

Universidad Nacional del Comahue
Asentamiento Universitario San Martín de los Andes



Carrera: Técnico Universitario Forestal

Práctica Laboral

**Análisis de viabilidad de semillas de *Austrocedrus chilensis*,
Nothofagus obliqua y *Nothofagus nervosa*, que están en crioconservación
en el banco de germoplasma vegetal de semillas.**



Estudiante: Reinaldo Gerónimo

Legajo: AUSMA-120

Supervisor: Téc. Ftal. Esp. Uriel Mele

Julio 2023

Índice

Resumen	pág.3
Palabras claves	pág.3
Introducción.....	pág.3
Objetivo general.....	pág.4
Objetivos particulares	pág.4
Actividades	pág.5
Cronograma de trabajo	pág.5
Instrumental y Insumos utilizados	pág.5
Metodología y procedimientos	pág.6
Determinación de la viabilidad por corte	pág.7
Ensayo bioquímico de viabilidad por sal de tetrazolio	pág.8
Resultados	pág.9
Conclusiones	pág.9
Grado de aprovechamiento alcanzado	pág.10
Bibliografía	pág.11

Resumen:

Se trabajó con el proyecto de Extensión de la Universidad Nacional del Comahue, denominado “Instalación y puesta en marcha de un banco de germoplasma vegetal para la conservación de los ecosistemas de bosques nativos de la provincia de Neuquén (BGVN)” retomando y continuando con la observación y posterior Análisis de viabilidad de semillas de *Austrocedrus chilensis*, *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus nervosa*, que están en crioconservación en el banco de germoplasma vegetal de semillas en el laboratorio del Asentamiento Universitario de San Martín de los Andes, Neuquén, Argentina.

Palabras claves:

Banco de germoplasma vegetal. *Nothofagus obliqua*. *Nothofagus nervosa*. Crioconservación. *Austrocedrus chilensis*. Viabilidad

Introducción:

El objeto de estudio de la práctica laboral, es la continuación de un Plan de Conservación de la Dirección General de Recursos Forestales de la Provincia del Neuquén presentado y avalado por la Autoridad Nacional de Aplicación de la Ley Nacional 26.331 de Presupuestos Mínimos de Protección Ambiental de los Bosques Nativos y del decreto Reglamentario 91/2009, la Ley Provincial 2.780 Ordenamiento Territorial de los Bosques Nativos de la Provincia de Neuquén y su Decreto Reglamentario 1837/12, como así también en el marco de un Proyecto de Extensión de la Universidad Nacional del Comahue, denominado “Instalación y puesta en marcha de un banco de germoplasma vegetal para la conservación de los ecosistemas de bosques nativos de la provincia de Neuquén (BGVN)”.

Trabajar con semillas tiene sus ventajas, es un material práctico para recolectar, transportar y almacenar, también permite realizar con eficiencia, estudios de biodiversidad, de viabilidad y permite trabajar la variación genética presente en toda una población.

Con respecto a la conservación de las semillas, se define como una forma de mantener a esa parte de la planta en el tiempo y espacio. La mejor forma de conservar las especies y sus genes es a través de la conservación evolutiva, en sus hábitats naturales (Ledig, 1986) llamada también conservación “in situ”. Para reforzar la conservación “in situ” se implementan mecanismos de conservación estática, los que apuntan al mantenimiento de la diversidad genética fuera de su hábitat natural, denominada también conservación “ex situ”.

Los Bancos de Germoplasma Vegetal son reservorios de semillas u otros materiales de reproducción, cuyo objetivo principal es la conservación (ex situ), y a través de ellos de la variabilidad genética de las especies. La conservación de las semillas es de vital importancia para la humanidad y afrontar el cambio climático.

La conservación sostenible de los recursos genéticos depende de la eficacia del personal que trabaja en los bancos de germoplasma, cuyo papel es de suma importancia para garantizar que el germoplasma se conserve de manera efectiva y eficiente.

Los bancos de germoplasma son resguardos genéticos para la conservación de paisajes productivos dentro del Plan de Acción Nacional de Bosques y Cambio Climático.

Las especies del género *Nothofagus* son linajes antiguos que han desarrollado adaptaciones a lo largo de su historia evolutiva y, por lo tanto, tendrían el potencial de responder a cambios en el clima.

