



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

“Crio-conservación de variedades del género *Phaseolus* mediante la viabilidad en la Parroquia Quiroga, Cantón Cotacachi”

“Cryo-preservation of varieties of the genus *Phaseolus* through viability in Quiroga Parish, Cotacachi Canton”

María Fernanda López^{1*}; Santiago Andrés Bravo Palacios¹

¹Pontificia Universidad Católica Sede Ibarra, Av Aurelio Espinosa Pólit, Ibarra – Ecuador.

Escuela de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Carrera de Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo, Herbario.

* Correspondencia: e-mail: mflopez2@pucesi.edu.ec.

Resumen

La Parroquia Quiroga del Cantón Cotacachi posee una amplia gama de variedades nativas del género *Phaseolus*, este es un género que pertenece a la familia Fabaceae, son conocidos como fríjol, fréjol o poroto, pero en los últimos años las variedades de este género han sufrido una disminución de su variabilidad genética, debido los impactos antropogénicos perdiendo así los conocimientos ancestrales del lugar. Por esta razón se ha visto la necesidad de conservar la genética de las variedades del género *Phaseolus*, mediante la crioconservación para mantener su viabilidad en función del tiempo. Dentro de la investigación se realizó la identificación de la zona de estudio, estableciendo cinco puntos de muestreo, donde se llevó a cabo la colecta de 23 variedades fréjol. Posteriormente se realizó el protocolo de crioconservación a través de la técnica “dsecación y congelación rápida de semillas”, donde las muestras fueron sometidas a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido, como comparador se utilizó la técnica tradicional de “almacenamiento en frío de semillas”, donde las muestras fueron sometidas a una temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, estas dos pruebas se llevaron a cabo por un periodo de 6 meses. Al finalizar la investigación se logró demostrar la eficacia de la Crioconservación, ya que las semillas sometidas al tratamiento con nitrógeno líquido mantuvieron su viabilidad con un 83% de poder germinativo, mientras que las semillas sometidas a la técnica tradicional de congelación fueron perdiendo su viabilidad obteniendo un 43% de poder germinativo.

Palabras clave: Crioconservación, nitrógeno líquido, *Phaseolus*, semillas, viabilidad.

Abstract

The Quiroga of Cotacachi has a wide range of native varieties of the genus *Phaseolus*, this is a genus that belongs to the Fabaceae family, they are known as beans, beans or beans, but in recent years the varieties of this genus have suffered a decrease of its genetic variability, due to the anthropogenic impacts thus losing the ancestral knowledge of the place. For this reason, it has been seen the need to conserve the genetics of the varieties of the genus *Phaseolus*, through cryopreservation to maintain their viability as a function of time. Within the investigation, the study area was identified, establishing five sampling points, where the collection of 23 bean varieties was carried out. Subsequently, the cryopreservation protocol was carried out through the “rapid drying and freezing of seeds” technique, where the samples were subjected to a temperature of $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in liquid nitrogen, as a comparator the traditional technique of



“cold storage” was used. of seeds”, where the samples were subjected to a temperature of -10 ° C, these two tests were carried out for a period of 6 months. At the end of the investigation it was possible to demonstrate the effectiveness of Cryopreservation, since the seeds subjected to the treatment with liquid nitrogen maintained their viability with 83% germination power, while the seeds subjected to the traditional freezing technique were losing their viability obtaining 43% germination power.

Keywords: Cryopreservation, liquid nitrogen, Phaseolus, seeds, viability.

Introducción

A nivel mundial existen miles de bancos de semillas, cuyos recursos genéticos almacenados son de vital importancia para los humanos, el equilibrio de los ecosistemas y para asegurar la biodiversidad existente en el planeta (Doria, 2013).

Según Vélez (2017), el Banco Mundial de Semillas de SVALBARD (Svalbard Global SeedVault) situado en la isla Spitsbergen en Noruega, es el almacén más grande de semillas del mundo, que fue creado con el fin de salvaguardar la biodiversidad de las especies alimenticias cultivadas, que servirán en caso de una catástrofe mundial.

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura), afirma desempeñar un papel fundamental en fortalecer la conservación y el uso sostenible de los recursos fitogenéticos, mediante apoyo técnico, asistencia política y sensibilización, a través de actividades claves como son; el fortalecimiento de los programas de producción, diversificación y multiplicación de semillas de primera generación, para formar programas de sistemas comunitarios y así mejorar los conocimientos ancestrales y habilidades de los agricultores (FAO, 2014).

En Costa Rica datan estudios de crioconservación de ápices y semillas de cedro mediante técnicas de crioconservación que permitieron la sobrevivencia y germinación de esta especie amenazada asegurando la proliferación de la misma. De tal forma en Brasil existen ensayos que señalan protocolos para el almacenamiento de medio a largo plazo de semillas de especies de árboles forestales

(García Rojas & Abdelnour Esquivel, 2017).

