

EFFECTO DE LA TOLERANCIA A LA DESECACIÓN Y PERFORMANCE DE PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN EN LA VIABILIDAD DE SEMILLAS
***CitrusLimon* L. Burm cv. Eureka**

Orjuela-Palacio Juliana M.¹, Graiver Natalia¹, Santos M. Victoria^{1,2}, Zaritzky Noemí E.^{1,2}

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CONICET, Facultad de Ciencias Exactas UNLP, CIC-PBA, Argentina), Calle 47 y 116 La Plata- Buenos Aires.

²Depto. de Ingeniería Química- Facultad de Ingeniería (Universidad Nacional de La Plata, Argentina), Calle 1 y 47 La Plata Buenos Aires. Dirección postal: 47 y 116 (CP: 1900).
julianaorjuela11@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Argentina es el octavo productor mundial de cítricos con una producción anual de 2.6 millones de ton [1], siendo su germoplasma un recurso estratégico para el país. La correcta conservación de su material genético a largo plazo es de gran importancia ya que permite su futura aplicación en híbridos o actividades de mejoramiento genético de semillas. En el contexto internacional Argentina es el mayor productor mundial de limones alcanzando valores de 1.4 millones de toneladas y exporta 250 mil toneladas [1], consolidándose como uno de los mayores productores y exportadores de limones [2]. Asimismo, ocupa el primer lugar como exportador mundial de jugo de limón [2]. Entre las variedades más cultivadas de *Citrus limon* está la cv. Eureka y Genova [1]. Con el fin de conservar el germoplasma vegetal en cualquiera de sus formas reproductivas (semillas, esquejes, tubérculos, etc.) se han establecido bancos de germoplasma cuya misión consiste en ubicar, recolectar, conservar y caracterizar el germoplasma de las plantas cuyos atributos son consideradas de interés prioritario para beneficio de la humanidad. Las semillas constituyen una forma reproductiva del vegetal para conservar el germoplasma. El almacenamiento de semillas en bancos de germoplasma las protege contra eventos catastróficos como los desastres naturales, brotes de una enfermedad o eventos bélicos. Algunas de las semillas cítricas están clasificadas como intermedias (no-ortodoxas) y requieren de una etapa de desecación previa a su inmersión en nitrógeno líquido para lograr su correcta conservación a largo plazo. La etapa de desecación es crítica dado que afecta fuertemente los tejidos celulares, por ende es importante conocer cuáles son las condiciones operativas y humedades finales que maximizan la viabilidad. Es fundamental optimizar protocolos de criopreservación de germoplasma que contribuyan a mantener la diversidad genética en bancos. Los objetivos del presente trabajo de investigación son: a) determinar la tolerancia a la desecación de semillas *Citrus limon* L. Burm cv. Eureka en un amplio rango de humedades relativas mediante la evaluación de su poder germinativo, obtener de la isoterma de porción para el rango %HR evaluado; b) clasificar la semilla de acuerdo a su sensibilidad a condiciones de deshidratación para su futura criopreservación y analizar el rango óptimo de humedad que maximiza su posterior germinabilidad; c) analizar mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) las transiciones de lípidos y agua presentes en la semilla; d) establecer el efecto de diferentes velocidades de enfriamiento/calentamiento durante la criopreservación en nitrógeno líquido en la viabilidad de la semilla *C. limon* cv. Eureka.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas se extrajeron manualmente de limones *Citrus limon* L. Burm cv. Eureka, provistos por el INTA (EEA Concordía, Entre Ríos). La adecuación consistió en un lavado con etanol (70 % v/v) durante 5 minutos, seguido de una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (2 % p/v) durante 15 minutos. Se realizaron 3 lavados con agua destilada y se secaron rápidamente con papel absorbente. La testa se retiró previo a la etapa de desecación con el fin de favorecer el proceso de germinación. El contenido de humedad de las semillas (%H; g H₂O 100 g⁻¹ base húmeda (b.h.)) se determinó mediante el

secado en estufa a 105 ± 2 °C hasta alcanzar un peso seco constante [3]. La actividad acuosa se determinó en equipo AquaLab Series 4TEV, (DecagonDevices Inc., Pullman, WA, USA), calibrado con una solución de LiCl ($a_w = 0.113 \pm 0.002$), NaCl ($a_w = 0.753 \pm 0.002$) a 20 °C. La determinación de contenido lipídico se realizó por el método de Soxhlet [3] en semillas previamente molidas y secadas en estufa (105 °C), utilizando como solvente éter de petróleo (pe: 40-60 °C).

