

Respuesta fisiológica de semillas de *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze a condiciones de almacenamiento y crioconservación

Physiological response of *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze seeds to storage and cryoconservation conditions

Diana María Montoya Bárcenas¹, Carmen Rosa Bonilla Correa², Manuel Salvador Sánchez Orozco², Carlos Iván Cardozo Conde², Roosevelt Escobar³

¹Facultad de Ingeniería y Administración, Universidad Nacional de Colombia. AA 237. Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. AA 237. Palmira, Valle del Cauca, Colombia. ³Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. AA 6713. Cali, Valle del Cauca, Colombia.

Autor para correspondencia: mssanchezo@palmira.unal.edu.co

Rec. 19-06-09 Acep. 03-09-09

Resumen

En la Universidad Nacional de Colombia y en los cuartos de crioconservación del Instituto Humboldt del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (Palmira, Colombia) en un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones, se evaluaron los efectos de tres contenidos de humedad (10%, 8% y 6%), el congelamiento ultrarrápido a través de inmersión en nitrógeno líquido (NL) y dos condiciones de almacenamiento en la germinación de las semillas de *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze cultivar Veranera. Los resultados mostraron la alta calidad fisiológica inicial de las semillas de esta leguminosa forrajera y la ausencia de latencia física o fisiológica, aunque la germinación se reduce drásticamente en condiciones no controladas de almacenamiento. La germinación disminuyó significativamente cuando el contenido de humedad se redujo a 6%, indicando el posible comportamiento recalcitrante, o sea semillas que pierden su viabilidad por deshidratación producida por el medio donde se encuentren, sea éste de almacenamiento o natural (Vieira et al., 1994). Para la crioconservación por inmersión en nitrógeno líquido durante un mes, el contenido adecuado de humedad fue de 8%, aunque no se detectaron diferencias en la germinación cuando las semillas en los tres niveles de humedad se crioconservaron durante una hora en nitrógeno líquido.

Palabras clave: *Cratylia argentea*, leguminosae, leguminosas forrajeras, semillas, almacenamiento de semillas, calidad fisiológica, crioconservación, germinación

Abstract

On the cryoconservation cool rooms of the Nacional University of Colombia, Palmira, and the International Center for Tropical Agriculture (CIAT), the effects on germination of *Cratylia argentea* seeds (cv. Veranera) of three moisture levels (10, 8 and 6%), the liquid N (LN) cryoperservation and two storage

1. Ing. Agroindustrial. Facultad de Ingeniería y Administración, Universidad Nacional de Colombia

2. Ings. Agrónomos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira.

3. Biólogo. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Colombia.

conditions were evaluated. The results showed high initial physiological quality of seeds and lack of any type of physical or physiological dormancy which drastically reduce germination on non controlled storage conditions. Germination decreased drastically when moisture content was reduced to 6% which mean the possible non orthodox behavior of the *Cratylia* seeds. For seed cryopreservation by LN immersion during one month, the adequate moisture content is 8%. Non differences on seed germination respect to the three moisture levels were observed when cryopreservation period had one hour of duration on liquid nitrogen.

Key words: *Cratylia argentea*, legume, seeds, physiological quality, cryopreservation, germination.

Introducción

Cratylia argentea (Desv.) Kuntze es una leguminosa arbustiva forrajera nativa de la Amazonia y la parte central de Brasil, Perú y Bolivia, incorporada a los programas de evaluación forrajera del trópico latinoamericano. Es un arbusto que alcanza entre 1.5 y 3 m de altura. Se adapta bien a diferentes tipos de suelos, siempre que estos sean bien drenados. Crece en sitios localizados desde el nivel del mar hasta 1200 m.s.n.m. con precipitaciones entre 1000 a 4000 mm. Una característica importante de esta especie es su alta retención foliar y la capacidad de rebrote durante la época seca, debido al desarrollo de raíces vigorosas que alcanzan entre 1.30 a 1.80 m y favorecen la tolerancia de la planta a la sequía, aun en condiciones de suelos pobres y ácidos (Peters et al., 2003; Pizarro et al., 1995).

Aunque la producción de semilla es alta, de buena calidad y sin marcada latencia física (dureza) o fisiológica, se han detectado problemas de conservación ya que bajo ciertas condiciones de almacenamiento presenta pérdidas drásticas en calidad fisiológica (viabilidad, vigor, germinación) (Lascano, 1998).