En el Ecuador el INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias), ha visto la necesidad de aunar esfuerzos para invertir recursos, creando un espacio de exhibición, difusión de la riqueza y diversidad de los recursos genéticos alimenticios que posee, de esta manera promover la importante labor de la conservación de semillas (Morales, 2015).

Por ende, es cada vez más importante el almacenamiento y catalogación del material genético viable en los bancos de semillas y genes, estadísticas señalan que existe una extinción masiva perdiéndose 30.000 especies cada año provocando una fase de amenaza para la biodiversidad del mundo (FAO, 2014).

En la Parroquia Quiroga del Cantón Cotacachi se realizó esta investigación acerca de la crioconservación de diferentes variedades nativas del género Phaseolus, con el fin de mantener su viabilidad en función del tiempo, y así contrarrestar la erosión genética en la zona de estudio, además de que no se han registrado estudios relacionados de este tipo.

Las principales causas de la erosión genética de estas variedades son; la pérdida de la cultura ancestral, el remplazo por variedades comerciales mejoradas y la existencia de monocultivos, generando un grave impacto a las semillas autóctonas (Murillo, 2009).

La conservación de semillas favorece en disminuir el peligro de extinción de una especie o variedades en particular, aportando

al crecimiento de la producción agrícola en el sector y a la vez asegurando la supervivencia de las variedades nativas del género *Phaseolus*.

Si no se conservan las semillas, se irá perdiendo la diversidad genética autóctona de variedades de fréjol nativo en Cotacachi, hasta el punto de extinguirse a nivel local, disminuyendo su rendimiento y variabilidad, además las semillas son la base fundamental para el sustento humano y conservación de la biodiversidad, además de aportar el potencial genético de especies, y sus variedades.

La técnica de crioconservación que se empleó fue la desecación y congelación rápida de semillas en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C , con el fin de almacenar las semillas a largo plazo y así conservar la diversidad genética (Pressreader, 2015).

Los objetivos planteados en esta investiga-

ción fueron a) Conservar la genética de variedades del género *Phaseolus* mediante la crioconservación en el banco de germoplasma PUCE-SI b) Identificar la zona de estudio mediante el establecimiento de puntos de muestreo c) Establecer el método y protocolo de crioconservación en variedades del género *Phaseolus*.

Materiales y Métodos

Fase 1 zona de estudio y fase de campo
En una primera fase se identificó la zona de estudio mediante el establecimiento de puntos de muestreo, en donde se llegó a realizar la colecta de las variedades del género *Phaseolus*. La Figura 1, representa un mapa de la Parroquia Quiroga conjuntamente con cinco puntos de muestreo, que simbolizan cada una de las comunidades en donde se realizó la colecta de las veintitrés variedades del género *Phaseolus*.

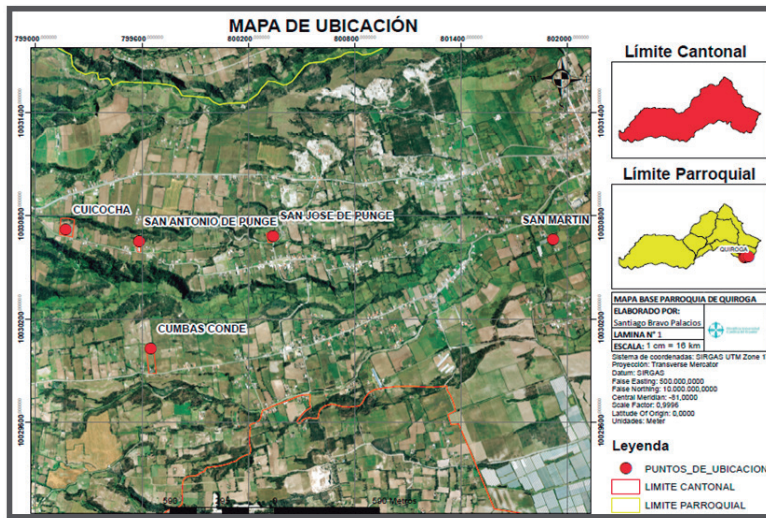


Figura 1. Puntos de muestreo de la colecta de las variedades del género *Phaseolus*.

Fuente: (GADPRO QUIROGA, 2016)

Dentro de esta primera fase se realizaron algunas metodologías las cuales se describen a continuación:

Diagnóstico para identificar la zona de estudio

Para identificar el área de estudio se realizó

la siguiente metodología: Se acudió a la organización UNORCAC (Unión de Organizaciones Campesinas Indígenas de Cotacachi), con la finalidad de recabar información para identificar la zona de estudio, donde el Presidente Sr. Luis Alfonso Morales, autorizó el acceso a la Parroquia Quiroga, para realizar el levantamiento de información y

obtener los datos pertinentes para la colecta. Establecimiento de los puntos de muestreo Los sitios de colecta se establecieron mediante el “Catálogo de Agrobiodiversidad del Cantón Cotacachi” proporcionado por la UNORCAC a través de salidas de campo, se pudo acceder a familias participantes de dicho catálogo, que tienen en sus hogares cultivos mixtos y aún preservan las semillas ancestrales del género *Phaseolus*. Para la selección de las muestras botánicas se eligió a veintitrés variedades de treinta y nueve que existen en este catálogo. La toma de coordenadas hizo referencia a los predios de las familias participantes, donde se pudo evidenciar las variedades nativas del género *Phaseolus*. Utilizando un GPS Garmin para realizar la toma de puntos de referencia en la zona de estudio, en los cuales se encontró el material botánico (Espinel, 2015).

