



DOI: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i69.1198>

Artículo

Crioconservación de semillas de *Cedrela odorata* L.: germinación y establecimiento temprano en vivero
Seed cryopreservation of *Cedrela odorata* L.: germination and early nursery establishment

Mario Valerio Velasco-García¹, Dalia Grisel Hernández-Arroyo¹, Liliana Muñoz-Gutiérrez¹, Carlos Román Castillo-Martínez¹, Miguel Ángel Vallejo-Reyna¹, Florencia García-Campusano^{1*}.

Abstract

Seed cryopreservation represents an alternative for the long-term conservation of forest germplasm, especially of intermediate or recalcitrant tropical species, whose viability declines rapidly under standard storage conditions. The impact of rapid freezing of Spanish cedar seeds in liquid nitrogen (L₂N), on *sensu stricto* germination, and on the early stages of seedling development was evaluated. To this end, both dehydrated and non-dehydrated seeds were subjected to encapsulation/desiccation pre-treatments in the presence of various anti-vitrifying agents (LS, PSV2, and PSV3), prior to freezing. After thawing at room temperature, germination speed and capacity were compared, as were plantlet establishment, growth and survival after transplanting to the nursery. Results show that Spanish cedar seeds have the potential to survive fast freezing, although, in general, this had a damaging effect during the germination and early stages of plantlet establishment, being less severe in seeds that had not been encapsulated. However, the pretreatments favored plantlet survival in the nursery. The roots were the most affected organ, which led to a high shoot root dry weight ratio (S:R). It is concluded that *Cedrela odorata* seeds subject to rapid freezing have the potential to survive, germinate and produce plantlets that can be transferred to nurseries, although further fine tuning of the protocol is required to optimize response.

Key words: Red cedar, *ex situ* conservation, germination, germplasm, liquid nitrogen, osmoprotectant.

Resumen

La crioconservación de semillas representa una alternativa para la conservación a largo plazo de germoplasma forestal, sobre todo de especies tropicales intermedias o recalcitrantes, cuya viabilidad decae rápidamente bajo condiciones estándares de almacenamiento. Por ello, se evaluó en semillas de cedro rojo el impacto del congelamiento rápido en nitrógeno líquido (N₂L) sobre la germinación *sensu stricto* y desarrollo temprano de la plántula. Para este fin, semillas deshidratadas o sin deshidratar se sometieron a pretratamientos de encapsulación/deshidratación en presencia de agentes osmoprotectores (LS, PVS2 y PVS3), previo a su congelación en N₂L. Después de la descongelación a temperatura ambiente, se compararon la capacidad y velocidad de germinación de las semillas de los distintos tratamientos, así como el establecimiento, supervivencia y crecimiento de las plántulas después de cuatro meses en vivero. Los resultados muestran que las semillas de cedro rojo tienen la capacidad de sobrevivir el congelamiento rápido, aunque esto tuvo en general un efecto perjudicial durante las etapas de germinación y emergencia temprana, el cual fue menos severo en semillas sin encapsular. No obstante, los pretratamientos favorecieron la supervivencia de la plántula en vivero; el sistema radicular tuvo mayores afectaciones que la parte aérea en todos los tratamientos de congelación, lo cual incidió en una alta relación PSA/PSR. Se concluye que las semillas de *Cedrela odorata* sometidas al congelamiento rápido tienen el potencial de sobrevivir, germinar y producir plántulas para trasplante en vivero, aunque es necesario afinar el protocolo para optimizar la respuesta.

Palabras clave: Cedro rojo, conservación *ex situ*, germinación, germoplasma, nitrógeno líquido, osmoprotector.

Fecha de recepción/Reception date: 18 de agosto de 2021

Fecha de aceptación/Acceptance date: 15 de noviembre de 2021

1Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Cenid-Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales. México.

*Autor para correspondencia; correo-e: garcia.florencia@inifap.gob.mx

Introducción

Cedrela odorata L. es la segunda especie de madera preciosa con mayor importancia comercial en las regiones tropicales y subtropicales de México y de América Latina (Pennington y Sarukhán, 2005), por lo que se considera prioritaria para los programas de reforestación y plantaciones forestales comerciales. Sin embargo, debido a la destrucción de su hábitat por la deforestación y el aprovechamiento desmedido, está incluida en el Apéndice III de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres-2013 (CITES, por sus siglas en inglés) para reglamentar su comercio y evitar su explotación insostenible; además, forma parte de la lista roja de la *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, por sus siglas en inglés) como especie vulnerable (Mark y Rivers, 2017); y en México, está catalogada en la NOM-059-SEMARNAT-2019 como especie sujeta a protección especial (Semarnat, 2019). Establecer estrategias para el manejo y conservación de semillas resulta fundamental para preservar este recurso genético en bancos de germoplasma, así como para abastecer la creciente demanda de semillas para los programas de plantaciones y reforestación.

De acuerdo con sus características de almacenamiento, las semillas de *C. odorata* se clasifican como intermedias, ya que son relativamente tolerantes a la deshidratación, aunque sensibles al enfriamiento (Andrés *et al.*, 2011). No obstante, su viabilidad se reduce a los pocos meses después de recolectada, lo que limita la posibilidad de mantenerlas a mediano y largo plazo en condiciones *ex situ* (García y Abdelnour, 2013) y refuerza la necesidad de buscar alternativas para su preservación.