Isoterma de sorción: se determinó por el método gravimétrico estático a 20 °C [4]. Las semillas expuestas a 8 condiciones de %HR [LiCl 11.3 %; CaCl₂ 29.5%; MgCl₂; 33%; Mg(NO₃)₂ 54.4%; NaNO₂, 64%; NaCl 76%; KCl 85 % y KNO₃ 95%] fueron pesadas cada 3 días hasta alcanzar el equilibrio (diferencia entre 2 pesadas consecutivas $< \pm 0.003$ g). En estas condiciones el valor de a_w puede considerarse igual a su correspondiente %HR/100 [5]. Cada punto de la isoterma se realizó por triplicado. El contenido de agua de las semillas en el equilibrio (W_c) se expresó en g de H₂O g⁻¹ base seca (b.s.). Los datos experimentales fueron modelados usando la ecuación de D'Arcy & Watt [6] con modificaciones [4]:

$$W_c = K' + C a_w + \frac{kk' a_w}{1 - ka_w} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde, K' describe los sitios de sorción fuertemente unidos y expresada en g H₂O g⁻¹b.s. [4]; C es el número y fuerza de los sitios enlazados débilmente, k' es el número de sitios de sorción multimolecular y k corresponde a la actividad de agua del agua multimolecular [6]. Los parámetros del modelo fueron estimados mediante el análisis de regresión no lineal con el software Origin Pro v 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA USA). La bondad del ajuste se

$$\%E = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^n \frac{|W_c - W_{pc}|}{W_c}$$

determinó mediante el porcentaje de error medio relativo () donde W_c y W_{pc} representan los valores de W_c (g H₂O g⁻¹b.s.) experimentales y predichos, respectivamente y N corresponde al número de observaciones. El potencial químico de agua

(Ψ) está vinculado con la actividad acuosa $\Psi = RT \ln \frac{a_w}{V_w}$ siendo: R= 8.314 J mol.K⁻¹, T= 293 K y $V_w = 18.07 \cdot 10^{-3}$ L.

Tolerancia a la desecación: Un total de 50 semillas por cada tratamiento (8 condiciones de equilibrio 11.3-95 HR%) se almacenaron en a 20 °C y en oscuridad durante 25 días. Para la clasificación de las semillas *C. limon* cv. Eureka se secaron hasta 10-12 %H (b.h.), evaluando su viabilidad mediante el método de germinación en arena [13]. Otro set de experimentos con un total de 120 semillas fueron secadas en condiciones de no equilibrio en sílica gel hasta alcanzar 5 %H en base húmeda ($a_w = 0.0901$) y la viabilidad se determinó mediante los ensayos de germinación en arena y de tetrazolio.

Ensayos de viabilidad: a) **Germinación en arena:** se determinó el porcentaje de germinación

en arena ($\%G = \frac{\# \text{Semillas germinadas}}{\# \text{Semillas sembradas}} * 100$) en semillas control (sin tratamiento) y desecadas entre $0.11 < a_w < 0.95$. Se sembraron 30 semillas/tratamiento en arena húmeda previamente acondicionada siguiendo un patrón equidistante. Se almacenaron a 25 °C y en oscuridad realizando riegos periódicos. Se tomó como criterio de germinación el brote del embrión (>2 mm). b) **Prueba de Tetrazolio:** Se determinó la viabilidad de las semillas control y desecadas hasta un 5 %H (b.h.) (30 semillas/tratamiento). Las semillas previamente hidratadas por 2 h a 25 °C, se dividieron longitudinalmente a través de la sección media del eje embrionario, una de las mitades se dispuso en una solución 0.5 % (p/v) de tetrazolio (Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) a pH= 7 y se incubaron a 25 °C por 24 h en oscuridad [7]. La solución de tetrazolio se descartó y las semillas se lavaron con agua estéril. Las muestras fueron evaluadas individualmente en un estereoscopio Leica MZ 10F con cámara digital DFC490 (Leica Microscopy Systems Ltd, Germany) y magnificación de 1.25x.