Caracterización de la zona de estudio

La caracterización de la zona de estudio, se realizó en base de la información obtenida en la fase de campo, por medio de referencias bibliográficas, publicaciones, artículos y documentos, donde se describe los siguientes aspectos: el área general y específica que abarca la investigación, las razones porque se eligió la Parroquia Quiroga como área de estudio en conjunto con sus comunidades, sus límites políticos y administrativos, altitud y clima, la división política, su población, extensión territorial, el idioma y actividades económicas. La georeferenciación de la zona de estudio, se basó en cuenta cinco puntos de muestreo, donde a partir de estos se realizaron diferentes mapas mediante una herramienta de SIG (Sistema de Información geográfica), en el que consta; un mapa base del Cantón Cotacachi delimitando la Parroquia Quiroga y un mapa de los puntos de muestreo, donde se colectó las variedades del género *Phaseolus* con sus respectivas comunidades.

Caracterización y colecta de las semillas nativas del género *Phaseolus*
Se accedió a los predios de las distintas

comunidades de la Parroquia Quiroga, en las cuales se realizó la colecta de las veintitrés variedades del género *Phaseolus*:

Descripción morfológica de las semillas

La caracterización de las veintitrés variedades de este género, se realizó a través del “Catálogo de Agrobiodiversidad del Cantón Cotacachi”, proporcionado por la UNORCAC, mediante este se pudo identificar; la nomenclatura, información general, abundancia, el código registrado por el INIAP, usos y la descripción morfológica, todo esto por cada una de las muestras (Luca, 2014). Conjuntamente se realizó en las instalaciones del Banco de Germoplasma de la PUCESI, la determinación del número total de semillas buenas, malas, el peso total, medidas morfológicas (largo, ancho), la codificación de color y el porcentaje de humedad; a través del siguiente protocolo:

-Determinación del número de semillas: se realizó un conteo manual de semillas buenas, malas y totales.

-Determinación del peso de las semillas: se utilizó una balanza analítica, de la cual se obtuvo los resultados en gramos de cada una de las muestras.

-Determinación de las medidas morfológicas: se utilizó un calibrador, con el cual se obtuvo las medidas de largo y ancho de cada una de las muestras (Luca, 2014).

-Para la determinación del color se utilizó tablas colorimétricas, mediante en las cuales se obtuvo la codificación del color de cada una de las muestras.

Colecta e identificación de las variedades del género *Phaseolus*

En la Tabla 1, se puede apreciar las comunidades de la Parroquia Quiroga en donde se realizaron las colectas, con el número de variedades por comunidad, el nombre por el cual se conoce a cada muestra botánica y sus respectivas coordenadas de los puntos de muestreo en la zona de estudio. Mediante la

Tabla 1. Cuadro comparativo de la colecta de las variedades del género Phaseolus en las comunidades de la Parroquia Quiroga.

Comunidad	N° variedades	Variedades	Coordenadas	
			X	Y
Cuicocha	4	-Canario -Yana sucu poroto -Fréjol tomate -Fréjol bola	799169	10030717
San Antonio del Punge	5	-Matambre negro -Bolón rojo -Yana poroto -Sucu rayado -Chagra misturiado	799582	10030649
San José del Punge	4	-Puca pintado -Cargabello -Fréjol duro -Vaca barrosa	800336	10030681
Cumbas Conde	8	-Poroto capulí -Torta o Añas -Lichi vaca -Popayán morado -Yana vaca poroto -Fréjol vaquita pintada -Fréjol vaquita roja -Café pintado	799647	10030024
San Martín	2	-Popayán pintado -Poroto campeón	801916	10030660
TOTAL	23 Variedades			

Elaborado por: Bravo S. (2018)

Fase 2 análisis de laboratorio

Posteriormente se realizó la fase 2 que corresponde a los análisis de laboratorio establecimiento de esta manera el método y protocolo de crio conservación en variedades de semillas nativas del género Phaseolus para mantener su viabilidad, a continuación, se detalla la metodología utilizada:

Viabilidad de las semillas

Para evaluar la viabilidad de las semillas, se procedió a realizar tres pruebas de germinación antes, durante y después de la investigación y de esta manera saber cuál es el mejor método germinativo. Según Araya y Martí-

nez, (2013), dan a conocer tres métodos de germinación para semillas del género Phaseolus:

a) Método de cajas Petri. - Se toman diez semillas de cada una de las veintitrés muestras, seguido se procedió a colocar las muestras en cajas petri, donde fueron cubiertas con papel filtro absorbente en su interior y se humedeció con agua destilada. Estas muestras fueron sometidas en la cámara germinadora a una temperatura de 27°C, una humedad relativa del 60% y con una luminosidad del 50%, por un periodo de 15 días.