La crioconservación, o almacenamiento de células, tejidos u organismos a temperaturas ultra bajas, en nitrógeno líquido (N₂L, por debajo de -150 °C), se ha implementado con éxito para la conservación de especies agrícolas (Hor *et al.*, 2005; Acosta *et al.*, 2020), ornamentales (Hirano *et al.*, 2009) y forestales (Pita *et al.*, 1998; Michalak *et al.*, 2015). Además, representa una opción para especies en

peligro de extinción, así como tropicales con semillas intermedias o recalcitrantes, en particular de aquellas que pueden soportar una deshidratación parcial (Hor *et al.*, 2005), como el cedro rojo. La técnica tiene como finalidad detener los procesos metabólicos y la división celular, lo cual evita el deterioro (Engelmann y Dussert, 2013).

No obstante, el proceso de congelación tiene consecuencias ya que puede inducir formación de cristales y choque osmótico, lo que resulta letal para el tejido; por lo que, el éxito depende del manejo adecuado del contenido de humedad celular (Dussert *et al.*, 2001; Hor *et al.*, 2005). Debido a que el contenido de agua y macromoléculas difiere en las semillas de las distintas especies, se requiere estandarizar protocolos que limiten el daño durante la congelación y la posterior descongelación. Por otra parte, es necesario evaluar la efectividad del proceso, tanto para conservar la viabilidad y germinabilidad de las semillas, así como su potencial para producir plantas de buena calidad.

La investigación en torno a la crioconservación de tejidos en el género *Cedrela* son escasos, pero prometedores. Estudios con *C. fissilis* Vell. (Da Costa *et al.*, 2003) muestran que las semillas toleran el congelamiento con N₂L y se recuperan para producir plántulas vigorosas, siempre y cuando el contenido de humedad se mantenga entre 6 y 7 %. De manera similar, en *C. odorata* la vitrificación y congelamiento de ápices y semillas, así como la posterior recuperación en condiciones *in vitro* promueve una alta sobrevivencia, además de una germinación eficiente, incluso después de varios meses de congelamiento (García y Abdelnour, 2013). Sin embargo, aún se desconoce el impacto de diferentes estrategias de manejo de las semillas previo al tratamiento con N₂L sobre la germinación, sobrevivencia, enraizamiento y calidad en general de las plántulas obtenidas. Por lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron: 1) determinar la eficiencia de

distintas estrategias de crioconservación sobre la tolerancia a la congelación en semillas de *C. odorata*; y 2) comprobar la capacidad de enraizamiento, supervivencia y crecimiento de plántulas después de 16 semanas de su transplante al vivero.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se utilizó una mezcla compuesta de semillas de *C. odorata* recolectadas en 2018, procedentes de los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz, México. A partir de dicha mezcla, se obtuvo una muestra de trabajo de 1 100 semillas sin daños físicos, ni evidencia de contaminación por plagas o enfermedades. El contenido de humedad (CH) del lote fue de 8 % y se determinó previo al desarrollo de los experimentos de acuerdo a los lineamientos del ISTA (2016).

Pretratamiento de semilla y ultracongelación

Se comparó el efecto del congelamiento en N₂L en semillas intactas que no recibieron ningún manejo (desnudas - T0), con semillas sometidas a distintos pretratamientos (Cuadro 1), en las que se probó el efecto de la deshidratación (T1) y encapsulación/deshidratación (T2 y T3); así como la aplicación adicional de distintos osmoprotectores, solos (T4, T5 y T6) o en combinación (T7 y T8). En cada tratamiento se utilizaron cinco repeticiones de 20 semillas, para un total de 100 semillas. Como control de germinación, se utilizó semilla sin tratar ni congelar (TP).



Cuadro 1. Tratamientos de crioconservación de semillas de *Cedrela odorata* L.

Tratamiento	Preacondicionamiento					Exposición en N ₂ L
	Deshidratación (%)	Encapsulación	Vitrificación			
			LS	PVS2	PVS3	
TP	No	No	No	No	No	No
T0	No	No	No	No	No	Si
T1	5	No	No	No	No	Si
T2	No	Si	No	No	No	Si
T3	5	Si	No	No	No	Si
T4	5	Si	Si	No	No	Si
T5	5	Si	No	Si	No	Si
T6	5	Si	No	No	Si	Si
T7	5	Si	Si	Si	No	Si
T8	5	Si	Si	No	Si	Si

Para los tratamientos que incluyeron encapsulación/deshidratación, estos se colocaron en solución de alginato de sodio 2 % (Sigma); posteriormente, se transfirieron, de manera individual, a una solución de polimerización de cloruro de calcio 0.1 M (Sigma) durante 15 minutos. Por último, se colocaron en una cámara de desecación con sílica gel activada hasta alcanzar peso constante (5.13 % CH después de 2.5 horas en la semilla sin encapsular y 5.24 % en la semilla encapsulada). Se repitió este procedimiento con el resto de los tratamientos.

En los tratamientos con osmoprotectores, las semillas encapsuladas/deshidratadas se sumergieron durante 10 minutos en LS (*Loading solution* -solución de carga: medio Murashige y Skoog (1962), glicerol 2.0 M y sacarosa 0.4 M) (Nishizawa *et al.*, 1993); enseguida se dejaron 20 minutos, en PVS2 (glicerol 30 %, etilenglicol 15 %, dimetil sulfóxido 15 %, sacarosa 0.4 M) (Sakai *et al.*, 1990), o en PVS3 (glicerol 50 %, sacarosa 1.5 M) (Nishizawa *et al.*, 1993).

Las semillas de los distintos tratamientos se sumergieron en N₂L durante 20 minutos. El descongelamiento se hizo a temperatura ambiente.