Nothofagus nervosa (Raulí) y *Nothofagus obliqua* (Roble Pellín), empiezan a producir semillas aproximadamente a los 20 años de edad. Produciendo mayor número de semillas los árboles maduros, dominantes, aislados, también depende de la edad, posición social, calidad de sitio y aptitud genética. También la producción de semillas varía según la latitud, altitud y las condiciones climáticas de cada año. La mayor cantidad de semilla en un árbol se concentra en el sector de la copa más iluminada por el sol. Ésta es una de las razones por la que los árboles aislados son mejores productores de semilla.

La floración de estas especies es cíclica, hay estudios que confirman que la tendencia de la floración es bianual.

La dispersión de las semillas de *Nothofagus*, es a través de la gravedad y del viento, pero debido a su peso y al pobre desarrollo de sus alas, las semillas no se dispersan a largas distancias.

En el caso del *Austrocedrus chilensis* (Ciprés de la cordillera) las funciones sexuales de esta especie están separadas en distintos individuos, árboles femeninos y masculinos (especie dioica). Las semillas tienen unos 8mm de largo, incluyendo un ala membranosa adnata, unilateral y su peso medio es de 3,94 g por 1000 unidades, produciendo normalmente 4 semillas por cono. Como muchas especies forestales, el ciprés presenta ciclicidad en la producción de semillas, Hay años de baja y años de alta productividad, con extremos excepcionales tanto por alta como por baja productividad. El ciclo completo de la formación de las semillas se produce en un año. Las fechas de ocurrencia de los distintos estadios fenológicos de este ciclo varían según la latitud, la altitud y las condiciones climáticas de cada año.

Objetivo general:

✓ Conocer la viabilidad de las semillas de tres especies nativas de importancia forestal que habitan en el Bosque Andino Patagónico, *Nothofagus nervosa* (Raulí), *Nothofagus obliqua* (Roble Pellín) y *Austrocedrus chilensis* (Ciprés de la cordillera), las mismas se encuentran en conservación desde el año 2020, en el Banco de Germoplasma, que funciona en el laboratorio del Asentamiento Universitario San Martín de los Andes AUSMA- UNCo.

Objetivos particulares:

✓ Conocer la viabilidad de las semillas, que se encuentran ingresadas en el Banco de Germoplasma en el año 2018, y desde el año 2020 conservadas a una temperatura de -20°C en freezer (Crio-conservación), para el caso de los datos de calidad, utilizando los métodos físicos (viabilidad al corte) y el ensayo bioquímico (viabilidad con sal de tetrazolio)

✓ Adquirir experiencia, habilidad, destreza en el análisis de viabilidad de las semillas en el laboratorio.

Actividades:

- 1) Revisión bibliográfica
- 2) Relevamiento de insumos de laboratorio del AUSMA
- 3) Preparación de soluciones químicas.
- 4) Revisión de estado de las semillas a ensayar
- 5) Acondicionamiento de semillas para los ensayos (Reglas ISTA)
- 6) Ensayo de viabilidad al corte
- 7) Ensayo de viabilidad a través de la prueba topográfico (sal de tetrazolio)
- 8) Análisis de resultados
- 9) Elaboración de informe final

Cronograma de trabajo

Actividades	MESES				
	Marzo semanas		Abril semanas	Mayo Junio 1ª semana	
1	x				
2		x			
3			x		
4				x	
5			x		
6				x	
7			x	x	
9					x

Instrumental y Insumos utilizados:

- Equipo de baño termostático
- Balanza analítica de precisión
- Bisturí
- Espátulas
- Pinzas
- Lupa de mano
- Lupa electrónica
- Erlenmeyer
- Cajas de petri
- Tubos de ensayo
- Envases color caramelo
- Papel de aluminio
- Frascos

- Calculadora
- Cámara fotográfica
- Pipeta graduada
- Agua destilada
- Sales de KH_2PO_4 , Na_2HPO_4
- Sal de tetrazolio
- Cámara de frío
- Normas ISTA
- Semillas
- Marcador
- Cuaderno

Metodología y procedimientos:

* Lectura de la norma ISTA.

* La selección de las muestras de semillas para realizar el trabajo, se obtuvieron de la colección del banco de germoplasma, las mismas se encuentran a una temperatura de -20°C . La selección consistió en tomar un grupo de semillas al azar de las cuales se seleccionaron submuestras de 100 semillas, esta metodología se repitió para las tres especies con la que se trabajó.

* Se llevo a cabo el relevamiento de todos los insumos presentes en el laboratorio del AUSMA, proceso necesario que se realizó para saber si contamos con las soluciones y sales e instrumentos adecuadas para ejecutar los ensayos.