Transcurrido este periodo, se realizó un conteo manual para determinar las semillas

germinadas, no germinadas y contaminadas, por cada una de las muestras.

b) Método en papel toalla. - El método de papel toalla se considera uno de los más apropiados y de fácil aplicación para medir la germinación de las semillas. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

Se tomó diez semillas de cada una de las muestras, posteriormente se cortó dos pliegos de 30 cm de papel toalla y tres tiras de piola de 20 cm. Se puso un pliego de papel toalla sobre una superficie plana, el cual fue humedecido con agua destilada, después se colocó las diez semillas desde el borde del papel toalla con espacios de 1,5 cm, formando una hilera horizontal, a la vez se cubrió con otro pliego de papel toalla y se volvió a humedecer con agua destilada, se enrolla el papel toalla dando un giro cada dos muestras. La muestra obtenida se colocó en un recipiente plástico de un litro con 250 ml de agua destilada; este proceso se realizó para cada una de las veintitrés muestras. Una vez obtenidas todas las muestras se las sometió a la cámara germinadora, a una temperatura de 27°C, con una humedad relativa del 60% y una luminosidad del 50%, por un periodo de 15 días (Araya y Martínez, 2013)

Transcurridos 15 días, se realizó un conteo manual para determinar las semillas germinadas, no germinadas y contaminadas, por cada una de las muestras (Araya & Martínez, 2013).

c) Método en cajas con arena. - Se hizo una mezcla de arena con tierra fértil y se colocó en cada una de las bandejas. Se tomó diez semillas de cada una de las muestras, las cuales fueron sembradas y sometidas a condiciones ambientales normales por un periodo de 15 días, se regó pasando 2 días y se removió la tierra a los 7 días. Transcurrido 15 días, se realizó un conteo manual para determinar las semillas germinadas y no germinadas, por cada una de las muestras (Araya y Martínez, 2013).

d) Crio conservación. - El método de crio conservación consistió en someter las variedades de semillas del género *Phaseolus*, desde temperatura ambiente normal, hasta -196°C nitrógeno líquido, con el fin de que el material botánico sea almacenado a largo plazo y pueda mantener su viabilidad. Además como comparador estas mismas semillas se las almacenó en frío en un congelador a temperaturas entre -10 y -20°C. Estas técnicas se realizaron conjuntamente por un periodo de 6 meses.

Técnica de desecación y congelación rápida de semillas

Desecación. - Se tomaron tres réplicas de 10 semillas por cada una de las veintitrés variedades del género *Phaseolus*, seguido estas fueron colocadas en fundas ziploc en su interior con 1 gramo de sílica gel para su desecación, a cada una de estas muestras se las selló y se colocó su respectiva etiqueta.

Congelación en nitrógeno líquido. - Se utilizó un tanque de nitrógeno líquido de 20 litros, en el cual se seleccionó 3 crio-tubos, en cada uno de estos se colocaron 23 muestras que contienen 10 semillas por cada variedad. Los crio-tubos fueron introducidos directamente en el tanque de nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C, donde permanecieron por 6 meses.

Descongelamiento y viabilidad. - Transcurrido el segundo mes se extrajo un crio-tubo del tanque de nitrógeno líquido con sus respectivas muestras de semillas y colocados en baño María a 38° C, por un periodo de dos minutos para su descongelación. Posteriormente a las muestras se les realizó una prueba de viabilidad a través del mejor método germinativo cajas con arena y se demostró que mantienen la viabilidad. Este proceso se realizó a los dos crio-tubos sobrantes, al cabo del cuarto y el sexto mes de la investigación. (Aguilar, 2015).

Técnica de almacenamiento en frío de semillas

Se tomaron tres réplicas de 10 semillas por cada una de las veintitrés variedades del género *Phaseolus*, estas al igual fueron colocadas en fundas ziploc conjuntamente con 1 gramo de sílica gel, con el fin de absorber la humedad de las semillas, luego se las selló y se puso su respectiva etiqueta.

Congelamiento. - El congelamiento de las semillas del género *Phaseolus*, se realizó en un refrigerador con tres compartimentos, en cada compartimento se almacenó 23 muestras que contienen 10 semillas por cada variedad, a una temperatura de -10 a -20°C y por un periodo de 6 meses.