Germinación y emergencia de plántulas

Después de aplicar los distintos tratamientos, las semillas se colocaron en cajas germinadoras (*SeedburoTM*) sobre papel filtro humedecido con agua bidestilada estéril. La incubación se realizó en una cámara climática *Memmert HPP750* (*Memmert GmbH + Co.Kg*, Alemania), a 28 °C (día/noche) y humedad relativa ambiental. Las semillas se revisaron diariamente durante 22 días y se consideraron como germinadas, cuando la raíz sobresalió de la testa con 3 mm de longitud, aproximadamente. Se evaluaron: la capacidad germinativa (*CG*), como el porcentaje de germinación al final de la prueba; la energía germinativa (*EG*), como el número de días en el que se logra 50 % de la germinación (valores mayores indicaron menor *EG*) (Juárez-Agis *et al.*, 2006); el valor germinativo (*VG*), que se obtuvo con la ecuación de Czabator (1962):

$$VG = GMD \times VP$$

Donde: *GMD* (germinación media diaria) resultó de dividir el porcentaje final de semillas germinadas entre el número de días de prueba (Viveros-Viveros *et al.*, 2015); y el valor pico (*VP*) corresponde al porcentaje acumulado en el punto de inflexión de la curva de germinación (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996).

Una vez germinadas, las semillas se depositaron sobre sustrato húmedo esterilizado (35 % de *Peat Moss*, 35 % de perlita y 30 % de vermiculita) bajo condiciones de invernadero. El diseño fue completamente aleatorio acorde con los diez tratamientos y con cuatro repeticiones. Después de 15 días se contabilizó el porcentaje de semillas con crecimiento de la raíz principal, la generación de raíces secundarias, crecimiento del hipocótilo y aparición de hojas verdaderas.

Supervivencia, crecimiento y biomasa de plántulas

De cada uno de los tratamientos, se seleccionaron aleatoriamente 15 plántulas enraizadas y se trasplantaron en tubetes de 250 mL con sustrato esterilizado (35 % de *Peat Moss*, 35 % de perlita y 30 % de vermiculita) y 4.2 g L⁻¹ de *Multicote*[®] para su crecimiento en vivero durante 16 semanas. El diseño experimental fue en bloques completos al azar, con 10 tratamientos, cinco repeticiones (bloques) y tres plantas por unidad experimental. Se evaluó la supervivencia (%), altura del hipocótilo (mm), altura total (mm), diámetro basal (cuello de raíz) (mm), diámetro de copa (mm), longitud de raíz principal (cm), con el apoyo de un vernier digital Truper[®]; además se obtuvieron el peso fresco de raíz (*PFR*) (g), peso fresco de follaje (*PFF*) (g), peso seco aéreo (*PSA*) (g) y peso seco radicular (*PSR*) (g); los cuales se determinaron con una báscula analítica (*OHANUS*, modelo Galaxy[®] 200), previa deshidratación de las plantas en un horno eléctrico (Riossa, modelo OHF-125) a 96 °C, hasta obtener peso constante; también, se obtuvo el peso seco total (*PST*) (g); relación *PSA/PSR* (Ruano , 2003).

Análisis de datos

Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos de todas las variables (germinación, enraizamiento, supervivencia y crecimiento) se verificaron con la prueba de *Shapiro-Wilk* y *Levene*, respectivamente. Únicamente, el porcentaje de plántulas establecidas cumplió con los supuestos ($p \geq 0.0893$), para el cual se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias de *Tukey* ($p \leq 0.05$). El resto de las variables no cumplieron con los supuestos ($p \leq 0.0433$); por lo tanto, se analizaron mediante pruebas no paramétricas de varianza y comparaciones múltiples de rangos (Kruskal y Wallis, 1952; Conover, 2012). Para la supervivencia, las variables de crecimiento y relación *PSA/PSR* ($p \leq 0.0335$) se realizaron análisis de varianza y comparaciones de medias no paramétricas RT-3 (Conover, 2012), mientras que para los datos de longitud de raíz ($p \geq 0.2479$) se

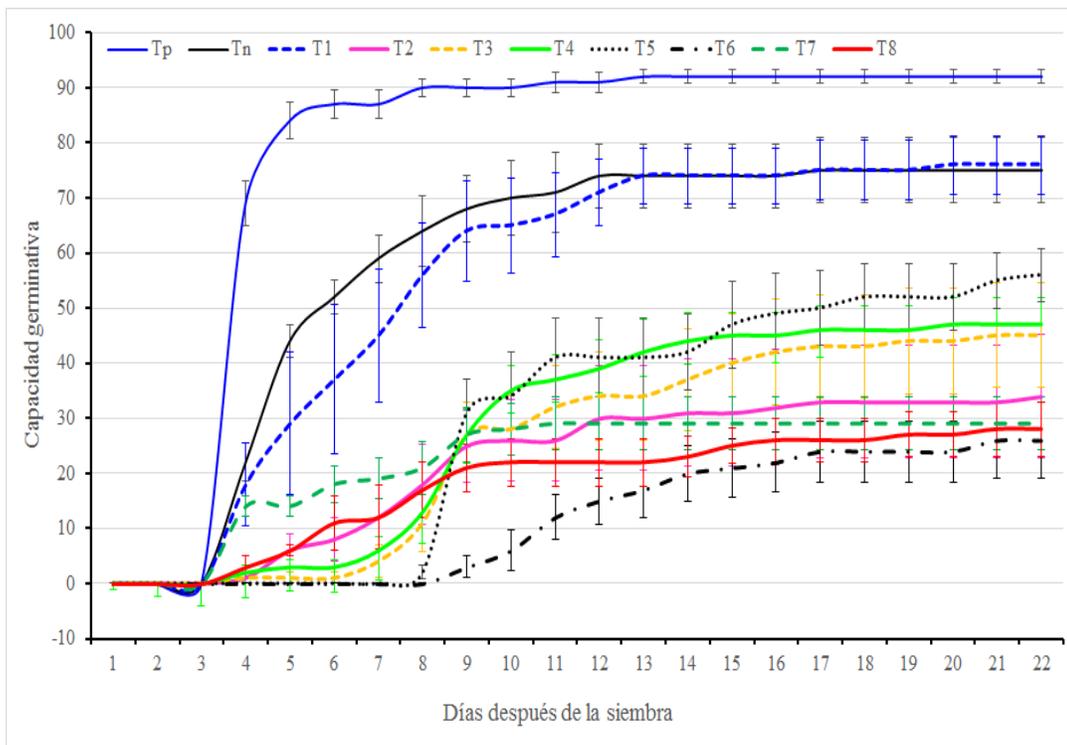
hizo un análisis de varianza paramétrica y comparación de medias de *Tukey*. Finalmente, se determinaron las diferencias entre tratamientos; para ello se consideró el efecto conjunto de las variables de germinación y de crecimiento (supervivencia, crecimiento y relación *PSA/PSR*); por separado, se efectuaron dos análisis de componentes principales y se obtuvo la comparación de medias del componente principal uno (CP1). Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa de análisis estadístico SAS V. 9.3.1 (<http://support.sas.com/software/93/>).