Transiciones térmicas mediante calorimetría diferencial de Barrido: Se analizaron las transiciones térmicas durante el calentamiento de la fracción de cotiledón de las semillas con diferentes %HR y del extracto lipídico usando un DSC-Q100 controlado por el módulo TA-5000 (TA Instruments; EE.UU.). La velocidad de enfriamiento fue 30 °C min⁻¹ hasta

alcanzar $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ con isoterma de 10 min; la velocidad de calentamiento fue de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ para calentar de -150 a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizó el software TA Universal Analysis 2000 (EE.UU.), para determinar la entalpía de la transición de fase (ΔH ; $\text{Jg}^{-1}\text{b.s.}$) y la temperatura de fusión.

Criopreservación de semillas desecadas usando diferentes velocidades de enfriamiento/calentamiento: Se analizó el efecto de las velocidades de enfriamiento y calentamiento durante el proceso de crio preservación sobre la viabilidad, para las semillas control y previamente desecadas entre $0.11 < a_w < 0.85$ aplicando dos protocolos diferentes:

Protocolo convencional (P1): Se colocaron 10 semillas por criovial de polipropileno de 5 mL se sumergieron directamente en nitrógeno líquido (NL; $T = -196\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 30 días.

Protocolo ultrarrápido (P2): las semillas se recubrieron con una delgada capa de aluminio ($20\text{ }\mu\text{m}$) y se colocaron en crioviales de 5 mL (10 semillas/criovial) con perforaciones en la base y en la superficie lateral inferior hasta la mitad de su altura. Los crioviales fueron sumergidos en NL por 30 días. En este protocolo las semillas cubiertas con aluminio se enfrían más rápidamente por contacto directo con el fluido criogénico (NL)[8]. Durante el levantamiento de la cánula el exceso de NL es drenado. Después de esta etapa y con el fin de restaurar el material vegetal criopreservado, los crioviales fueron calentados en un baño termostático a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min [8]. Las semillas re-acondicionadas fueron sembradas según el ensayo de germinación en arena para evaluar la viabilidad. Se determinaron las velocidades de enfriamiento y calentamiento de ambos protocolos mediante el registro de las historias térmicas usando una termocupla tipo T (Cobre-Constantan) ubicada en el centro de la semilla y conectada a un dispositivo de adquisición (TESTO, Alemania).

Análisis estadístico: La germinación de semillas sigue una distribución binomial de probabilidad discreta y un comportamiento dicotómico con solo 2 posibles resultados, "germina" y "no germina". Los valores obtenidos de germinación fueron tabulados y organizados en tablas de contingencia de 2×2 ($gI=1$) y el análisis estadístico realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) aplicable tanto a variables discretas como continuas y calcula cuánto se desvían los datos observados (O) de los esperados (E)

$$\left(\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E} \right)$$

seguido del análisis con múltiples comparaciones de a pares ($\alpha = 0.05$). Se utilizó el software SYSTAT Inc., USA, 2007. Se utilizó la corrección de Yates para el análisis de tablas de contingencia de 2×2 cuando el número de datos es < 5 [9].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semilla de *C. limon* cv. Eureka presentaron un $44.67 \pm 4.33\%$ H (b.h.), un a_w de 0.961 y un 22.21 % (b.h.) (40.14 % b.s.) de contenido lipídico total (LC). La forma de la isoterma se corresponde a una función hiperbólica (Figura 1) que ha sido asociada a semillas con comportamiento no-ortodoxo[4]. El modelo de D'Arcy & Watt [4] se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales de la isoterma. Diferentes tipos de enlace de agua están representados en la ecuación; el primer término describe la absorción de agua en sitios con uniones fuertes; el valor obtenido fue $K' = 0.0806$ en $\text{g H}_2\text{O g}^{-1}\text{b.s.}$ y se encuentra por debajo del límite del nivel de hidratación 1 ($a_w = 0.11$; $\Psi = -293.93\text{ MPa}$).