Descongelamiento y viabilidad. - Culminado el segundo mes se sacó las muestras de semillas de un compartimento del congelador, estas fueron sometidas a temperatura ambiente por un periodo de diez minutos

para su descongelación. Una vez descongeladas las muestras se sometieron a una prueba de viabilidad a través método cajas con arena. Este proceso se realizó a los dos compartimentos sobrantes del congelador, al cabo del cuarto y el sexto mes. Posteriormente se comparó los resultados obtenidos con la técnica de desecación y congelamiento rápido de semillas (Alvarenga, 2015).

Análisis estadístico de los métodos de conservación de semillas del género *Phaseolus*

Para comparar las dos técnicas de conservación de semillas, se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon Rank Sum a través del programa Statistix 10, el cual es una prueba para comparar el rango promedio de dos tratamientos relacionados, con el fin de determinar si hay una diferencia significativa entre los dos tratamientos (Turcios, 2015).

Resultados

Descripción general del género *Phaseolus*

En la Tabla 2, se muestra la descripción acerca del género del cual se hizo la investigación, donde señala aspectos importantes del género como son: características generales y su taxonomía.

Tabla 2. Taxonomía del género *Phaseolus*

Nombre científico del género: *Phaseolus*

Nombre común: Recibe diversos nombres en los países de habla castellana o latinoamericanos: frijol, frisol, fréjol, poroto, judía, alubia, habichuela, habilla, caraota, etc. El más difundido es frijol, término usado desde México hasta Panamá, en Cuba y en parte en Perú. En Colombia se denomina frijol y frisol, en Ecuador fréjol y en muchas regiones de Perú, Bolivia y Chile, fréjol.

División: Angiosperma

Clase: Dicotiledónea

Orden: Rosales

Familia: Fabaceae

Género: *Phaseolus*

Dentro de la fase de laboratorio de obtuvieron los siguientes resultados:

Viabilidad de las semillas del género *Phaseolus*

a) Método en cajas Petri

Este método se lo realizó en un periodo de 15

días, donde fueron sometidas las muestras a una cámara germinadora en condiciones controladas (temperatura, humedad relativa y luminosidad), para medir la germinación de las semillas. Mediante un conteo manual se logró determinar las semillas germinadas, no germinadas y contaminadas.

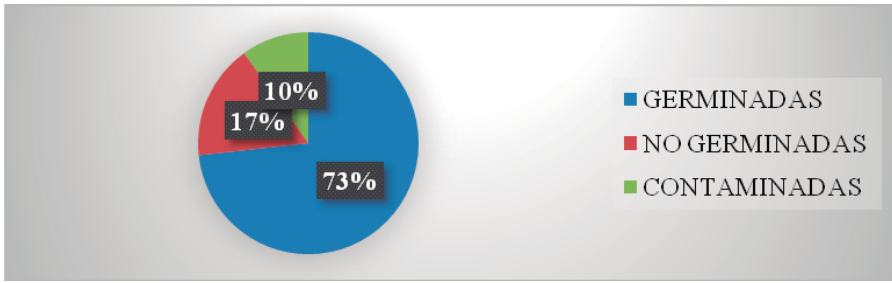


Figura 2. Gráfica del porcentaje de germinación del método en cajas petri.

Elaborado por: Bravo S. (2018)

En la Figura 2 se puede apreciar el porcentaje de germinación de las semillas del género *Phaseolus*, a través del método en cajas petri, el cual indica que el 73% de las semillas germinaron, el 17% no germinaron y el 10% se contaminaron, lo que muestra que existe viabilidad en las semillas al emplear este método de germinación.

Este fue otro método que sirvió para comprobar la germinación de las semillas, donde fueron sometidas a una cámara germinadora en condiciones controladas (temperatura, humedad relativa y luminosidad) en un periodo de 15 días. Finalmente se realizó un conteo manual donde se determinó las semillas germinadas, no germinadas y contaminadas.

b) Método en papel toalla

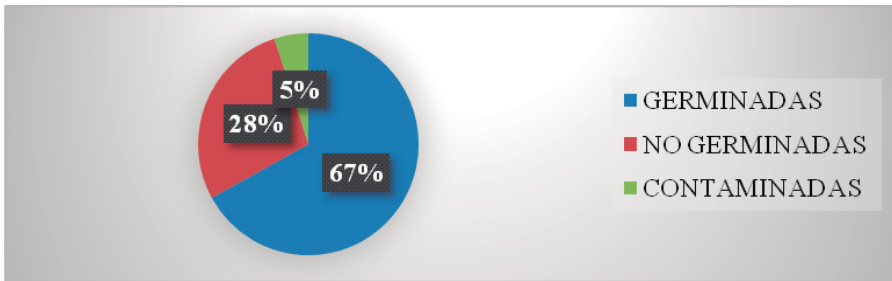


Figura 3. Gráfica del porcentaje de germinación del método papel toalla.

