Frandas, A., Van Pijlen, J. G. (1998b). Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. *Seed Science Research*, 8, 437- 443.
113. Jaramillo, H., Lugones, G., Salazar, M. (2001). Manual de Bogotá: normalización de indicadores de innovación tecnológica en América Latina y el Caribe [En línea]. Bogotá: RICYT; OEA; CYTED, 2001. [Consulta: 2 de octubre de 2010]. Disponible en:
http://www.ricyt.org/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=5&Itemid=2
114. Job, C., Rajjou, L., Lovigny, Y., Belghazi, M., Job, D. (2005). Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds during germination. *Plant Physiology*, 138, 790-802.
115. Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177, 309-334.
116. Kaplan, L. (1965). Archaeology and domestication in American *Phaseolus*. *Econ. Botany*, 19, 358-368.

117. Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K. C., Gatzke, N., Sung, D., Guy, C. L. (2004). Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136, 4159–4168.
118. Kartha, K. K., Engelmann, F. (1994). Cryopreservation and germplasm storage. En: *Plant cell and tissue culture*. Vasil IK, Thorpe T A (eds.) Kluwer, Dordrecht, p 195-230.
119. Kaur, Ch., Kapoor, H. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, p 153-161.
120. Keller, E. R. J., Kaczmarczyk, A., Senula, A. (2008). Cryopreservation for plant genebanks a matter between high expectations and cautious reservation. *CryoLetters*, 29, 53-62.
121. Kermode, A.R. (2005). Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal Plant Growth Regulator*, 24, 319–344.
122. Kermode, A. R, Bewley, J. D, Dasgupta, J., Misra, S. (1986). The transition from seed development to germination: a key role for desiccation? *HortScience* 21, (special supplement). 1113-18.
123. Keurentjes, J. J. B., Koornneef, M., Vreugdenhil, D. (2008). Quantitative genetics in the age of omics. *Curr. Opin. Plant Biology*, 11, 123-128.
124. Khan, M., Cavers, P.B., Kane, M., Thompson, K. (1997). Role of the pigmented seed coat of prose millet (*Panicum miliaceum* L.) in imbibition, germination and seed persistence. *Seed Science Research*, 7, 21-25.
125. Koenig, R. L., Singh, S. P., Gepts, P. (1990). Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* Fabaceae). *Economy Botanical*, 44, 50-60.

126. Koinange, E.M. K., Gepts, P. (1992). Hybrid weakness in wild *Phaseolus vulgaris* L. *Journal Hered*, 83, 135-139.
127. Konan, E., Durand-Gasselín, T., Koadio, Y. J., Niamké, A. C., Dumet, D., Duval, Y., Rivalm, A., Engelmann, F. (2007). Field development of oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) originating from cryopreserved stabilized polyembryonic cultures (SPCs). *CryoLetters*, 28, 377-386.
128. Kranner, I., Birtic, S., Anderson, K. M., Pritchard, H. W. (2006). Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death?. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 2155-2165.
129. Kuc, J. (1995). Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 22, 275-297.
130. Kucera, B., Leubner-Metzger, G., Wellmann, E. (2003). Distinct ultraviolet-signaling pathways in bean leaves. DNA damage is associated with b-1,3 glucanase gene induction, but not with flavonoid formation. *Plant Physiology*, 133, 1445-1452.
131. Kulus, D., Zalewska, M. (2014). Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species. A review. *Scientia Horticulturae*, 168, 88-107.
132. Latournerie, L., Moreno, V., Fernández, L., Pinedo, R., Tun, J. M., Tuxill, J. (2009). Sistema tradicional de almacenamiento de semillas: Importancia e implicaciones en la conservación de la agrobiodiversidad. En: Michael Hermann, Karen Amaya, Luis Latournerie, Leonor Castiñeiras (eds.). *¿Cómo conservan los agricultores sus semillas en el trópico húmedo de Cuba, México y Perú? Experiencias de un proyecto de investigación en sistemas informales de semillas de Chile, frijoles y maíz*. p 61- 72.
133. Latha, S., Daniel, M. (2001). Phenolic antioxidants of some common pulses. *Journal of Food Science and Technology*, 38, 272-273.