En varios estudios (Hong y Ellis, 1992b; Ellis et al., 1995; Vertucci et al., 1994, Cromarty et al., 1982; Delouche, 1971) se ha demostrado que las semillas ortodoxas –o sea aquellas que no reducen su viabilidad con la deshidratación– tienden a conservar por más tiempo la calidad fisiológica (longevidad, viabilidad, germinación) si se almacenan a baja temperatura y baja humedad relativa; en contraste, las semillas recalcitrantes –o sea semillas que pierden su viabilidad por deshidratación producida por el medio donde se encuentren, sea éste de almacenamiento o natural– pierden rápidamente su capacidad

de germinación al exponerse a condiciones de baja humedad (Kermode y Finch-Savage, 2002). Aunque las técnicas de secado son suficientemente conocidas, se han realizado algunas investigaciones utilizando sílica-gel en el secado de semillas para conservación de germoplasma. Zhan y Tao (1989) lograron tratar semillas sin afectar su viabilidad con un secado lento, utilizando relaciones bajas de sílica-gel:semillas. Arce et al. (2007) encontraron resultados positivos con semillas crioconservadas de *Sapindus saponaria*. Cuando el secado es rápido o brusco se compromete la viabilidad de las semillas, especialmente cuando éstas no han alcanzado el nivel de humedad y madurez en el que puedan soportar descensos bruscos de humedad.

Uno de los aspectos más importantes en la conservación de semillas de especies forrajeras es el almacenamiento, y su duración dependerá del contenido de humedad, grado de latencia, tratamientos de escarificación, envase y comercialización, entre otros (Ferguson, 1994). El congelamiento ultrarrápido a través de inmersión en nitrógeno líquido es uno de los medios disponibles para la conservación en el largo plazo de recursos genéticos, especialmente de especies que tienen semillas de comportamiento recalcitrante.

La tecnología de crioconservación permite conservar células, tejidos u órganos vegetales durante un tiempo indefinido, sin que exista riesgo de pérdida de viabilidad. El material vegetal se conserva a temperaturas muy bajas (entre -150 °C y -196 °C) por lo que se usa como refrigerante NL o su fase de vapor. A estas temperaturas el metabolismo celular se detiene por completo, impidiendo procesos que producirían daños irreparables en el material. La técnica ha sido evaluada

en más de 70 especies y en muchos casos, aunque se ha probado la resistencia de suspensiones celulares, callos, protoplastos, meristemos y embriones a la congelación en nitrógeno líquido, no necesariamente significa, que la técnica sea efectivamente usada con éxito para el almacenamiento de especies vegetales en general (Engelmann, 2000; Villa et al., 2007). Cardoso et al. (2000) al estudiar el efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de diez especies de leguminosas forrajeras no encontraron efectos negativos sobre su viabilidad, lo que demuestra que esta técnica es un método adecuado para la conservación de las semillas de estas especies.

El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar la respuesta fisiológica de las semillas de *Cratylia argentea* (Desv.) O. Kunze cultivar Veranera a la crioconservación y a varias condiciones de almacenamiento.

Materiales y métodos

Localización

Los ensayos se realizaron en los Laboratorios de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, y en los cuartos de crioconservación del Instituto Humboldt en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicados en el municipio de Palmira (3° 31' norte y 76° 81' oeste, a 980 m.s.n.m., 1100 mm de precipitación, humedad relativa de 78% y temperatura promedio anual de 24.5 °C), Valle del Cauca, Colombia. La semilla se obtuvo de lotes cosechados en abril de 2004, en el CIAT por el Proyecto de Forrajes Mejorados para Propósitos Múltiples para el Mundo en Desarrollo. Para los ensayos las muestras de semilla fueron separadas por tamaños en fracciones grandes, medianas y pequeñas, utilizando un soplador General. El contenido de humedad se determinó según la recomendación ISTA (2005) y se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$H(\%) = \frac{(M_2 - M_3)}{(M_2 - M_1)} * 100$$

donde,

M₁= peso del recipiente con tapa (g), M₂= peso del recipiente con tapa + contenido

de la semilla (5 ± 0.2 g) antes del secado en horno eléctrico 130 °C por 8 h, M₃ = peso del recipiente con tapa + contenido después del secado (g). Las mediciones se realizaron con tres repeticiones.