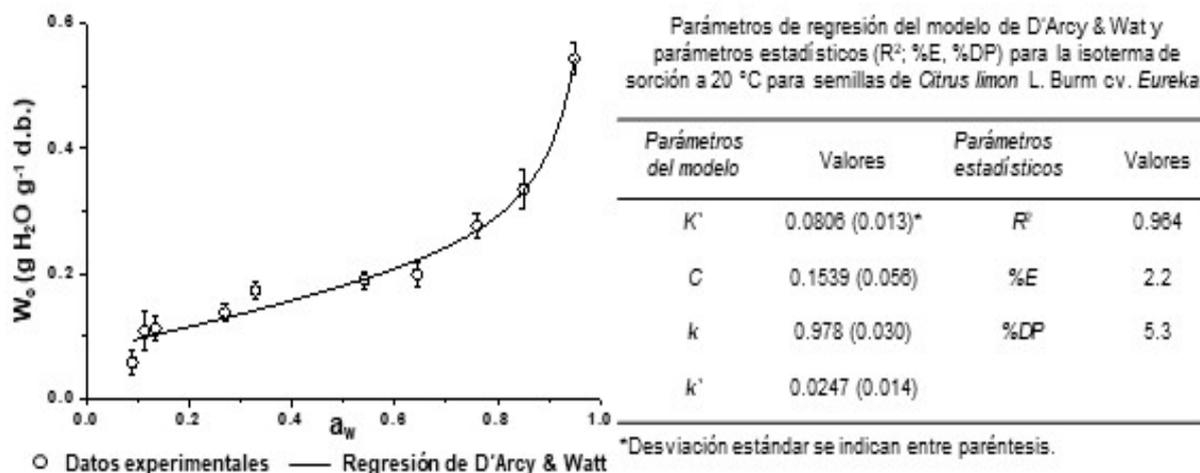


Figura 1. Isotherma de sorción de las semillas *Citrus limon* L. Burm cv. Eureka a 20 °C. Datos experimentales (○) y valores predichos mediante el modelo de D'Arcy & Watt (—).

Tolerancia de las semillas a la deshidratación: Las semillas desecadas entre $0.11 < a_w < 0.85$ presentaron alta viabilidad ($\%G > 80$); los valores inferiores al 80 %G indican una pérdida significativa de viabilidad [10]. Para $a_w \leq 0.33$ ($\Psi \leq -149.43$ MPa) la viabilidad disminuyó significativamente ($p < 0.05$) respecto del control. No se observaron diferencias significativas en el %G entre semillas desecadas a $a_w \geq 0.54$ y el control, por lo tanto, el grado de desecación no afectó negativamente la viabilidad por encima de dicho valor. Estos resultados concuerdan con el límite de desecación recomendado para semillas intermedias de $a_w > 0.1$ que corresponde al *Nivel de hidratación 2* ($-300 < \Psi < -15$ MPa; $0.10 < a_w < 0.89$) en el que el agua se encuentra formando interacciones hidrofílicas [11]. Las semillas con un 5 %H (b.h.) ($a_w = 0.0901$) presentaron una pérdida significativa ($p < 0.05$) de viabilidad (66.7 %G) debido a que estarían en el *Nivel de hidratación 1* ($\Psi < -300$ MPa; $a_w < 0.1$ MPa) en el cual el agua está presente asociada con moléculas cargadas o iónicas. Para la clasificación mediante la prueba de tetrazolio se tuvo en cuenta al patrón de color y la intensidad. La desecación al 5 %H (b.h.) ($a_w = 0.0901$) produjo una disminución significativa en la viabilidad (63.3 %) que puede atribuirse al daño de los tejidos durante esta etapa.

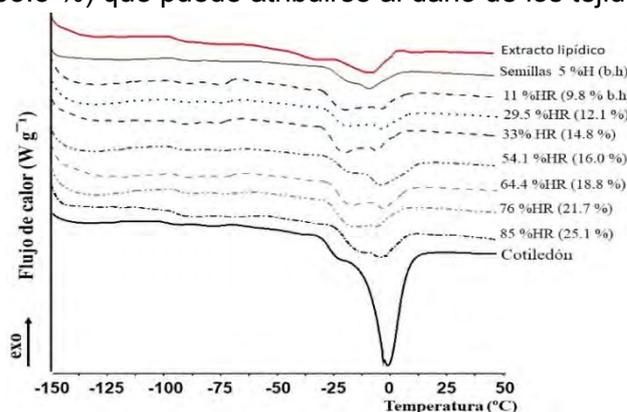


Figura 2 Termogramas de calentamiento de la semilla *Citrus limon* L. Burm cv. Eureka desecadas a 11 a 85% HR y el extracto lipídico.