Elaborado por: Bravo S. (2018)

En la Figura 3 se puede apreciar el porcentaje de germinación de las semillas del género *Phaseolus*, a través del método en papel toalla, el cual indica que el 67% de las semillas germinaron, el 28% no germinaron y el 5%

% se contaminaron, lo que muestra que existe viabilidad en las semillas al utilizar este otro método germinativo.

c) Método en cajas con arena

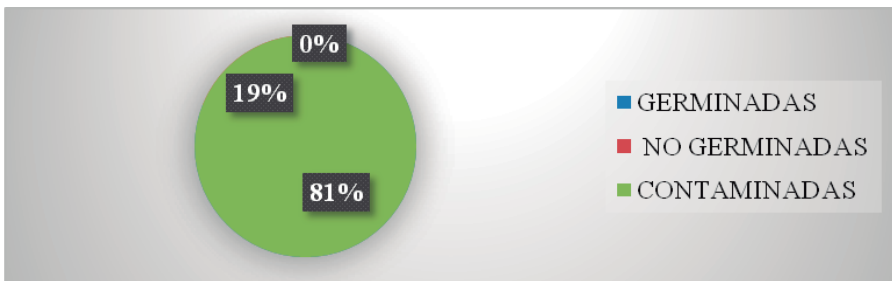


Figura 4. Gráfica del porcentaje de germinación del método en cajas con arena.

Elaborado por: Bravo S. (2018)

En la Figura 4 se puede observar el porcentaje de germinación de las semillas del género *Phaseolus*, a través del método en cajas con arena, el cual indica que el 81% de las semillas germinaron, el 19% no germinaron y no existió ninguna semilla contaminada, lo que

muestra que este método en comparación a los otros es el mejor, ya que existe mayor viabilidad en las semillas.

Crio conservación Número de semillas germinadas

Tabla 3. Datos del número promedio de semillas germinadas a los seis meses

Tratamiento	Germinadas
Nitrógeno líquido (2 ^{do} mes)	8,4
Nitrógeno líquido (4 ^{to} mes)	8,2
Nitrógeno líquido (6 ^{to} mes)	8,3
Congelador (2 ^{do} mes)	6,7
Congelador (4 ^{to} mes)	4,8
Congelador (6 ^{to} mes)	1,5

Elaborado por: Bravo S. (2018)

Mediante la prueba no paramétrica de Wilconxon, se dio a conocer que entre los tratamientos empleados existe un valor p significativo que fue de 0,1 también existieron dos grupos representativos a y b como se puede observar en la Tabla 4, en el cual el grupo a (Nitrógeno líquido), tiene el mayor

rango promedio de 8,3 en comparación del grupo b (Congelador) que tiene un rango promedio de 5,3. Dando a conocer que el mejor tratamiento fue el de nitrógeno líquido ya que presenta mayor número de semillas germinadas durante 6 meses.

Tabla 4. Prueba de Wilconxon para el número de semillas germinadas

Tratamiento	Suma de rangos	Rango promedio	Grupos representativos
Nitrógeno Líquido (T1)	24,9	8,3	a
Congelador (T2)	16	5,3	b

Elaborado por: Bravo S. (2018)

Número de semillas no germinadas

Tabla 5. Datos del número promedio de semillas no germinadas a los 6 meses

Tratamiento	No Germinadas
Nitrógeno líquido (2 ^{do} mes)	1,6
Nitrógeno líquido (4 ^{to} mes)	1,8
Nitrógeno líquido (6 ^{to} mes)	1,7
Congelador (2 ^{do} mes)	3,3
Congelador (4 ^{to} mes)	4,7
Congelador (6 ^{to} mes)	5

Elaborado por: Bravo S. (2018)

Mediante la prueba no paramétrica de Wilconxon, se dio a conocer que entre los tratamientos empleados existe un valor p significativo que fue de 0,1 también existieron dos grupos representativos a y b como se puede observar en la Tabla 6, en el cual el grupo b (Congelador), tiene el mayor rango

promedio de 1,7 en comparación del grupo a (Nitrógeno líquido) que tiene un rango promedio de 4,3. Dando a conocer que el mejor tratamiento fue el del congelador ya que presenta mayor número de semillas no germinadas durante 6 meses.

Tabla 6. Prueba de Wilconxon para el número de semillas no germinadas

Tratamiento	Suma de rangos	Rango promedio	Grupos representativos
Nitrógeno Líquido (T1)	5,1	1,7	a
Congelador (T2)	13	4,3	b

Elaborado por: Bravo S. (2018)

Altura de las plantas

Tabla 7. Datos del promedio de la altura de las plantas a los 6 meses

Tratamiento	Altura de las plantas (cm)
Nitrógeno líquido (2 ^{do} mes)	31
Nitrógeno líquido (4 ^{to} mes)	30,7
Nitrógeno líquido (6 ^{to} mes)	30,3
Congelador (2 ^{do} mes)	22,5
Congelador (4 ^{to} mes)	21,2
Congelador (6 ^{to} mes)	8,7

Elaborado por: Bravo S. (2018)

Mediante la prueba no paramétrica de Wilconxon, se dio a conocer que entre los tratamientos empleados existe un valor p significativo que fue de 0,1. También existieron dos grupos representativos a y b como se puede observar en la Tabla 8, en el cual el grupo a (Nitrógeno líquido), tiene el mayor

rango promedio de 30,6 en comparación del grupo b (Congelador) que tiene un rango promedio de 17,4. Dando a conocer que el mejor tratamiento fue el del nitrógeno líquido ya que presentó el mayor número promedio en altura de las plantas durante 6 meses.