Resultados

Efecto de la ultracongelación sobre la germinación

El congelamiento de las semillas en N₂L redujo el porcentaje de germinación final (*CG*) entre 15 y 60 % respecto al control sin congelar (TP), dependiendo del tratamiento. Los mejores resultados para esta etapa se obtuvieron para las semillas que se congelaron sin encapsular (desnudas), sin deshidratar (T0) o deshidratadas (T1), las cuales alcanzaron valores similares entre sí y respecto al control para la germinación final (*CG*), vigor germinativo (*VG*) y energía germinativa (*EG*) (Figura 1, Cuadro 2). Por su parte, la encapsulación de semillas (T2 y T3) provocó la disminución significativa de todos los parámetros germinativos evaluados ($p < 0.0001$).





Cada punto representa el porcentaje (%) promedio de semillas germinadas de cinco repeticiones y las barras verticales representan el error estándar.

Figura 1. Curva de germinación de semillas de *Cedrela odorata* L. sometidas a distintos pretratamientos y congelación en nitrógeno líquido.

Cuadro 2. Parámetros germinativos. Se muestran valores promedios y comparación de medias de los diez tratamientos de crioconservación de semillas de *Cedrela odorata* L.

Tratamiento	Capacidad germinativa (CG) (%)	Valor germinativo (VG)	Energía germinativa (EG)	Componente Principal uno	Emergencia de plántulas (%)
TP	92.00 a	200.59 a	4.00 a	2.527 a	76.84 a
T0	74.00 ab	67.42 a	5.00 ab	1.683 ab	38.86 b
T1	75.00 ab	62.12 a	6.40 bc	1.400 b	34.93 b
T3	34.00 de	7.45 bcd	8.00 c	-0.881 cd	30.00 b
T4	44.00 cd	10.56 bc	8.40 d	-0.589 cd	33.33 b
T7	47.00 cd	11.54 b	9.20 d	-0.443 cd	60.56 ab
T5	55.00 bc	15.50 b	9.80 de	-0.390 cd	46.00 ab
T8	26.00 e	3.17 d	11.80 e	-2.060 e	42.87 b
T2	29.00 e	12.19 bc	4.60 a	-0.134 c	50.03 ab
T6	27.00 e	6.01 cd	7.80 c	-1.113 de	33.33 b

Valores con diferente letra en la columna son estadísticamente diferentes *Tukey* ($p \leq 0.05$).

La adición de los agentes osmoprotectores LS, PVS2 y PVS3 al material encapsulado/deshidratado, solos (T4, T5 y T6) o en combinación (T7 y T8) no revirtió de manera significativa el efecto perjudicial de la encapsulación; únicamente, el tratamiento con solo PVS2 (T5) aumentó significativamente la *CG*; aunque el inicio de la germinación fue tardío, lo que provocó que los valores de *EG* y *VG* se mantuvieran bajos. En general los valores más bajos para todos los parámetros se obtuvieron cuando se incorporó PVS3 (T6 y T8). Una característica importante en esta etapa fue que el congelamiento, en cualquiera de los tratamientos, incrementó, notoriamente, la varianza de la capacidad germinativa ($TP = 15.8$, resto de los tratamientos = $76.5 - 309.2$).

En el análisis de componentes principales, el componente principal uno (CP1) de los parámetros germinativos explicó 76.82 % de la varianza. La *CG* y *VG* contribuyeron con valores similares (0.608 y 0.655, respectivamente) para explicar la variabilidad; mientras que, la *EG* tuvo menor contribución (-0.449). El CP1 de los parámetros germinativos presentó diferencias estadísticas ($p < 0.0001$) entre los tratamientos, con valores de -2.03 (T8) a 3.56 (TP). El CP1 mostró tres grupos de tratamientos: el primer grupo, lo conformaron los tratamientos T0, T1 y el tratamiento control (TP); el segundo grupo, lo integraron T2, T3, T4, T5 y T7; mientras que T6 y T8 formaron el tercer grupo (Cuadro 2).

Efecto de la ultracongelación y el pretratamiento de semillas sobre la emergencia de las plántulas

La capacidad de las semillas germinadas para formar plántulas completas susceptibles de ser trasplantadas fue estadísticamente diferente entre los tratamientos de crioconservación ($p < 0.049$). En contraste a lo observado durante la etapa de germinación *sensu stricto*, el congelamiento de semillas sin encapsular (T0 y T1) afectó negativamente el desarrollo ulterior, ya que se redujo

de manera significativa el número de plántulas emergidas. La encapsulación permitió una recuperación parcial de la respuesta cuando se usó en combinación con la deshidratación (T2), o si se aplicó el agente osmoprotector PVS2, solo (T7) o en combinación con LS (T5); con ello se lograron resultados estadísticamente similares al control sin congelar (TP) (Cuadro 2).