134. Layne, R. E. C. (1992). Breeding cold hardy peaches and nectarines. *Plant Breed Review*, 10, 271-308.
135. Leymarie, J., Vitkauskaitė, G., Hoang, H., Gendreau, E., Chazoule, V., Meimoun, P., Corbineau, F., Bailly, C. (2012). Role of reactive oxygen species in the regulation of Arabidopsis seed dormancy. *Plant Cell Physiology*, 53(1), 96-106.
136. Linington, S. H., Pritchard, H. W. (2001). Genebanks, En S. Levin (ed). *Encyclopedia of Biodiversity*, Vol. 3. Academic Press, San Diego, CA. p 165-18.
137. Linkies A, Graeber K, Knight C, Leubner-Metzger G. 2010. The evolution of seeds. *New Phytologist*, 186, 817–831.
138. Matilla, J. M. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ascón-Bieto J; Talón M (eds.) p 537-558.
139. Matilla, A. J., Gallardo, M., Puga-Hermida, M. I. (2005). Structural, physiological and molecular aspects of heterogeneity in seeds: a review, *Seed Science Research*, 15, 63-76.
140. Matilla, A. J. Matilla-Vázquez, M. A. (2008). Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Science*, 175, 87–97.
141. Martínez-Montero, M. E., Mora, N., Quiñones, J., González-Arno, M. T., Engelmann, F., Lorenzo, J. C. (2002). Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane (*Saccharum* sp.) embryogenic calluses. *CryoLetters*, 23, 237-244.
142. Martínez-Montero, M. E., González-Arno, M. T., Torres, M. A., García, L., Fundora, Z. (2013). Desarrollo de la crioconservación de las plantas en Cuba. En: González-Arno M. T., Engelmann, F. (eds.). *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe*, p 128- 144.

143. Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and applications. *American Journal Physiology*. 247 (Cell Physiology 16): 125-142.
144. McClean, P., Mamidi, S., McConnell, M., Chikara, S., Lee, R. (2010). Synteny mapping between common bean and soybean reveals extensive blocks of shared loci. *BMC Genomics*, 11, 178-184.
145. McDonald, M. B. (1999). Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, 27, 177-237.
146. Menon, A., Funnekotter, B., Kaczmarczyk, A., Bunn, E., Turner, S., Mancera, R. L. (2014). Cold-induced changes affect survival after exposure to vitrification solution during cryopreservation in the south-west Australian Mediterranean climate species *Lomandra sonderi* (Asparagaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* doi:10.1007/s11240-014-0538-9.
147. Merritt, D. J., Senaratna, T., Touchell, D.H., Dixon, K.W., Sivasithamparam, K. (2003). Seed ageing of four Western Australian species in relation to storage environment and seed antioxidant activity. *Seed Science Research*, 13, 155-165.
148. Mira, S., González-Benito, M. E., Hill, L. M., Walters, C. (2010). Characterization of volatile production during storage of lettuce (*Lactuca sativa*) seed. *Journal of Experimental Botany*, 61(14), 3915-3924.
149. Mira, S., González-Benito, M. E., Ibars, A. M., Estrelles, E. (2011). Dormancy release and seed ageing in the endangered species *Silene diclinis*. *Biodivers Conserv.* 20, 345-358. doi: 10.1007/s10531-010-9833-x.
150. Mix-Wagner, G., Schumacher, H. M., Cross, R. J. (2003). Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen. *CryoLetters*, 24, 33-41.

151. Mohan, B. S., Hosetti, B. B. (1997). Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* L. growth in sewage stabilization ponds. *Environment Pollution*, 98, 233-236.
152. Mora, A. (1997). Origen e importancia del cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía de Maracay*, 23, 225-234.
153. Morrison, N., Cochrane, G., Faruque, N., Tatusova, T., Tateno, Y., Hancock, D., Field, D. (2006). Concept of sample in OMICS technology. *OMICS Journal Integral Biology*, 10, 127-137.
154. Müller, J., Day, J.G., Harding, K., Hepperle, D., Lorenz, M., Friedl, T. (2007). Assessing genetic stability of a range of terrestrial microalgae after cryopreservation using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *American Journal Botany*, 94(5), 799-808.
155. Muñoz, G., Giraldo, G., de Soto, J.F. (1993). Descriptores varietales: Arroz, frijol, maíz, sorgo. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. p 169.
156. Nagel, M., Borner, A. (2010). The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Science Research*, 20, 1-12.
157. Nasar-abbas, S. M., Siddique, K. H. M., Plummer, J. A., White, P. F., Harris, D., Dods, K., Antuono, M. D. (2009). LWT - Food Science and Technology Faba bean (*Vicia faba* L.) seeds darken rapidly and phenolic content falls when stored at higher temperature, moisture and light intensity. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1703-1711.
158. Niedzielski, M., Walters, C., Luczak, W., Hill, L. M., Wheeler, L. J., Puchalski, J. (2009). Assessment of variation in seed longevity within rye, wheat and the intergeneric hybrid triticale. *Seed Science Research*, 19, 213-224.