Tabla 8. Prueba de Wilconxon para la altura de las plantas

Tratamiento	Suma de rangos	Rango promedio	Grupos representativos
Nitrógeno Líquido (T1)	92	30,6	a
Congelador (T2)	52,4	17,4	b

Elaborado por: Bravo S. (2018)

Longitud de la raíz

Tabla 9. Datos del promedio de la longitud de las raíces a los 6 meses

Tratamiento	Longitud de la raíz (cm)
Nitrógeno líquido (2 ^{do} mes)	10,9
Nitrógeno líquido (4 ^{to} mes)	10,9
Nitrógeno líquido (6 ^{to} mes)	10,7
Congelador (2 ^{do} mes)	8,5
Congelador (4 ^{to} mes)	8,2
Congelador (6 ^{to} mes)	4,2

Elaborado por: Bravo S. (2018)

Prueba de la suma de rangos de Wilconxon

Mediante la prueba no paramétrica de Wilconxon, se dio a conocer que entre los tratamientos empleados existe un valor p significativo que fue de 0,1, también existieron dos grupos representativos a y b como se puede observar en la Tabla 10, en el cual el

grupo a (Nitrógeno líquido), tiene el mayor rango promedio de 10,8 en comparación del grupo b (Congelador) que tiene un rango promedio de 6,9. Dando a conocer que el mejor tratamiento fue el del nitrógeno líquido ya que presentó el mayor rango promedio de longitud de las raíces durante 6 meses.

Tabla 10. Prueba de Wilconxon para longitud de las raíces

Tratamiento	Suma de rangos	Rango promedio	Grupos representativos
Nitrógeno Líquido (T1)	32,5	10,8	a
Congelador (T2)	20,9	6,9	b

Elaborado por: Bravo S. (2018)

Discusión

Los resultados que se obtuvieron en esta investigación en lo que se refiere a los porcentajes de germinación de cada uno de los tres métodos de viabilidad fueron los siguientes valores: Método en cajas petri tuvo un 74% de germinación; Método en papel toalla tuvo un 67% de germinación; Método en cajas con arena tuvo un 81% de germinación.

Estos resultados demuestran que el método germinativo en cajas con arena es el más adecuado para dar viabilidad a las semillas del género *Phaseolus*. Los datos obtenidos Araya, R., y Martínez, C. (2013) indican un porcentaje mínimo de germinación del 70 % para el método en cajas Petri. El resultado obtenido en esta investigación en base al promedio de las repeticiones fue del 73% de germinación, siendo superior a los recomen-

dados por Araya, R., y Martínez, C. (2013). Para el método en papel toalla menciona un porcentaje del 65% de germinación, los datos que se obtuvieron mediante este método fueron del 67% siendo superiores a los recomendados Araya, R., y Martínez, C. (2013). Mediante el método de cajas con arena se obtuvo el 81% de germinación encontrándose dentro de los rangos recomendados por AOSA. 2013, y FAO (2012), en los cuales recomiendan un rango porcentaje de germinación entre el 80 y 90 % de germinación del material genético.

La obtención de estos resultados se atribuye a que las semillas colectadas fueron de excelente calidad con una viabilidad alta y un porcentaje mínimo de impurezas. Los datos obtenidos son similares a los encontrados por Bravo, S. (2018), donde además menciona la importancia de la selección adecuada de semillas para la evaluación de viabilidad

de las mismas.

En base a los resultados obtenidos se corrobora la importancia de una correcta selección del material genético a evaluar para la obtención de porcentajes superiores de germinación en la aplicación de estos tres métodos de germinación.

Conclusiones

El mejor método para realizar las pruebas de germinación es el de cajas con arena, obteniendo los mejores resultados con un 81% de semillas germinadas, seguido el método en cajas petri con un 74% y finalmente el método en papel toalla con un 67% de semillas germinadas.

La técnica de crioconservación en nitrógeno líquido obtuvo un promedio final de 8,3/10 equivalente a 190,7/230 semillas germinadas, comprobándose que mantienen su viabilidad a largo plazo. La técnica en congelador obtuvo un promedio final negativo de 4,3/10 equivalente a 99,7/230 semillas germinadas, es decir perdieron su viabilidad en función del tiempo.