Supervivencia, crecimiento y biomasa de plántulas en invernadero

La supervivencia de las plántulas después de 16 semanas de crecimiento en invernadero, así como la relación peso seco aéreo/peso seco radicular (*PSA/PSR*) y todas las variables de crecimiento registraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de crioconservación, a excepción del diámetro basal (cuello de raíz) ($p = 0.2094$) (Cuadro 3).



Cuadro 3. Supervivencia y variables de crecimiento de plántulas de semillas bajo tratamientos de crioconservación de *Cedrela odorata* L.

Tratamiento	Supervivencia (%)	Altura del hipocótilo (mm)	Diámetro basal (mm)	Altura total (mm)	Diámetro de copa (mm)	Longitud de raíz (mm)	Relación PSA/PSR	Componente principal 1
TP	73.33 b	36.31 a	3.80 a	113.81 abc	169.29 a	11.32 a	3.83 c	1.139 a
T0	46.67 b	38.14 a	5.08 a	103.49 abc	156.22 a	8.47 bc	2.84 ab	0.768 ab
T1	66.67 ab	39.79 a	4.94 a	116.04 a	139.64 abcd	10.11 ab	4.25 c	0.714 ab
T3	80.00 ab	28.99 b	3.67 a	85.83 c	113.65 d	6.79 c	3.06 abc	-0.987 c
T4	86.67 ab	28.54 b	4.05 a	112.50 a	132.85 abcd	8.42 bc	2.24 a	0.008 abc
T7	100.00 a	24.53 b	3.63 a	91.52 bc	120.27 bcd	7.39 c	3.40 bc	-1.060 c
T5	100.00 a	27.55 b	4.83 a	99.93 abc	133.80 abcd	8.06 bc	3.71 c	-0.208 abc
T8	91.67 ab	27.00 b	3.56 a	85.20 c	116.37 cd	8.42 bc	3.56 bc	-0.853 bc
T2	80.00 ab	29.34 b	3.96 a	111.78 ab	150.54 abc	9.75 ab	3.96 bc	0.406 abc
T6	72.73 ab	28.51 b	4.48 a	126.69 a	154.21 ab	9.30 bc	5.04 c	0.739 ab

Valores promedios y comparación de medias (letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, p menor o igual a 0.05).

Las plántulas procedentes de semillas sin encapsular (T0 y T1) tuvieron una supervivencia similar a las semillas sin congelar (TP), así como para prácticamente todas las variables de crecimiento, excepto la longitud de raíz y en la relación *PSA/PSR* en las cuales las plántulas de semillas sin deshidratar (T0) presentaron los valores significativamente más bajos; lo anterior indica un efecto positivo de la deshidratación de semillas en esta etapa, y en particular sobre la calidad de la raíz, que pudo impactar en la supervivencia. Al igual que en la etapa de establecimiento, la encapsulación, en ausencia (T2 y T3) o en presencia (T4 a T8) de agentes osmoprotectantes, promovió la supervivencia, particularmente, en los tratamientos que incluyen PVS2 (T5 y T7), los cuales alcanzaron 100 % y superaron incluso a las semillas sin congelar (TP). No obstante, la longitud de hipocótilo de las plántulas de semillas encapsuladas fue significativamente menor a lo obtenido para semillas sin encapsular.

El CP1 de la supervivencia, variables de crecimiento y relación *PSA/PSR* explicó 41.82 % de la varianza. El diámetro basal, longitud de raíz, altura total y diámetro de copa tuvieron mayor contribución a la varianza total (0.4103 a 0.5267), seguido de altura de hipocótilo (0.2830); en cambio, la supervivencia y la relación *PSA/PSR* registraron menor contribución a la varianza total (0.007 y 0.0374). El CP1 presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p = 0.0111$), con valores de -1.060 (T7) a 1.139 (TP). En general, el CP1 determinó tres grupos de tratamientos, el primero lo conformaron tratamientos (TP, T0, T1, T6) con valores altos, el segundo con intermedios (T2, T4, T5) y el tercero (T3, T7, T8) con registros bajos (Cuadro 3).



Discusión

La implementación de la crioconservación de semillas de *C. odorata* ofrece una alternativa para su manejo a largo plazo en bancos de germoplasma. Asociar la ultracongelación con pretratamientos osmoprotectores representa una estrategia ampliamente utilizada para mantener la viabilidad de las semillas durante el congelamiento/descongelamiento. Sin embargo, el impacto de estos manejos, en su conjunto, sobre el desarrollo de la futura planta debe ser explorada en sus distintas etapas: desde la germinación, el establecimiento hasta su posterior crecimiento a fin de valorar su factibilidad como estrategia de conservación.

Bajo las condiciones propuestas en los ensayos que se documentan, se determinó que el efecto de los diferentes pretratamientos varió en las distintas etapas de desarrollo. Se evidenció que entre 20 y 70 % del germoplasma se pierde durante la germinación *sensu stricto* y las etapas tempranas de la emergencia de la plántula, en función del pretratamiento; por lo que representan las etapas más sensibles al congelamiento. En particular, se observó que la mejor respuesta germinativa se obtuvo en los tratamientos de deshidratación y congelamiento de semillas desnudas, con o sin desecar (T0 y T1), respecto a las semillas encapsuladas/deshidratadas, sin (T2 y T3) o con soluciones (T4 a T8) osmoprotectoras. Se esperaba que incorporar, previo al congelamiento, un paso de encapsulación/deshidratación y vitrificación con agentes osmoprotectores permitiera mantener la capacidad germinativa y la viabilidad general de las semillas. Sin embargo, no fue así y esas manipulaciones tuvieron un impacto nulo (deshidratación) o incluso perjudicial (encapsulación/deshidratación/vitrificación), ya que disminuyó tanto el porcentaje final, como la velocidad y energía de germinación. Estas estrategias son ampliamente utilizadas, porque favorecen el control hídrico de las células al limitar la formación de cristales de hielo que pueden dañar las membranas durante el congelamiento y descongelamiento (Gantait *et al.*, 2017).