térmicas que también se aprecian y son notables en los termogramas de semillas con menor %H. El valor de entalpía de la transición de fusión de los lípidos (ΔH_{lip}) fue 10.1 ± 1.1 J g⁻¹ lípido (b.s.); esta transición ocurre en un rango de temperatura cercano a T_m de agua (Figura 2). Las endotermas de fusión de los lípidos sugieren la presencia de triacilglicerol, que tienen transiciones a baja temperatura cercanas a la temperatura de fusión del agua. Dado que la fusión de agua y lípidos se produce en el mismo rango de temperatura, hay una

Transiciones térmicas: Las semillas intermedias ricas en lípidos presentan transiciones térmicas (fusión, cristalización y polimorfismos) correspondientes a los triacilglicerol. Las transiciones térmicas de las semillas con diferentes %H y del extracto lipídico se muestran en la Figura 2. Para el control (cotiledón) se observa un pico endotérmico a $T_m = -1.07$ °C correspondiente a la fusión del agua presente en la semilla que se convirtió en hielo durante el enfriamiento con NL; este pico disminuye a medida que aumenta el grado de desecación. El termograma del extracto lipídico muestra la presencia de varias transiciones

superposición de picos que dificultan la estimación de los calores de fusión de componentes individuales [12]. Se calculó la fracción de agua no congelada W_{Cu} ($\text{g H}_2\text{O g}^{-1}\text{b.s.}$) de las semillas a partir de la intersección de dos regresiones lineales de ΔH medidas por DSC ($\text{J g}^{-1}\text{b.s.}$) frente a su contenido de agua ($\text{g H}_2\text{O g}^{-1}\text{b.s.}$) [12]. El valor obtenido fue $0.19 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}\text{b.s.}$, ligeramente superior a los reportados para *Citrus grandis* y *madurensis* ($W_{Cu} = 0.14$ y $0.12 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}\text{b.s.}$) [12].

Criopreservación de semillas: Curvas de enfriamiento y calentamiento: Las figuras 3.A y B muestran esquemáticamente los dispositivos de criopreservación y las curvas de enfriamiento/calentamiento para los protocolos P1 (convencional) y P2 (ultrarrápido). Se determinaron las velocidades de enfriamiento/calentamiento para las semillas control ($a_w = 0.961$) y desecadas ($a_w = 0.64$), considerando la pendiente inicial en línea recta [13]. P2 exhibió velocidades de enfriamiento y calentamiento muy altas ($\sim 1000 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$); estas velocidades son un 400 % mayores que el protocolo convencional P1 ($\sim 200 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$). Para las semillas con $a_w = 0.64$, las velocidades de enfriamiento fueron superiores a las velocidades presentadas por las semillas control para P1 y P2. Las curvas de calentamiento de las semillas de control para P1 y P2 (Figuras 3.A y B) muestran una zona de meseta que corresponde a la fusión del hielo que es más notable para P2. Este evento no fue detectado a $a_w = 0.64$.