El ensayo topográfico por tetrazolio, usa como indicador una solución incolora de cloruro o bromuro de 2,3,5–trifenil tetrazolio para detectar los procesos de reducción que tienen lugar dentro de las células vivas. Este indicador es embebido por la semilla y en los tejidos de la misma interactúa con los procesos de reducción de las células vivas tomando el hidrógeno liberado por las deshidrogenasas.

Por hidrogenación del cloruro de 2,3,5–trifenil tetrazolio, se forma en las células vivas una sustancia roja, estable y no difusible denominada trifetil formazan. De esta manera se pueden distinguir las partes vivas de las semillas coloreadas de rojo, de aquellas muertas no coloreadas.

Se utiliza una solución acuosa de cloruro o bromuro de 2,3,5-trifenil tetrazolio con pH 6,5-7,5. La concentración normalmente usada es de 1,0%. Se utilizó agua destilada en la preparación y la solución de tetrazolio con un pH entre 6,5 y 7,5. Esta solución se emplea, para obtener un correcto rango de pH. Se utilizó 1 g de sal de tetrazolio en 100 ml de buffer para obtener una solución al 1%.

* Preparación de las soluciones químicas para el ensayo con sal de tetrazolio.

Solución 1 – se disolvieron 9,078 g de KH_2PO_4 en 1000 ml de agua destilada

Solución 2 - se disolvieron 9,472 g de Na_2HPO_4 en 1000 ml de agua destilada

Se mezclaron dos partes de solución 1 con tres partes de solución 2 y se controló el pH, que estuviera en el rango de 6,5-7,5.

La mezcla de las soluciones se las almacenó en botella de vidrio color caramelo para evitar el contacto con la luz y se reduzca la solución.

* La revisión del estado sanitario de las semillas, se realizó a simple observación ocular y las dudosas con lupa binocular.

* A todas las semillas se las puso en remojo en agua corriente durante 24 horas, previo al análisis. Posteriormente se procedió a realizar un corte transversal a cada una de las semillas y se observó si las mismas estaban llenas o vacías, o en su defecto con algún daño físico. Las llenas fueron las que se introdujeron en la solución de la sal de tetrazolio.

* Luego de realizado los cortes las semillas fueron colocadas en la solución de tetrazolio, en distintos tubos de ensayo y puestos en baño maría en un baño termostático a 28° C. durante 8 horas, esto se realizo para lograr la tinción y luego proceder a su análisis utilizando lupa binocular electrónica y lupa de mano.

* Para los análisis de los resultados se tomó como base el método %

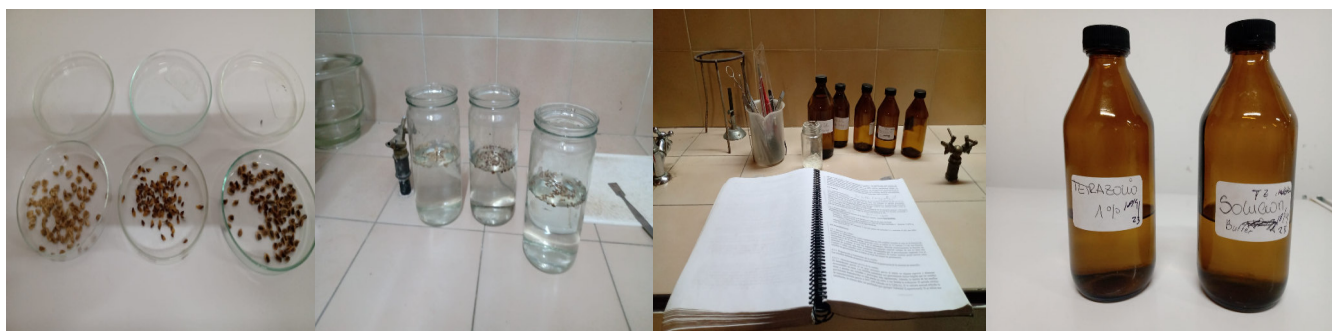


Foto N1, submuestras de semillas de Roble pellin, Cipres y Rauli.

Foto N2, Semillas en remojo

Foto N3, regla ISTA

Foto N4, soluciones buffer

Viabilidad (Según capítulo) 6 Reglas ISTA:

Determinación de la viabilidad.