Por ejemplo, el glicerol se comporta como un anticongelante que reemplaza al agua intracelular, por lo que es muy útil como crioprotector; no obstante, es altamente tóxico; por ello, su uso debe ajustarse cuidadosamente (Kim *et al.*, 2009). Es posible que las semillas de *C. odorata* sean sensibles a la toxicidad química del glicerol, razón por la cual su empleo resultó contraproducente. Aunado a lo anterior, las formulaciones de PVS2 y PVS3, aunque son muy recomendadas (Sakai *et al.*, 1990; Nishizawa *et al.*, 1993), tienen altas concentraciones de sacarosa, en especial PVS3 (tratamientos T6 y T8), lo que puede generar un choque osmótico.

Esto refleja las limitaciones de los tratamientos probados, que deben ser atendidas a fin de lograr utilizar la ultracongelación como una herramienta para la conservación a largo plazo de las semillas de *C. odorata*. No obstante, el que se mantuviera la respuesta germinativa sugiere que, a pesar de su citada sensibilidad al frío, es posible adaptar una estrategia de crioconservación para sus semillas, lo cual contrasta con lo observado para las semillas de otras especies arbóreas tropicales como *Pithecellobium saman* (Jacq.) Benth. y *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp (Abdelnour *et al.*, 2007).

Un aspecto por considerar es que la viabilidad de las semillas y el desarrollo posterior de la plántula posiblemente se afectaron por el descongelamiento a temperatura ambiente utilizado en el presente estudio, ya que trabajos con el mismo taxón (García y Abdelnour, 2013) y para *C. fissilis* (Da Costa *et al.*, 2003) indicaron que semillas almacenadas directamente en N₂L mantienen 100 % de su capacidad germinativa, cuando el descongelamiento ocurre a 40 °C. Si bien el descongelamiento a temperatura ambiente es ampliamente utilizado, la incubación corta en calor puede ser favorable para algunas especies, sobre todo de aquellas con alto contenido lipídico, ya que al parecer promueve el descongelamiento de los triacilgliceroles antes de que interaccionen con el agua durante la imbibición, lo cual limita el daño estructural intracelular (Volk *et al.*, 2006).

A diferencia de lo observado durante la germinación *sensu stricto*, en el establecimiento inicial de la plántula, así como en su desarrollo ulterior, se observó un efecto positivo en las plantas originadas de semillas tratadas por encapsulación/deshidratación, en particular con el uso de PVS2 como osmoprotector (T5 y T7). Ello contrasta con las plantas cuya semilla no tuvo tratamiento (T0 y T1), o fue encapsulada sin osmoprotectores (T2 y T3), o en semillas tratadas con PVS3, en las cuales menos de 50 % prosiguieron su desarrollo, lo que indica que los componentes como el etilen-glicol o el DMSO presentes en PVS2 pudiesen ejercer un efecto protector (Kim *et al.*, 2009); y por tanto, deben optimizarse para la especie.

Finalmente, el efecto negativo del congelamiento con N₂L disminuyó con el progreso del desarrollo de la plántula, lo cual probablemente indique una gradual recuperación del estrés provocado, como se ha observado en sorgo, frijol, maíz y tomate (Cejas *et al.*, 2012; Arguedas *et al.*, 2018; Acosta *et al.*, 2020). En particular, el manejo de las semillas mediante algún pretratamiento (T2 a T8) favoreció la supervivencia de plántulas una vez trasplantadas en el vivero. Es posible que esto sea un reflejo de la presión de selección ejercida por los tratamientos en etapas previas, que resulta en que, únicamente, las semillas más vigorosas son capaces de producir plántulas con potencial para establecerse (ver por ejemplo T6). No obstante, plántulas de semillas encapsuladas/deshidratadas y tratadas con PVS2 (T5 y T7) alcanzaron valores superiores, incluso al control sin congelar (TP), lo que sugiere que la combinación de compuestos presentes en esta solución efectivamente provee de un beneficio que se expresa posterior a la germinación. Al analizar las variables de crecimiento de la parte aérea, los tratamientos con semillas desnudas sin deshidratar (T0) y deshidratadas (T1) fueron similares al control sin congelar (TP), lo que contrasta con los tratamientos con PVS2 (T5 y T7) que presentaron la máxima sobrevivencia, aunque un lento crecimiento. Si bien, la altura se relaciona con la capacidad fotosintética de las

plántulas y superficie de transpiración, así como mayor posibilidad de competir por recursos, se requiere de un sistema radicular adecuado para soportar el crecimiento (Rodríguez, 2008; Prieto y Sáenz, 2011).

El desarrollo de la raíz se afectó en todos los tratamientos de congelación, más que la parte aérea, e incidió sobre los altos valores de la relación *PSA/PSR* observados, cuyo valor óptimo se espera dentro del intervalo 1.5 y 2.5 (Rodríguez, 2008). El menor tamaño aéreo observado en T5 y T7 generó una relación *PSA/PSR* más equilibrada, lo cual beneficiaría su crecimiento en sitios restrictivos, debido a que se ha demostrado que plantas con menor medida en altura y diámetro mantienen un mejor estado hídrico, con un consumo moderado de agua en situaciones de deficiencia hídrica (Leiva y Fernández, 1998).