159. Nonogaki, H., Bassel, G. W., Bewley, J. D. (2010). Germination stills a mystery. *Plant Science*, 179, 574–581.
160. Onyilagha, J. C., Elliott, B. H., Buckner, E., Okiror, S. O., Raney, P. J. (2011). Seed Chlorophyll Influences Vigor in Oilseed Rape (*Brassica napus* L. var AC Excel.). *Journal of Agricultural Science*, 3(2), 73-79.
161. Oomah, B. D., Cardador, A., Loarca, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 935-942.
162. Palma, (2002). Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: rol of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistr*, 40(6-8), 521-350.
163. Palonen, P., Buszard, D. (1997). Current state of cold hardiness research on fruit crops. *Journal of Plant Science*, 77, 399-420.
164. Panis, B., Lambardi, M. (2006). Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). En: *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources. The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*. Ruane J.; Sonnino A. (eds.) FAO, Rome, p 61-78.
165. Parr, A. J., Bolwell, G. P. (2000). Review, phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of Science and Food Agriculture*, 80, 982-1012.
166. Pérez, C. (2005). Técnicas estadísticas con SPSS 12. Aplicaciones al análisis de datos. *Pearson Educación S. A.*, España. p. 10-85.
167. Pérez, G., Yanez, E., Mboghli, A., Valle, B, Sagarra, F., Yabor, L., Aragón, C., González-Olmedo, J., Isidró, M., Lorenzo, J. C. (2012). New Pineapple Somaclonal Variants: P3R5 and Dwarf. *American Journal Plant Science*, 3, 1-11.

168. Polimeni, R. S., Fabozzi, F. J., Adelberg, A. H., Kole, M. A. (2002). Naturaleza, Conceptos y Clasificación de la Contabilidad de Costos. En: Suárez M. S. (ed.). *Contabilidad de Costos: Conceptos y Aplicaciones para la toma de decisiones gerenciales*. 3^{ra} Edición. ISBN: 958-600-195-4. p 1-28.
169. Porra, R. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, 73, 149-156.
170. Powell, A. A. (1989). The importance of genetically-determined seed coat characteristics to seed quality in grain legumes. *Annual Botany*, 63, 169-175.
171. Powell, A. A., Oliveira, M. D., Matthews, S. (1986). The role of imbibition damage in determining the vigor of white and colored seed lots of Dwarf French beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal Experimental Botany*, 37, 716-722.
172. Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M., Jikumaru, Y. (2009). Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant Cell Physiology*, 50, 1786-1800.
173. Pritchard, H. W., Ashmore, S., Berjak, P., Engelmann, F., González-Benito, M. E., Walters, C. (2009). Storage stability and the biophysics of preservation. En: *Proc. Plant conservation for the next decade: a celebration of Kew's 250th anniversary*, 12-16 Oct. 2009, Royal Botanic Garden Kew, London, UK.
174. Pszczola, D. (1998). Antioxidants: From preserving food quality to quality for life. *Food Technology*, 55, 51-59.
175. Puga-Hermida, M. I., Gallardo, M., Rodríguez-Gacio, M.D., Matilla, A. J. (2003). The heterogeneity of turnip-tops (*Brassica rapa*) seeds inside the silique affects

- germination, the activity of the final step of the ethylene pathway, and abscisic acid and polyamine content. *Plant Biology*, 30, 767-775.
176. Quatrano, R.S. (1968). Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing DMSO. *Plant Physiology*, 43, 2057-2061.
177. Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C., Job, D. (2004). The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and resynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology*, 134, 1598-1613.
178. Rao, N. K. (2004). Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal Biotechnology*, 3, 136-145.
179. Rao, N. K., Hanson, J., Dulloo, M. E., Ghosh, K., Nowell, D., Larinde, M. (2006). Manual of seed handling in genebanks. *Biodiversity International*. 8 p 73.
180. Reed, B. M. (2001). Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryoletters*, 22, 97-104.
181. Reed, B. M. (2008a). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer, New York, USA.
182. Reed, B. M. (2008b). Cryopreservation—practical considerations. En: *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Chapt. 1. Reed, B. M. (ed.). Springer, New York, USA. p. 3–13.
183. Reed, B. M., Dumet, D. J., Denoma, J. M., Benson, E. (2001). Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes L.* *Biodiversity Conservation*, 10, 939-949.
184. Reed, B. M., Engelmann, F., Dulloo, M. E., Engels, J. M. M. (2004). Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 7. IPGRI, Rome, Italy.