La viabilidad de las semillas, es una variable fisiológica indicadora del potencial de ésta para dar origen a una nueva planta. Es muy importante que las semillas almacenadas en un banco de germoplasma puedan producir plantas cuando se las siembra en el campo. Para garantizar esto las semillas deben tener una viabilidad alta al inicio del almacenamiento y mantenerlas el tiempo que se requiera.

Determinación de la viabilidad por corte:

El objetivo del ensayo de viabilidad por corte consistió en observar con precisión el contenido del embrión de las semillas. Para esto se procedió a analizar una submuestra de 100 semillas, de cada especie y se las realizó un corte transversal y se las observo utilizando lupa binocular electrónica y manual, Luego se definió caracterizar, como llenas o vanas.

Los resultados se definieron de forma porcentual (%).



Foto N1, análisis con lupa binocular



Foto N2, Lupa Binocular electrónica



Foto N3. muestra de Roble pellin.

Ensayo bioquímico de viabilidad por sal de tetrazolio:

Para este ensayo se utilizó las mismas muestras de semillas cortadas transversalmente, con la que se evaluó la viabilidad (al corte). Se puso las semillas en tubos de ensayo, que contenían la solución de cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio, luego se las colocó en un baño termostático durante 8 hs a 20°C y en oscuridad, luego del plazo mencionado se hizo un conteo de las semillas por su coloración.

Se clasificaron en semillas teñidas y no teñidas, para observar la tinción del embrión con más precisión, se utilizó una lupa electrónica de 20 de aumento, de esta forma se pudo clasificar en, semillas viables y semillas no viables. El conteo se expreso en porcentaje (%).

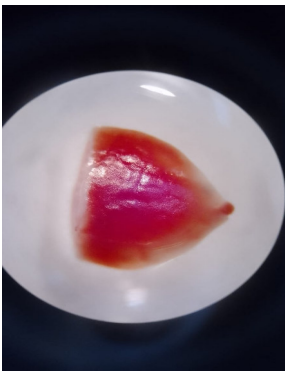


Foto N1y N2, tinción de semilla de Ciprés de la cordillera.

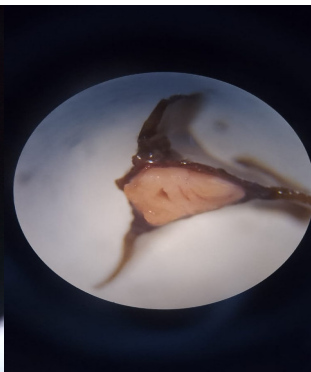
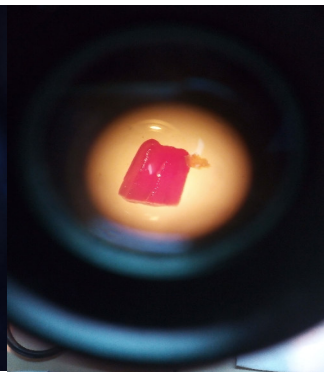


Foto N3, tinción de semilla de Roble pellin

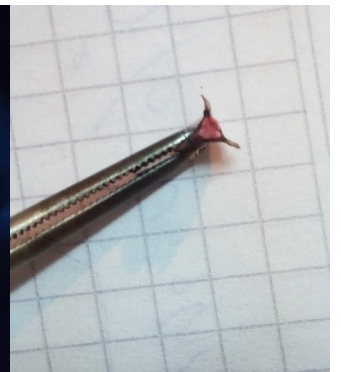


Foto N4, tinción de semilla de Rauli.

Resultados

Las tablas representan los resultados de los análisis de semillas efectuados en la descripción anterior.

Análisis de viabilidad de *Nothofagus nervosa* (Raulí)

Métodos	viabiles	No viabiles
Muestra de 100 semillas Al corte	60%	40%
Tetrazolio	54%	46%

Análisis de viabilidad de *Nothofagus obliqua* (Roble pellin)

Métodos	Viabiles	No viable
Muestra de 100 semillas Al corte	51	94
Tetrazolio	35	65

Análisis de viabilidad de *Autrocedrus chilensis* (ciprés de la codillera)

Métodos	Viabiles	No viabiles
Muestra de 100 semillas Al corte	90	10
Tetrazolio	78	22

Conclusiones:

El almacenamiento de semillas ha sido una práctica habitual, ya sea para su siembra o para su uso como alimento. No obstante, no es hasta mediados del siglo XX cuando se comienzan a establecer instituciones dedicadas, de forma sistemática, a la conservación a largo plazo de semillas. En ellas las semillas desecadas se almacenan, en recipientes herméticos, en cámaras a bajas temperaturas. Sin embargo, dado que no todas las semillas son capaces de resistir la desecación, por lo tanto se distinguen dos grandes grupos:

- Semillas ortodoxas: Son semillas que permanecen viables después de su desecación (admiten ser desecadas hasta un 5-10% de contenido de humedad). La mayor parte de las semillas de las especies nativas de los ecosistemas boscosos de Patagonia pertenecen a este tipo (las tres especies ensayadas son semillas ortodoxas).
- Semillas recalcitrantes: Son semillas que pierden rápidamente su viabilidad al ser desecadas (su contenido de humedad no puede ser menor de un 2-30%). Suelen ser semillas de plantas tropicales y subtropicales, algunas de gran importancia económica como las del género *Araucaria*, *Araucaria araucana*, para citar una especie emblemática de la provincia del Neuquén.

Para la conservación a medio plazo, menos de 10 años, se recomienda la conservación de las semillas con un contenido de humedad del 7-8% y a una temperatura de almacenamiento comprendida entre 0°C y 10°C. Estas son colecciones que suelen utilizarse con diversos fines, tales como investigación básica, caracterización o programas de mejora genética.

El Banco de Germoplasma del AUSMA, utiliza de sistemas de conservación alternativos, como la crioconservación de las semillas -20°C , bajo éstas temperaturas se detiene por completo el metabolismo, con ella se asegura, en teoría la viabilidad indefinida del material almacenado. Los dos métodos de análisis que se utilizaron para determinar la viabilidad de las semillas de *Austrocedrus chilensis* (Ciprés de la Cordillera), *Nothofagus obliqua* (Roble Pellín) y *Nothofagus nervosa* (Raulí) que se encuentran conservadas en el banco de germoplasma (BGVN) que funciona en el AUSMA, fueron viabilidad al Corte y el ensayo Bioquímico de Tetrazolio. Estos métodos de análisis de viabilidad también fueron utilizados en el año 2018 para el ingreso de las muestras al banco de germoplasma y en el año 2020 en la práctica laboral del estudiante Daniel Casin.

Los resultados de análisis de viabilidad de las semillas de las especies *Austrocedrus chilensis* (Ciprés de la Cordillera), *Nothofagus obliqua* (Roble Pellín) y *Nothofagus nervosa* (Raulí), que están en conservación en el banco de germoplasma (BGVN), son similares a los que se obtuvo en el año 2018 y 2020. Los porcentaje se mantuvieron e indica que las semillas conservadas en el banco de germoplasma, mantuvieron su viabilidad, sus condiciones de sanidad para afirmar que el método de crioconservación, para las especies estudiadas en esta práctica laboral, resultó hasta el momento, muy eficiente.

El banco de germoplasma es una fuente de reserva de material genético para en el futuro afrontar el cambio climático y la conservación de las especies nativas forestales del bosque andino patagónico.

Grado de aprovechamiento alcanzado

La Práctica Laboral me ha formado en técnicas de análisis de evaluación de calidad de semillas de las especies de los bosques andino patagónicos, en familiarizarme con la aplicación de conceptos básicos de química, matemática y estadística y uso de elementos e insumos de laboratorio.

He repasado e incorporado conceptos de resguardo genético, mejoramiento y calidad del material genético, características y manipulación de las semillas, como así también la importancia de trabajar en temas de conservación, resguardo y acondicionamiento del material genético para garantizar la perpetuidad de las especies para las próximas generaciones.

Bibliografía

1. Kameswara Rao N. 2007. "Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma". Bioversity International, FAO.
2. Premoli,A. 2012."Variación genética en *Nothofagus* (subgénero *Nothofagus*)". C.R.U.B.,Universidad CONICET del Comahue
3. Pastorino M.; Aparicio A.; Azpilicueta M. Sabatier Y. 2015 "Regiones de procedencia del Ciprés de la Cordillera y bases conceptuales para el manejo de los recursos genéticos en Argentina." INTA.
4. REGLAS ISTA, 2009.
5. Daniel Casin. 2018 "Práctica Laboral: Caracterización biológica y acondicionamiento para la crioconservación en un banco de germoplasma vegetal de semillas de *Austrocedrus chilensis*, *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus nervosa*. Asentamiento Universitario San Martín de los Andes, Universidad Nacional del Comahue.