Dados los resultados de este trabajo, un protocolo de ultracongelación para semillas de cedro rojo requerirá explorar a mayor profundidad alternativas de descongelamiento, condiciones de germinación, así como la incorporación de PVS2 a fin de que la supervivencia y vigor de las distintas etapas de desarrollo se potencien.

Conclusiones

Las semillas de *C. odorata* sometidas al congelamiento rápido tienen el potencial de sobrevivir, germinar y producir plántulas vigorosas para su trasplante en vivero. Las fases críticas para el éxito de un protocolo de crioconservación son la germinación *sensu stricto* y la emergencia temprana de la plántula. La evaluación de distintos pretratamientos de encapsulación, deshidratación, así como el uso de osmoprotectores evidenció que congelar semillas directamente, sin la aplicación de ningún pretratamiento es el protocolo más adecuado para mantener la capacidad germinativa, aunque es necesario optimizar las condiciones de descongelamiento para obtener un mejor rendimiento. El uso de la solución osmoprotectora PVS2 tiene un efecto benéfico en la emergencia temprana y

supervivencia de las plántulas en vivero. Esto sugiere una ruta a seguir para optimizar un protocolo que contemple combinar dichos factores, y que provea de una alternativa viable para la conservación a largo plazo de semillas de *C. odorata*.

Agradecimientos

Se agradece a las personas e instituciones que donaron las semillas. Los resultados son parte del proyecto "Análisis transcriptómico de la germinación en *Cedrela odorata* L. para la identificación de marcadores moleculares para la conservación de semillas", número 941634436, con financiamiento del Fondo Fiscal del INIFAP.

Conflicto de intereses

Florencia García-Campusano, Mario Valerio Velasco-García y Liliana Muñoz-Gutiérrez declaran que no participaron en ninguna actividad editorial relacionada con el presente documento.

Contribución por autor

Mario Valerio Velasco-García y Liliana Muñoz Gutiérrez: diseño de experimentos en vivero, toma de datos en vivero, análisis de datos y redacción del manuscrito; Dalia Grisel Hernández-Arroyo: ejecución de experimentos de criopreservación y toma de datos; Carlos Castillo-Martínez: diseño y ejecución de experimentos de

criopreservación; Miguel Ángel Vallejo-Reyna: diseño de experimentos, discusión de resultados, revisión y corrección del manuscrito; Florencia García-Campusano: interpretación de resultados y redacción de manuscrito. Todos los autores dieron su aprobación a la versión final.

Referencias

Abdelnour E., A., G. Rojas y U. Alfaro. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Revista Tecnología en Marcha* 20(1):98-103. https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/95. (31 de agosto de 2021).

Acosta, Y., L. Pérez, C. Linares, L. Hernández, D. Escalante, A. Pérez, B. E. Zevallos, L. Yabour, M. E. Martínez-Montero, I. Cejas, D. Fontes, Sershenand and J.C. Lorenzo. 2020. Effects of *Teramnus labialis* (L.f.) Spreng seed cryopreservation on subsequent seed and seedling growth and biochemistry. *Acta Physiologiae Plantarum* 42:7. Doi:<https://doi.org/10.1007/s11738-020-3012-9>.

Andrés, P., C. Salgado and J. M. Espelta. 2011. Optimizing nursery and plantation methods to grow *Cedrela odorata* seedlings in tropical dry agroecosystems. *Agroforestry Systems* 83:225–234. Doi:<https://doi.org/10.1007/s10457-011-9404-5>.

Arguedas, M., A. Villalobos, D. Gómez, L. Hernández, B. Zevallos, I. Cejas, L. Yabor, M.E. Martínez-Montero and J. C. Lorenzo. 2018. Field performance of cryopreserved seed-derived maize plants. *CryoLetters* 39(6):366-370. http://www.cryoletters.org/Abstracts/vol_39_6_2018.htm#366 (31 de agosto de 2021).

Czabator, F. J. 1962. Germination Value: An index combining speed and completeness of pine seed germination. *Forest Science*. 8(4):386-396. Doi:<https://doi.org/10.1093/forestscience/8.4.386>.

Cejas, I., K. Vives, T. Laudat, J. González-Olmedo, F. Engelmann, M. E. Martínez-Montero and J. C. Lorenzo. 2012. Effects of cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. seeds on early stages of germination. *Plant Cell Reports*. 31:2065-2073. Doi:<https://doi.org/10.1007/s00299-012-1317-x>.

Conover, W. J. 2012. The rank transformation-an easy and intuitive way to connect many nonparametric methods to their parametric counterparts for seamless teaching introductory statistics courses: The rank transformation. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Computational Statistics*. 4(5):432-438. Doi:<https://doi.org/10.1002/wics.1216>.

Da Costa N., E., E. E. Benson, A. C. Oltramari, P. S. Araújo, J. R. Moser and A. M. Viana. 2003. *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae): a native tree of the Brazillian Atlantic Forest. *Biodiversity & Conservation* 12:837-48. Doi:<https://doi.org/10.1023/A:1022492226341>.

Dussert, S., N. Chabrillange, G. Rocquelin, F. Engelmann, M. Lopez and S. Hamon. 2001. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultralow temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition and cooling procedure. *Physiologia Plantarum* 112:495-504. Doi:<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120406.x>.

Engelmann, F. and S. Dussert. 2013. Cryopreservation. *In*: Normah, M., H. Chin and B. Reed (eds.). Conservation of Tropical Plant Species. Springer, New York, NY. USA. pp.107-119. Doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3776-5_6.