Secado de semillas

Las semillas fueron secadas utilizando la relación sílica-gel:semilla de 2:1. Para la construcción de la curva de secado se establecieron los niveles de humedad 10%, 8% y 6% y para determinar el contenido de humedad se utilizó la fórmula de Hong y Ellis (1996):

$$Pi(100 - Hi) = Pf(100 - Hf)$$

a partir de la cual se obtiene la humedad final:

$$Hf = 100 - \frac{Pi(100 - Hi)}{Pf}$$

donde, *Hi* = contenido de humedad (%) inicial de la semilla, determinado por el método gravimétrico; *Hf* = contenido humedad (%) determinado; *pi* = peso inicial y *pf* = peso final de las semillas. Las mediciones fueron realizadas cada media hora durante 6 horas evitando, en lo posible, que las semillas ganaran humedad del ambiente. Las curvas de secado se realizaron con base en el peso perdido cuando se colocaron en sílica-gel. Las muestras de semillas de *C. argentea*, con contenidos de humedad de 10%, 8% y 6% se empacaron al vacío en bolsas de aluminio herméticamente selladas y se sometieron directamente a NL, sin crioprotectores. Se evaluó el efecto en la germinación de dos periodos de exposición a NL: 1 mes; y una hora. Muestras adicionales de semillas fueron almacenadas a temperatura ambiente en las condiciones de Palmira (humedad relativa entre el 50% y 70% y temperatura, promedio, de 24 °C) y en condiciones refrigeradas a 10 °C en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

Pruebas de germinación

Las semillas crioconservadas fueron descongeladas a temperatura ambiente durante 12 h, descartando aquellas que presentaron signos evidentes de daño. Las pruebas de germinación fueron realizadas en cuatro repeticiones con 25 semillas cada una y en condiciones ambientales del Laboratorio de

Fisiología Vegetal. Como sustrato de germinación se utilizó arena, la cual se pasó a través de una zaranda para eliminar elementos extraños, lavada con agua, desinfectada con hipoclorito de sodio al 5% durante 12 h, secada y esterilizada en horno a 105 °C durante 6 h. Dependiendo de la humedad de la arena en los recipientes de siembra, se aplicó riego con agua destilada. En las evaluaciones se incluyeron conteos de plántulas normales, anormales y semillas muertas (ISTA, 2005).

Prueba de viabilidad de semillas

Esta prueba es utilizada para determinar la germinación potencial y el vigor de las semillas, evaluando la tinción del embrión y los cotiledones de la semilla cuando se sumergen en una solución al 0.5% de cloruro trifenil tetrazolio. En este estudio, la prueba se realizó en dos repeticiones de 25 semillas cada una, las cuales fueron lavadas con agua y secadas con papel absorbente antes de determinar el número de semillas viables y no-viables, utilizando los protocolos de interpretación para semillas de soya (Delouche et al., 1971). Los resultados fueron analizados mediante S.A.S (Statistical Analysis System). Versión 8.2 de 2002.

Resultados y discusión

Características de las semillas

El peso unitario de las semillas varió entre 32 y 43 g/100 semillas, reflejando el efecto de las condiciones climáticas variantes durante la floración y formación de semillas de *C. argen-*

tea que para esta especie se puede extender hasta 3 meses (Peters et al, 2003). Las semillas comenzaron a germinar 3 días después de la siembra (d.d.s.), no obstante, la mayor germinación ocurrió entre los 7 y 21 d.d.s.. La viabilidad y la germinación inicial fueron altas (97% y 95%, respectivamente) (Cuadro 1), indicando la alta calidad fisiológica de las semillas y la ausencia de latencias física y/o fisiológica.

Cuadro 1. Caracterización inicial de semillas de *Cratylia argentea* cv. Veranera.

Medición	Unidad	Valor
Peso unidad		
semillas grandes	g/100 semillas	43
semillas medianas	g/100 semillas	35
semillas pequeñas	g/100 semillas	32
Humedad	%	11 (10.9-11.2)
Germinación	%	95
Viabilidad en Tetrazolio	%	97

Curvas de secado

Las semillas colocadas en sílica-gel presentaron pérdida acelerada de humedad, disminuyendo de 10.9% hasta 6.2% en 120 min. Seguidamente se presentó una fase de tiempo igual para pasar de 6.2% a 4% y permanecer aproximadamente constante (Figura 1). La tasa de pérdida de agua se relaciona con el grosor de las cubiertas de la semilla (Chacón y Bustamante, 2001) y las semillas recalci-