185. Reed, B. M., Uchendu, E. (2008). Controlled rate cooling. En: *Plant cryopreservation: a practical guide*. Reed B. M. (ed.). Springer, Berlin, p77-92.
186. Renaut, J., Hoffmann, L., Hausman, J. F. (2005). Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar plantlets. *Physiology Plant*, 125, 82–94.
187. Renaut, J., Hausman, J. F., Wisniewski, M. E. (2006). Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiology Plant*, 126, 97-109.
188. Revilla, P., Butrón, A., Cartea, M. E., Malvar, R. A., Ordás, A. (2005). Breeding for cold tolerance. In M. Ashraf and P. J. C. Harris, (eds.). *Abiotic Stress Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approches*. The Haworth Press, New York, London, Oxford. p. 301-398.
189. Revilla, P., Butrón, R., Malvar, A, Ordaz, A. (1999). Relationships among Kernel weight, early vigor and growth in maize. *Crop Science*, 39, 654-658.
190. Reyes-Moreno, C., Okamura-Esparza, J., Armienta-Rodelo, E., Gomez-Garza, R. M., Milan-Carrillo, J. (2000). Hard-to-cook phenomenon in chickpeas (*Cicer arietinum* L.): effect of accelerated storage on quality. *Plant Foods for Human Nutrition*, 55(3), 229-241.
191. Ribeiro, F. E., Baudouin, L., Lebrun, P., Chaves, L. J., Brondani, C., Zucchi, M. I., Vencovsky, R. (2010). Population structures of Brazilian tall coconut (*Cocos nucifera* L.) by microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 696-702.
192. Roberts, E.H. (1973) Predicting the storage life of seeds. *Seed Science. Technology*, 1, 499-514.

193. Rocha, N. E., González, R. F., Ibarra, F.J., Nava, C. A., Gallegos, J. A. (2006). Effect of pressure cooking on the antioxidant activity of extracts from three common bean (*P. vulgaris* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 98, 95-103.
194. Rock, C. D., Sakata, Y., Quatrano, R. (2010). Stress Signaling I: The Role of Abscisic Acid (ABA). En: A. Pareek, S.K. Sopory, H.J. Bohnert and Govindjee (eds.). *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*. p 33-73. doi: 10.1007/978-90-481-3112-9_3.
195. Rodiño, A., Santalla, M., Montero, I., Casquero, P., de Ron, A. (2001). Diversity of common bean *Phaseolus vulgaris* L. germplasm from Portugal. *Genetic Resources y Crop Evolution*, 48,409-417.
196. Rodrigues, T. B., Santos, J. B. (2006). Effect of natural selection on common bean (*Phaseolus vulgaris*) microsatellite alleles. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 345-352.
197. Rodríguez-Gacio, M.C., Matilla-Vázquez, M. A., Matilla A. (2009). Seed dormancy and ABA signaling the breakthrough goes on. *Plant Signaling & Behavior*, 4 (11), 1035-1048.
198. Rubin, D. L., Lewis, S. E., Mungall, C. J., Misra, S., Westerfield, M., Ashburner, M., Sim, I., Chute, C. G., Musen, M. A. (2006). National Center for Biomedical Ontology: advancing biomedicine through structured organization of scientific knowledge. *OMICS Journal Integrative Biology*, 10: 185-198.
199. Sakai, A. (2004). Plant cryopreservation. En: *Life in the Frozen State*. Fuller, B., Lane, N. and Benson, E. E. (eds.) CRC Press, London, UK. p 329-345.
200. Salinas-Flores, L., Adams, S. L, Wharton, D. A., Downes, M. F., Lim, M. H. (2008). Survival of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, oocytes in relation to intracellular ice formation. *Cryobiology*, 56, 28-35.