La técnica de desecación y congelación rápida de semillas en nitrógeno líquido, obtuvo un promedio de 1,7/10 equivalente a 39/230 semillas no germinadas, es decir la viabilidad se mantiene durante los 6 meses. La técnica de almacenamiento en frío de semillas en congelador, obtuvo un promedio de 5,7/10 equivalente a 130/230 semillas no germinadas, concluyendo que a partir del segundo mes de conservación las semillas sometidas a esta técnica fueron perdiendo su poder germinativo, adquiriendo resultados elevados de semillas no viables.

La conservación de semillas en nitrógeno líquido es muy eficaz, ya que mantienen la viabilidad por largos periodos de tiempo, además la composición y estructura de las

semillas se conservan intactas al momento de extraerlas del tanque de nitrógeno, en cambio en el almacenamiento tradicional en frío las semillas tienden a encogerse, también cuando se almacenan de forma convencional tienden a aparecer insectos pequeños que se alimentan de las semillas dañándolas y por ende pierden su viabilidad.

Literatura Citada

Alvarenga, S. (2015). Crioconservación de semillas y embriones de *Jatropha curcas* L. San José: Continental.

Araya, R., y Martínez, C. (2013). Método en cajas petri, Método en papel toalla,

Método en cajas con arena. En Protocolo para el manejo poscosecha de la semilla de fréjol (págs. 11-13). Costa Rica: FAO.

Doria, J. (17 de 06 de 2013). Las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0258-59362010000100011

Espinel, J. (01 de 06 de 2015). Productividad del frijol común. Obtenido de <https://www.nacion.com/opinion/productividad-del-frijol-comun/5JVZSVT3R5CXNPV7AJTEZPGU7Y/story/>

FAO. (16 de 06 de 2014). Bancos de Semillas Comunitarios. Obtenido de <http://www.fao.org/3/6-cable82-74f5-456d-a304-740f4fb471-fa/i3987s.pdf>

FAO. (23 de 06 de 2014). Planificación de la recolección de semillas. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/006/AD232S/ad232s03.htm>

García Rojas, T., & Abdelnour Esquivel, A.

- (2017). Crioconservación de ápices y semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante las técnicas de vitrificación y deshidratación. *Agronomía Costarricense*. Obtenido de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/10717>
- Larraín, P. (2015). Cultivo de fréjol o poroto. Cali: Dos Bosco.
- Llambi, L. (2015). Asistencia a los países andinos en la reducción de riesgos y desastres
- En el sector agropecuario. La paz: Expreso. López, E. (05 de 10 de 2014). *Phaseolus vulgaris*. Quito: Publicaciones Don Bosco. Obtenido de <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/Phaseolus-vulgaris>
- Lozano, O. (09 de 03 de 2016). Comportamiento agronómico y reacción a fitopatógenos
- de 28 variedades mezcla de fréjol de Cotacachi. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/8327>
- Morales, A. (2015). Conservación de semillas, proyecto Iniap. Quito: Jardín botánico Quito.
- Murillo, Á. (02 de 05 de 2009). Variedades de frejol arbustivo. *Generaciones*, pag. 1-41. Obtenido de <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Catálogo%20var%20de%20fréjolo.pdf>
- Lozano, O. (09 de 03 de 2016). Comportamiento agronómico y reacción a fitopatógenos
- de 28 variedades mezcla de fréjol de Cotacachi. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/8327>
- Luca, N. D. (2014). Características de las semillas, tratamientos pregerminativos, técnicas de recolección y almacenamiento. México D.F.: Continental.
- Pressreader. (01 de 08 de 2015). Cotacachi y su Vergel. Quito: Don Bosco. Obtenido de <http://www.pressreader.com/ecuador/nan-magazine/20150801/281612419198127>
- Salazar, J. (2012). Banco de Germoplasma. España: Universidad de Valencia.
- Salgado, M. (11 de 05 de 2015). Especies nativas en Cotacachi. *Ecolineal*, 01-10. Obtenido de <https://www.ubicacuena.com/ubicaec/lugar/p249597048>
- Sánchez, C. (2015). Características del Tanque de almacenamiento para Nitrógeno Líquido. Quito: SUPLIMEDICA.
- Sandoval, J. (2015). Crioconservación. Quito: Don Bosco.
- Santacruz, M. (11 de 04 de 2014). Definición de Genética. Obtenido de <http://conceptodefinicion.de/genetica/>
- SEGOVIA. (22 de 08 de 2010). La importancia de conservar semillas autóctonas.
- Obtenido de <http://www.abc.es/20100822/comunidad-castillaleon/agricultoresdestacan-importancia-conservar-20100822.html>
- Turcios, R. (2015). Prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. México D.F.: Permanyer.
- Vélez, A. (17 de 03 de 2017). Banco Mundial de Semillas. Obtenido de <http://es.euronews.com/2017/03/17/noruega-el-banco-mundial>