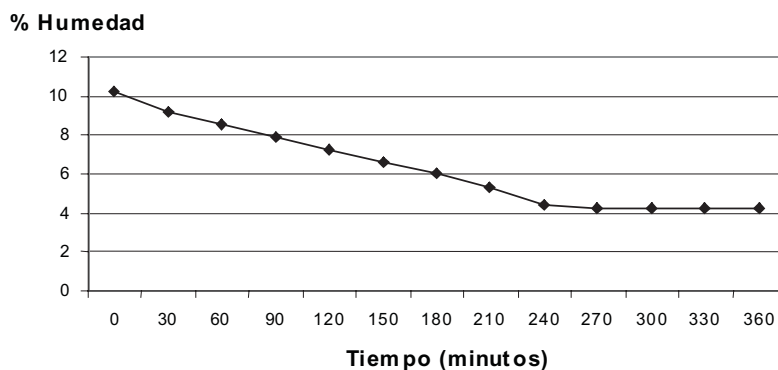


Figura 1. Contenido de humedad a través del tiempo de semillas de *Cratylia argentea* cv. Veranera.

trantes con cubiertas rotas se desecan más rápidamente y en un porcentaje más alto (Mwang'Ingo et al., 2004).

Germinación de semillas sin crioconservación

En los tres niveles de humedad las semillas empezaron a germinar 5 d.d.s. Siete d.d.s. la germinación fue 69% en semillas con el 10% de contenido de humedad, en semillas con 8% y 6% de humedad las germinaciones fueron 18% y 30%, respectivamente. Veinte d.d.s. se observó una reducción importante de la germinación en los niveles bajos de contenido de humedad, indicando un probable comportamiento no ortodoxo de las semillas de esta especie. Aunque regularmente las semillas recalitrantes pierden rápidamente su capacidad de germinación al exponerse a condiciones de baja humedad (Kermode y Finch-Savage, 2002), al final de la prueba (28 días) se obtuvieron germinaciones de 95%, 86% y 76% para los contenidos de humedad de 10%, 8% y 6%, respectivamente. En el Cuadro 2 se presentan los resultados de germinación obtenidos en diferentes contenidos de humedad.

Cuadro 2. Germinación de semillas de *Cratylia argentea* con diferentes contenidos de humedad y días después de la siembra.

Días después de la siembra	Contenido de humedad (%)		
	10	8	6
	Germinación (%) ^a		
5	9	12	5
6	15	15	10
7	69	18	30
8	73	60	50
9	76	65	58
10	76	72	69
15	86	85	72
18	90	86	76
20	95 a*	86 b	76 c

a. Plántulas normales

* $p \leq 0.05$

Pruebas de crioconservación

Crioconservación en NL durante un mes.

Después de un mes en NL, el mayor porcentaje de germinación se observó con semillas que contenían 8% de humedad, las cuales presentaron 12% de germinación 5 d.d.s. y 86%, 10 d.d.s. (Cuadro 3). Al final de la prueba se registraron 5% de plántulas anormales y el

9% de semillas muertas. Las semillas con el 6% de humedad presentaron la germinación más baja (73%) 21 d.d.s., siendo el tratamiento en que se presentaron los mayores porcentajes de plántulas anormales (15%) y de semillas muertas (27%). Las semillas con 10% de humedad comenzaron a germinar 5 d.d.s., alcanzando 79% de germinación 21 d.d.s.. De este porcentaje 71% correspondieron a plántulas normales, además, se registró 21% de semillas muertas. Como se deduce de estos resultados, las semillas crioconservadas con el 6% de humedad presentaron la más alta proporción de plántulas anormales y semillas muertas.

Si se considera que en el tratamiento de secado (sin crioconservación) se obtuvieron germinaciones de 95%, 86% y 76% para los contenidos de humedad de 10%, 8% y 6%, respectivamente, y se asume que, estos valores son los máximos potenciales germinativos que se podrían obtener en las semillas suspendidas en NL, la germinación total relativa (GTR), calculada como la relación entre el total de plántulas obtenidas en la prueba de

Cuadro 3. Dinámica de la germinación de semillas de *Cratylia argentea* con diferentes contenidos de humedad después del almacenamiento en nitrógeno líquido durante un mes.