Gantait, S., U. R. Sinniah, G. Shukla and N. C. Sahu. 2017. Cryoconservation Methods for Extended Storage of Plant Genetic Resources. *In*: Ansari, A. A., S. S. Gill, Z. K. Abbas and M. Naeem (eds.). Plant biodiversity: monitoring, assessment and conservation. CABI. pp. 458–464. Doi:<http://dx.doi.org/10.1079/9781780646947.0458>.

García R., T. y A. Abdelnour E. 2013. Crioconservación de ápices y semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante las técnicas de vitrificación y deshidratación. *Agronomía Costarricense* 37(1):113-126. Doi:<https://doi.org/10.15517/rac.v37i1.10717>.

González-Zertuche, L. y A. Orozco-Segovia. 1996. Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 58:15-30. <https://www.botanicalsciences.com.mx/index.php/botanicalSciences/article/view/1484> (12 de julio de 2021).

Hirano, T., T. Godo, K. Miyoshi, K. Ishikawa, M. Ishikawa y M. Mii. 2009. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. *Plant Biotechnology Reports* 3:103–109. Doi:<https://doi.org/10.1007/s11816-008-0080-5>.

Hor, Y. L., Y. J. Kim, A. Ugap, N. Chabrilange, U. R. Sinniah, F. Engelmann and S. Dussert. 2005. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: Citrus as a case study. *Annals of Botany* 95(7):1153-1161. Doi:<https://doi.org/10.1093/aob/mci126>.

International Seed Testing Association (ISTA). 2016. Reglas internacionales para el análisis de las semillas. https://vri.umayor.cl/images/ISTA_Rules_2016_Spanish.pdf (31 de agosto de 2021).

Juárez-Agis, A., J. López-Upton, J. J. Vargas-Hernández y C. Sáenz-Romero. 2006. Variación geográfica en la germinación y crecimiento inicial de plántulas de *Pseudotsuga menziesii* de México. *Agrociencia* 40(6): 783-792. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/509> (31 de agosto de 2021).

Kim, H. H., Y. G. Lee, D. J. Shin, H. C. Ko, J. G. Gwag, E. G. Cho and F. Engelmann. 2009. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters* 30(5):320-334. http://www.cryoletters.org/Abstracts/vol_30_5_2009.htm#320 (31 de agosto de 2021).

Kruskal, W. H. and W. A. Wallis. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47(260):583-621. Doi:<https://doi.org/10.2307/2280779>.

Leiva, M. J. and R. Fernández A. 1998. Variability in seedling water status during drought within a *Quercus ilex* subsp. *ballota* population, and its relation to seedling morphology. *Forest Ecology and Management* 111(2-3):147-156. Doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(98\)00320-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(98)00320-X).

Mark, J. and M. C. Rivers 2017. *Cedrela odorata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T32292A68080590. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T32292A68080590.en> (6 de agosto de 2021).

Michalak, M., B. P. Plitta, T. Tylkowski, P. Chmielarz and J. Suszka. 2015. Desiccation tolerance and cryopreservation of seeds of black poplar (*Populus nigra* L.), a disappearing tree species in Europe. *European Journal of Forest Research* 134(1):53-60. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10342-014-0832-4>.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497. Doi:<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

Nishizawa S, A. Sakai, Y. Amano and T. Matsuzawa. 1993 Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L. Osb.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* 91(1):67-73. Doi:[https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90189-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90189-7).

Pennington, T. D. y J. Sarukhán. 2005. Árboles Tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. UNAM/FCE. México D.F., México. 523 p.

Pita, J. M., V. Sanz and A. Escudero. 1998. Seed cryopreservation of seven Spanish native pine species. *Silvae Genetica* 47(4):220-223. https://www.thuenen.de/media/institute/fg/PDF/Silvae_Genetica/1998/Vol._47_Heft_4/47_4_220.pdf (31 de agosto de 2021).

Prieto P., J. A. y J. T. Sáenz. 2011. Indicadores de la calidad de planta en viveros de la sierra madre occidental. Libro Técnico Núm. 3. Campo Experimental Valle del Guadiana. Centro de Investigación Regional Norte Centro. INIFAP. Durango, Dgo. México. 212 p.

Rodríguez T., D. A. 2008. Indicadores de calidad de planta forestal. Mundi-Prensa. Madrid, España. 156 p.

Ruano M., J. R. 2003. Viveros forestales. Manual de cultivo y proyectos. Mundi-Prensa. Madrid, España. 281 p.

Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports 9(1):30-33. Doi:<https://doi.org/10.1007/BF00232130>.

Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). 2019. Modificación del Anexo Normativo III, Lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. 30 de diciembre de 2010. DOF. Ciudad de México, México. 108 p.

Viveros V., H., J. D. Hernández P., M. V. Velasco García, R. Robles S., C. Ruiz M., C., A. Aparicio R., M. D. J. Martínez H., J. Hernández V. y M. L. Hernández H. 2015. Análisis de semilla, tratamientos pregerminativos de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. y su crecimiento inicial. Revista mexicana de ciencias forestales, 6(30): 52–65. Doi:<https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i30.207>.

Volk, G. M., J. Crane, A. M. Caspersen, L. M. Hill, C. Gardner and C. Walters. 2006. Massive cellular disruption occurs during early imbibition of *Cuphea* seeds containing crystallized triacylglycerols. Planta 224(6):1415-1426. Doi:<https://doi.org/10.1007/s00425-006-0310-4>.



Todos los textos publicados por la **Revista Mexicana de Ciencias Forestales** –sin excepción– se distribuyen amparados bajo la licencia *Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional)*, que permite a terceros utilizar lo publicado siempre que mencionen la autoría del trabajo y a la primera publicación en esta revista.