201. Sanchez, C., Martinez, M. T., Vida, N., San-Jose, M. C., Valladares, S., Vieitez, A. M. (2008). Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and RAPD analysis of genetic stability. *CryoLetters*, 29, 493–504.
202. Sandoval, J.A., Huang, H., Garrett, D.C., Gage, D.A., Chapman, K.D. (1995). N-Acylphosphatidylethanolamine in dry and imbibing cotton seeds. Amounts, molecular species, and enzymatic synthesis. *Plant Physiology*, 109, 269-275.
203. Sanhewe, A. J., Ellis, R. H. (1996a). Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris*. I. Ability to germinate and to tolerate desiccation. *Journal of Experimental Botany*, 47, 949-958.
204. Sanhewe, A. J., Ellis, R. H. (1996b). Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris*. II. Post-harvest longevity in air-dry storage. *Journal of Experimental Botany*, 47, 959-965.
205. Singh, S. P., Schwartz, F. H. (2010). Breeding common bean resistance to diseases: A review. *Crop. Science*, 50, 2199-2222.
206. Stamp, P. (1984). Chilling tolerance of young plants demonstrated on the example of maize (*Zea mays* L.). *Journal Agriculture Crop Science*, 7, 81-83.
207. Stamp, P. (1987). Photosynthetic traits of maize genotypes at constant and at fluctuating temperatures. *Plant Physiology Biochemical*, 25, 729-733.
208. Styles, E.D., Burgess, J.M., Mason, C., Huber, D.M. (1982). Storage of seed in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 19, 195-199.
209. Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi Shinozaki, K., Carninici, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold,

- and high salinity stresses using a full length cDNA microarray. *Plant Journal*, 31, 279-292.
210. Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., Shinozaki, K. (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion Plant Biology*, 10, 296-302.
211. Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion Plant Biology*, 3, 217-223.
212. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion Plant Biology*, 6:410–417.
213. Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D., Papa, R. (2005). Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breeding*, 124, 464-472.
214. Singh, S.P. (2001). Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. *Crop Science*, 41, 1659–1675.
215. Song, Z. P., Xu, X., Wang, B., Chen, J. K., Lu, B. R. (2003). Genetic diversity in the northernmost *Oryza rufipogon* populations estimated by SSR markers. *Theoretical. Application Genetic*, 107, 1492-1499.
216. Stanwood, P. C. (1985). Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation, En: *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. K. K. Kartha, (eds.). CRC Press, Boca Raton, FL. p 199-226.
217. Stanwood, P. C., Bass, L. N. (1981). Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Science Technology*, 9, 423.

218. Staub, J. E., Dane, F., Reitsma, K. (2002). The Formation of Test Arrays and a Core Collection in Cucumber Using Phenotypic and Molecular Marker Data. *Journal American Society Horticulture Science*, 127(4), 558–567.
219. Sung, D. Y., Kaplan, F., Lee, K. J., Guy, C. L. (2003). Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Science*, 8, 179-187.
220. Svensson, J., Ismail, A. M., Palva, E. T., Close, T. J. (2002). Dehydrins. En: Storey, K. B., y Storey, J. M. (eds.). *Sensing Signaling and Cell Adaptation*. Elsevier Science. p 155-171.
221. Tadeo, F. R., Gómez-Cadenas, A. (2008). Fisiología de las plantas y estrés. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ascón-Bieto J; Talón M (eds.). p 537-558.
222. Tatineni, V., CANTRELL, R. G., DAVIS, D. D. (1996). Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. *Crop Science*, 36, 186-192.
223. Thibivilliers, S., Trupti, J., Kimberly, B., Campbell, B., Scheffler, D. X., Bret, C., Gary, S. (2009). Generation of *Phaseolus vulgaris* ESTs and Investigation of their Regulation upon *Uromyces appendiculatus* Infection. *BMC Plant Biology*, 9, 46.
224. Thomashow, M. F. (1998). Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiology*, 118, 1-7.
225. Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 50, 571-599.
226. Thomashow, M. F. (2001). So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology*, 125, 89-93.