Días después de la siembra	Contenido de humedad (%)		
	10	8	6
	Germinación (%)		
5	5	12	7
6	6	28	15
7	7	56	22
8	9	70	35
9	9	75	45
10	22	86	52
12	38	86	70
18	79 b	86 a	73 c
21	79	86	73
Resumen			
Germinación total (%)	79	86	73
Plántulas normales (%)	71	81	58
Plántulas anormales (%)	8	5	15
Semillas muertas (%)	21	9	27
Germinación total sin crioconservación	95 a*	86 b	76 c
Germinación total relativa (GTR) con crioconservación	83.1	100	96
Germinación normal relativa (GNR) con crioconservación	74.7	94.1	76.3

* $p \leq 0.05$

germinación de las semillas crioconservadas y el máximo potencial de germinación, la GTR de las semillas crioconservadas sería de 83%, 100% y 96%, y la germinación normal relativa (GNR), calculada como la relación entre las plántulas normales obtenidas en la prueba de germinación de las semillas crioconservadas y el máximo potencial germinativo, sería de 75%, 94% y 76%, respectivamente, en los tres niveles de humedad evaluados. Estos resultados indican que el contenido de humedad adecuado para crioconservar semillas de *C. argentea* es 8 %. Las semillas dañadas por efecto del tratamiento de crioconservación en NL no presentaron diferencias estadísticamente significativas y variaron entre 2% y 4% en los niveles de humedad evaluados. Para preservar semillas de germoplasma de *Arachis pintoii* (Leguminosae), el nivel de humedad de las semillas para inmersión en NL es del 4% (Rey y Mroginski, 2009)

Crioconservación en NL durante 1 hora.

Las semillas con 10% de humedad presentaron la mayor germinación total (88%), mientras las semillas con 6% representaron la germinación total más baja (75%). La GTR de las semillas expuestas una hora en NL fue de 93%, 94% y 99%, respectivamente, para los contenidos de humedad 10%, 8% y 6% ($P > 0.05$), indicando claramente que la exposición de las semillas durante 1 h en NL no afectó la germinación en los niveles de humedad evaluados. Resultados en trabajos realizados para evaluar el efecto de la crioconservación en semillas de varias especies de leguminosas sugieren el enorme potencial de la crioconservación para la conservación de semillas de estas especies (Cardoso et al, 2000).

Almacenamiento. Un mes después de almacenamiento en condiciones de cuarto frío (H R: 55% y T:18°C), las semillas con 10%, 8% y 6% de humedad redujeron, respectivamente, su germinación en 20%, 6% y 14%. Las semillas almacenadas en las condiciones ambientales perdieron drásticamente la germinación (40%, 34% y 34%) para los contenidos de humedad 10%, 8% y 6 %, respectivamente (Cuadro 4), indicando, claramente, la sensibilidad de las semillas de esta especie a las condiciones de almacenamiento.

Cuadro 4. Germinación inicial y 1 mes después de la siembra de semillas de *Cratylia argentea* en condiciones de almacenamiento y humedad diferentes.

Condición	Contenido de humedad (%)		
	10	8	6
	Germinación (%)		
Germinación inicial	95	86	76
Almacenamiento (1 mes):			
en cuarto frío (H R: 55%, T:18°C)	76	81	65
Reducción	19	5	11
en ambiente de Palmira	55	52	42
Reducción	40	34	34

Conclusiones

De los resultados de este estudio es posible concluir lo siguiente:

- Las semillas de *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze presentan alta calidad fisiológica inicial y ausencia de latencia física o fisiológica, pero reducen su germinación drásticamente en condiciones no controladas de almacenamiento.
- Las semillas pierden agua rápidamente, reduciendo el contenido de humedad de 11% a 6%, en las primeras 4 h de almacenamiento.
- Las semillas presentan una reducción importante de la germinación en los niveles bajos de contenido de humedad (<8%) indicando un probable comportamiento no ortodoxo de las semillas de esta especie.
- Los mejores resultados se encontraron cuando las semillas con 8 % de humedad fueron crioconservadas en NL durante 1 mes.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la División de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia-sede Palmira (DIPAL) y a Colciencias por el apoyo y la financiación del presente trabajo de investigación.

Referencias

Arce, K.; Bonilla C.; Sánchez O., M. S.; y Escobar, R. 2007. Morfoanatomía y respuesta fisiológica de las semillas de chambimbe a condiciones de crioconservación. Acta Agronómica 56(3):135-140.