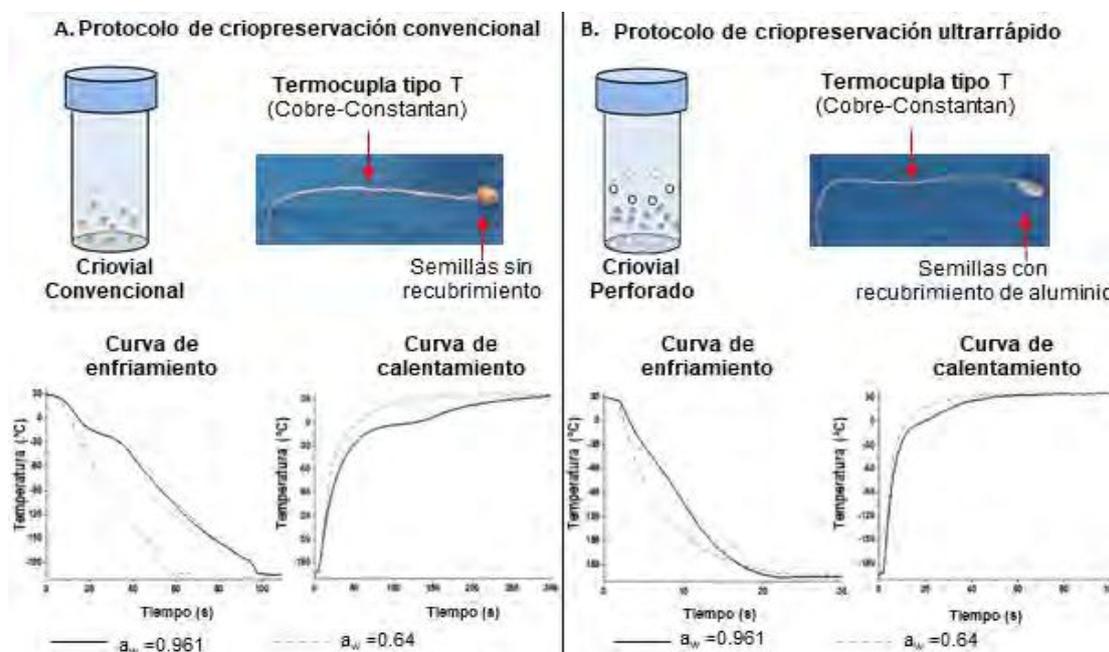


Figura 3. Esquema de los dispositivos y fotografías del termopar dentro de las semillas. **A.** Protocolo de criopreservación convencional (P1); **B.** Protocolo ultrarrápido (P2: semillas recubiertas con papel de aluminio y crioviales de polipropileno perforados). Las curvas de enfriamiento/calentamiento se presentan para las semillas $a_w = 0.961$ (control,) y con $a_w = 0.64$ ().

Sensibilidad a la exposición a nitrógeno líquido (LN) aplicando diferentes protocolos de criopreservación: Aunque el porcentaje de germinación (%G) después de la desecación entre $0.1 < a_w < 0.85$ fue superior al 80 %, a los fines de alcanzar una correcta criopreservación del germoplasma es importante detectar el intervalo de a_w que alcance una alta viabilidad después del proceso global, que incluye una etapa de desecación y posterior enfriamiento y calentamiento. La Tabla 1 muestra el %G de las semillas a los 25 días después de la siembra para los protocolos de criopreservación con 7 condiciones de desecación previa.

Tabla 1. Viabilidad de semillas (%G) a 25 días para los protocolos de criopreservación

a_w	Viabilidad de semillas %G	
	P1 (convencional)	P2 (ultrarrápido)

0.11	20.0 ^{ab}	43.3 ^b
0.29	53.3 ^c	66.7 ^{bcd}
0.33	40.0 ^{bc}	73.3 ^{cd*}
0.54	43.3 ^{bc}	76.7 ^{cd*}
0.64	83.3 ^d	83.3 ^d
0.76	46.7 ^c	73.3 ^{cd*}
0.85	50.0 ^c	60.0 ^{bc}
0.91	3.3 ^a	10.0 ^a

Los valores con diferentes superíndices (^{a, b, c, d}) dentro de una columna y con (*) dentro de una fila son estadísticamente diferentes según la prueba de Chi cuadrado (χ^2) y la corrección de Yate ($\alpha = 0.05$).

En $a_w = 0.64$, el %G fue máximo para P1 y P2 (83.3 %; $p > 0.05$). Para este valor de a_w se obtuvo mediante la isoterma de sorción (modelo de D'Arcy & Watt) el valor de $W_c = 0.19 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ b.s.}$, el cual coincide con la fracción de agua no congelable de la semilla y concuerda con el valor determinado por DSC. El resultado obtenido es relevante ya que la supervivencia de las semillas se ve afectada por la formación de hielo intracelular durante el enfriamiento por el daño provocado en los tejidos. En $a_w = 0.76$ hubo una reducción significativa en el %G cuando se empleó P1 ($\%G_{P1} = 46.7$ y $\%G_{P2} = 73.3$) (Tabla 1), observándose un menor daño cuando se aplican velocidades ultrarrápidas durante el proceso de criopreservación. Para un rango entre $0.33 < a_w < 0.54$, se observaron diferencias significativas entre protocolos ($p < 0.05$), teniendo P2 una mejor performance comparada P1. El %G más bajo de P1 se puede atribuir a las menores velocidades de enfriamiento/calentamiento en comparación con P2. El máximo %G después del tratamiento con NL, se logró cuando se aplicó una etapa de desecación previa en $a_w = 0.64$ utilizando el protocolo convencional (P1). Cuando se utiliza el protocolo ultrarrápido (P2) con velocidades de enfriamiento/calentamiento aproximadamente 5 veces más altas, esto permitió alcanzar un intervalo de desecación previa más amplio ($0.33 < a_w < 0.76$, nivel de hidratación 2). Las semillas criopreservadas con P2 ($\sim 1000 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$) mostraron una mayor viabilidad, lo que indica que la performance de P2 es mejor que P1.