227. Towill, L. E., Ellis, D. D. (2008). Cryopreservation of dormant buds. En: *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Cap. 16. Reed, B. M. (eds.). Springer, New York, USA. p 421-442.
228. Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93, 713-718.
229. Tsukamoto, C., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokubun, M., Okubo, K. (1995). Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1184-1192.
230. Van Buskirk, H. A., Thomashow, M. F. (2006). Arabidopsis transcription factors regulating cold acclimation. *Physiology Plant*, 126, 72-80.
231. Urbanova, M., Kosuth, J., Cellarova, E. (2006). Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plant regenerated after cryopreservation. *Plant Cell Report*, 25, 140-147.
232. van Hintum, T. J. L., Brown, A. H. D, Spillane, C., Hodgkin, T. (2000). Core collections of plant genetic resources. *IPGRI Tech. Bul.* 3.
233. Vertommen, A., Carpentier, S. C., Remmerie, N., Witters, E., Swennen, R., Panis, B. (2007). Towards the identification of protein complexes in banana *Musa spp.* meristems. *Agriculture Applied Biology Science. Ghent University*, 72, 1-4.
234. Vertucci, C. W. (1989). Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. *Plant Physiology*, 90, 1478-1485.
235. Vertucci, C. W., Roos, E. E., (1990). Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology*, 94, 1019-1023.

236. Vieira, E. S. N., Schuster, I., Silva, R. B., Oliveira, M. A. R. (2009). Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microssatélites em gel de agarose. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, 1460-1466.
237. Vijayakumari, K., Siddhuraju, P., Pugalenti, M., Janardhanan, K. (1998). Effect of soaking and heat processing on the levels of antinutrients and digestible proteins in seeds of *Vigna aconitifolia* and *Vigna sinensis*. *Food Chemistry*, 63, 259-264.
238. Virk, P. S., Newbury, H. J., Jackson, M. T., Ford-Lloyd, B. V. (2000). Are mapped or anonymous markers more useful for assessing genetic diversity? *Theoretical. Application. Genetic*, 607-613.
239. Walters, C. (1998). Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging, *Seed Science Research*, 8, 223-244.
240. Walters, C., Koster, K. L. (2007). Structural dynamics and desiccation damage in plant reproductive organs. En: *Plant desiccation tolerance*. Jenks MA, Wood A, (eds.) Oxford, UK: Blackwell Publishing, Inc. p 251-280.
241. Walters, C., Wheeler, L., Standwood, P. C. (2004). Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology*. 48, 229-244.
242. Walters, C., Wheeler, L. J., Grotenhuis, J. M. (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research*, 15, 1-20.
243. Ward, K., Scarth, R., Daun, J. K., Vessey, J. K. (1995). Chlorophyll degradation in summer oilseed rape and summer turnip rape during seed ripening. *Canadian Journal of Plant Science*, 75, 413-420.
244. Weitbrecht, K., Müller, K., Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany. Review*. 62(10), 3289–3309. doi:10.1093/jxb/err030.

245. Withers, L. A., Engelmann, F. (1998). *In vitro* conservation of plant genetic resources. En: *Biotechnology in agriculture*. Altman A. (ed.). Marcel Dekker, New York, p 57-88.
246. Xin, Z. (2001). Temperature sensing and cold acclimation. *Current opinion in plant biology*, 4(3), 241-246.
247. Yabor, L., Arzola, M., Aragón, C., Hernández, M., Arencibia, A. D., Lorenzo, J. C. (2006). Biochemical side effects of genetic transformation of pineapple. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86, 63-67. doi:10.1007/s11240-006-9097-z
248. Yabor, L., Aragón, C., Hernández, M., Arencibia, A. D., Lorenzo, J. C. (2008). Biochemical side effects of the herbicide FINALE on bar genecontaining transgenic pineapple plantlets. *Euphytica*, 164. 515-520. doi: 10.1007/s10681-008-9743-0
249. Yabor, L., Valle, B., Carvajal, C., Aragón, C., Hernandez, M., Gonzalez, J., Daquinta, M., Arencibia, A. D., Lorenzo, J. C. (2009). Characterization of a field-grown transgenic pineapple clone containing the genes chitinase, AP24, and bar. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, doi: 10.1007/s11627-009-9245-3.
250. Yang, T., Zhang, L., Zhang, T., Zhang, H., Xu, S., An, L. (2005). Transcriptional regulation network of cold-responsive genes in higher plants. *Plant Science*, 169, 987-995.
251. Yu, K., Park, S. J., Poysa, V., Gepts, P. (2000). Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers into a Molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Heredity*, 91(6), 429-434. doi:10.1093/jhered/91.6.429.