- Cardoso, A.; Pita, V. J. M.; y Gomes, G. J. P. 2000. Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. *Rev. Brasil. Produtos Agroind.* 2(1):67-71.
- Chacón, P. y R.O. Bustamante. 2001. The effects of seed size and pericarp on seedling recruitment and biomass in *Cryptocarya alba* (Lauraceae) under two contrasting moisture regimes. *Vegetatio* 152 (2), 137-144.
- Cromarty A. S. et al. 1982. The Design of seed storage facilities for genetic conservation. IBPGR, Secretarial. Roma. 96 p.
- Delouche, J. C. 1971. Precepts of seed storage in handbook of seed technology. Mississippi State University. Agron. Techn. 119-153.
- Delouche, J. C.; Wayne, M.; Raspet, M.; y Lienhard, M. 1971. Prueba de la viabilidad de la semilla con tetrazol. México/Buenos Aires. 1ª ed. esp. 71 p.
- Engelmann, F. F. 2000. Importancia de la desecación para la crioconservación de semillas recalcitrantes y especies de propagación vegetativa. IPGRI, Via delle Sette Chiese 142, 00145. Roma.
- Ellis, et al. 1995. Survival and vigor of (*lactuca sativa*) and sunflower (*helianthus annuus*) seed stored at low and very-low moisture contents. *Ann. Bot.* 76(5):521-534.
- Ferguson, J. 1994. Semillas de especies forrajeras tropicales. Conceptos, casos y enfoque de la investigación y la producción. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 370 p.
- Hong, T. y Ellis, R. 1996. Protocolo para determinar el comportamiento de las semillas en almacenamiento. Instituto Internacional de Recursos Genéticos de Plantas (IPGRI). Roma, Italia. Nelly Sánchez (UN-Palmira, traductora). *Bol. Téc.* 85 p.
- Hoekstra, F.; Haigh, A.; Tettero, F.; y van Roekel, T. 1994. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. *Seed Sci. Res.* 4:143-147.
- Hong, T. D. y Ellis, R. H. 1992b. The survival of germinating orthodox seeds after desiccation and hermetic storage. *J. Exp. Bot.* 43:239-247.
- ISTA (Internacional Seed Testing Association). 1999. Reglas Internacionales para ensayos de semillas. Ensayo topográfico al tetrazolio. Secretaría de Estado de Agricultura y Ganadería. España.
- ISTA (Internacional Seed Testing Association). 2005 International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, CH-Suiza.
- Lascano, C. E. 1998. Calidad nutritiva y utilización de *Cratylia argentea* en: Pizarro, E. A. y Coradin L. (eds.). Taller de trabajo sobre *Cratylia argentea*. Brasilia, D.F. p. 83-97.
- Mwang'Ingo, P.; Teklehaimanot, Z.; Maliondo, S.; y Msanga, H. 2004. Storage and pre-sowing treatment of recalcitrant seeds of Africa sandalwood. *Seed Sci. Tech.* 32, 547-560
- Nkang, A. 2002. Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *J. Plant Physiol.* 159 (5):473-483.
- Peters, M.; Franco, L. H.; y Schmidt, A. 2003. Especies forrajeras multipropósito. En: http://isa.ciat.cgiar.org/catalogo/listado_es.jsp?pager.offset=25&tema=forrajes. 02.05.2009.
- Pizarro, E. A.; Carvalho, A. M.; y Ramos, A. B. 1995. Introducción y evaluación de leguminosas forrajeras arbustivas en el Cerrado brasileño. En: Coradin, L. (eds.). Potencial de género *Cratylia* como leguminosa forrajera. Taller de trabajo sobre *Cratylia argentea*. Embrapa-CPAC, CIAT, Brasilia, D. F. p. 40-49.
- Rey, H.Y. y Mroginski, L. A. 2009. Cryopreservation of *Arachis pintoi* (Leguminosae) seeds. *Seed Sci. Tech.* 37 (1):202-205.
- Vertucci, C; Ross, E.; y Crane, J. 1994. Theoretical basis for seed storage protocols. III. Optimum moisture contents for pea seeds stored at different temperatures. *Ann. Bot.* 74:531-540.
- Villa, A. L.; Jimenez, P. É.; y Valbuena, R. I. 2007. Preliminary study of the establishment of cryoconservation protocol for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Agron. Col.* 25(2):215-223.
- Zhang, X. Y. y Tao, L. 1989. Silica gel seed drying for germoplasma conservation-practical guidelines. *Plant Genet Res. Newsl.* 75(76):1-5.