CONCLUSIONES

Citrus limon L. Burm cv. Eureka es un recurso estratégico y comercial para Argentina que se encuentra entre los diez principales productores mundiales de cítricos. La criopreservación de su germoplasma durante largos períodos es de gran importancia para mantener el recurso genético. La isoterma de sorción se determinó y modeló utilizando la ecuación D'Arcy & Watt. Las semillas desecadas entre $0.1 < a_w < 0.85$ (nivel de hidratación 2: $\Psi > -300 \text{ MPa}$) muestran una alta viabilidad ($\%G > 80$). Los estudios de viabilidad por germinación en arena y la prueba de tetrazolio para un 5 %H (b.h.) ($a_w = 0.0901$), demostraron que la semilla se clasifica como intermedia según su tolerancia a la desecación. Se determinó la fracción de agua no congelada $W_{Cu} = 0.19 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ b.s.}$ que corresponde $a_w = 0.64$ según la isoterma de sorción. Para estudiar el efecto de la criopreservación en la viabilidad de la semilla, se probó la performance de diferentes protocolos de criopreservación evaluando las velocidades de enfriamiento/calentamiento. El protocolo convencional (P1) con velocidades de enfriamiento/calentamiento de $200 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ y en el protocolo ultrarrápido (P2) con velocidades de enfriamiento/calentamiento $\sim 1000 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ presentan viabilidad máxima ($\%G = 83.3$) para $a_w = 0.64$ (fracción de agua no congelable). Por lo tanto, la viabilidad de las semillas analizadas se ve negativamente influenciada por la formación de hielo intracelular a $a_w > 0.64$. El uso de P2 con velocidades de enfriamiento/calentamiento 5 veces mayores que P1, permite aplicar un rango más amplio de condiciones de desecación previa ($a_w = 0.33 - 0.76$) en los procedimientos de criopreservación. Con contenidos de humedad más altos, la formación de hielo o la de vitrificación son responsables de la pérdida de viabilidad y dependen de las velocidades de enfriamiento/calentamiento.

REFERENCIAS

[1] USDA (2018). GAIN Report. Argentina Citrus Annual Lemons, Oranges and Tangerines-

Global Agricultural Information Network.1-15

[2]Federación de cítricos de Argentina. Disponible en: www.fedecitru.org

[3]AOAC (2010).Official methods of analysis.13thed. Washington.Association of Official Analytical Chemists. 1018.

[4] Dussert S., Chabrilange N., Engelmann F., Hamon S. (1999). Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus *Coffea* L. *Seed Science Research* 9 (2): 135-144.

[5] Lomauro CJ., Bakshi AS., Labuza TP. (1985). Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: Fruit, vegetable and meat products. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 18(2): 111-117.

[6] Vertucci, CW., Leopold, AC. (1987a). Water binding in legume seeds. *Plant physiology*, 85(1), 224- 231.

[7] Patil VN., Dadlani M.(2009).Tetrazolium test for seed viability and vigour. *Handbook of Seed Testing*: 209-241.

[8] Walters C., Wesley-Smith J., Crane J. et al. (2008).Cryopreservation of recalcitrant (iedesiccationsensitive) seeds. In: *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York, NY. 465-484.

[9] Stefanescu C., Berger VW., Hershberger S. (2005).Yates's continuity correction. *Encyclopaedia of Statistics in Behavioural Science* 4: 2127- 2129.

[10]FAO (2014). Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Roma.

[11] [12] Hor YL., Kim YJ. Ugap A., et al. (2005). Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: Citrus as a case study. *Annals of Botany* 95(7): 1153-1161.

[12] Hor YL., Kim YJ. Ugap A., et al. (2005). Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: Citrus as a case study. *Annals of Botany* 95(7): 1153-1161.

[13] Hong TD., Ellis RH. (1996). A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical Bulletin N°. 1. Engels JMM, Toll J, eds. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

[13]Mazur P., Seki S. (2011). Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $95\text{ to }70.000\text{ }^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ and warmed at $610\text{ to }118.000\text{ }^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology* 62(1): 1-7.