

CRIOCONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE TECA (*Tectona grandis* L.F)

Ana Hine Gómez^{1/*}, Pilar Vargas Castillo^{**}, Ana Abdelnour Esquivel^{**}

Palabras clave: Criopreservación, semillas, endocarpo, teca, *Tectona grandis*, nitrógeno líquido.

Keywords: Cryopreservation, seed, endocarp, teak, *Tectona grandis*, liquid nitrogen.

Recibido: 19/09/12

Aceptado: 01/03/13

RESUMEN

La teca (*Tectona grandis* L.f) es un árbol tropical con gran demanda por la alta calidad de su madera y rápido crecimiento. Los programas de mejoramiento genético para esta especie han dado como resultado semillas de mejor calidad y, al mismo tiempo, el incremento en la calidad de las plantaciones. Con el objetivo de conservar la diversidad genética y garantizar la materia prima para los programas de mejoramiento y reproducción futura, las semillas de teca son mantenidas en bancos de semillas convencionales bajo condiciones de temperatura que oscilan entre 4° y -20°C. Sin embargo, hay otras modalidades que pueden emplearse para complementar la conservación de este valioso germoplasma. La criopreservación o almacenamiento en nitrógeno líquido (NL, -196°C) presenta importantes ventajas sobre otras técnicas de conservación, como la posibilidad de almacenamiento por tiempo indefinido y en condiciones de alta estabilidad genética. En este estudio se evaluó la sobrevivencia y regeneración de plantas después del congelamiento de las semillas en nitrógeno líquido (NL), con el uso de la técnica de desecación y congelamiento rápido. La metodología fue evaluada tanto en semillas aisladas del endocarpo (semillas) como en semillas rodeadas por el endocarpo (semillas con endocarpo), que permite observar tasas de germinación de 84% y 70% respectivamente, a los 28 días en cultivo, después de la descongelación.

ABSTRACT

Cryopreservation of teak (*Tectona grandis* L.f) seeds. Teak (*Tectona grandis* L.f) is a tropical tree of commercial value due to the high demand of its high-quality wood and rapid growth. Genetic improvement programs for this species have resulted in seeds of better quality and, at the same time, improvement in the quality of plantations. To preserve genetic diversity and guarantee the raw material for improvement programs and for future reproduction, seeds are kept under conventional seed banks conditions with temperature ranging between 4 and -20°C. However, there are other means to conserve this valuable germplasm. Cryopreservation is the storage of plant material in liquid nitrogen (NL, -196°C) and its major advantage is the conservation for indefinite periods of time, under high genetic stability conditions. Survival and regeneration of plants after seed freezing in liquid nitrogen (LN) were evaluated in this work, using the desiccation and rapid freezing technique. The methodology was tested both, in seeds isolated from endocarps (seeds) asin seeds inside endocarps (seeds with endocarps), with germination rates, after thawing and 28 days in culture, of 84% and 70% respectively.

1/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: ana.hine.gomez@una.cr

* Instituto de Investigaciones forestales (INISEFOR), Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

** Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

La teca (*Tectona grandis*) (Verbenaceae) es un árbol del trópico que produce una de las maderas más valiosas, principalmente para la industria del mueble (CAB Internacional 2000, Fonseca 2004). La gran demanda de madera por el mercado ha promovido el establecimiento de plantaciones y programas de mejoramiento genético de esta especie. Estos programas producen semillas de mejor calidad a través del cruce de individuos sobresalientes o a través del uso de la clonación de individuos seleccionados, ambas estrategias son utilizadas en teca (IUFRO 2004, Vallejos et ál. 2010). Por lo general, las semillas de especies forestales son almacenadas en bancos convencionales de semillas a temperaturas que varían entre los 4°C y -20°C y si se mantienen con un bajo contenido de humedad, teóricamente, el periodo de conservación se incrementa. Sin embargo, aún en estas condiciones de almacenamiento, las semillas sufren una progresiva pérdida de viabilidad y calidad fisiológica con el tiempo, por lo que periódicamente el material debe renovarse (Abdelnour et ál. 2007, Cardoso et ál. 2000). Un método que puede utilizarse para complementar esta modalidad de almacenamiento y así disminuir el riesgo de pérdida de viabilidad y asegurar la calidad del material es la criopreservación. La criopreservación consiste en el almacenamiento de células, tejidos y órganos a ultra baja temperatura esto es de -150°C a -196°C, por lo general en nitrógeno líquido (LN) por tiempo indefinido (Engelmann 2010, González et ál. 2004). Las principales ventajas técnicas de esta metodología de conservación son el reducido espacio en infraestructura requerido, la independencia de la electricidad para mantener las ultra bajas temperaturas y la fácil adquisición del nitrógeno líquido. Además, una vez en almacenamiento, no se requiere manipular las muestras, lo que reduce los costos de labor y mantenimiento. Adicionalmente, las bajas temperaturas conservan la estabilidad genética del material por largos periodos (Abdelnour 2003, García et ál. 2007, González et ál. 2004).

El principal objetivo de esta investigación fue adaptar la técnica de criopreservación, por medio de la desecación y el congelamiento rápido en nitrógeno líquido en semillas aisladas del endocarpo (semillas) y semillas dentro del endocarpo (semillas con endocarpo) de teca (*Tectona grandis*). El desarrollo de esta metodología permitirá la conservación a largo plazo del recurso genético de esta especie como reserva y complemento de otras formas de conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material experimental se utilizaron semillas aisladas de endocarpos (semillas) y semillas contenidas en el endocarpo (semillas con endocarpo) (Figura 1), donadas por la empresa Maderas Preciosas de Costa Rica (MACORI). El contenido de humedad tanto de las semillas como de las semillas con endocarpo fue determinado antes del congelamiento, con base en el peso fresco y seco (Abdelnour 2003) (secado en horno a 103°C por 17 h), de acuerdo con las recomendaciones del International Seed Testing Association (ISTA 2008).



Fig. 1. Endocarpos de teca (*Tectona grandis*). A. Lijados, B. Lijados e incubados en AG₃ y C. Semilla desnuda.

Criopreservación de semillas

Para determinar la sobrevivencia al nitrógeno líquido, se utilizaron semillas con un contenido de humedad de 6% y se evaluaron 2

tratamientos: semillas congeladas (NL+) y semillas no congeladas (NL-). Para cada tratamiento, 3 grupos de 25 semillas fueron subgrupadas en 5 réplicas de 5 semillas cada una y cada replica fue colocada en un criotubo de polipropileno de 2 ml. El congelamiento se efectuó por inmersión directa de los criotubos en NL. Después de una hora, los materiales fueron descongelados por incubación de los viales en un baño de agua a 40°C por 2 min (Engelmann 2010). Una vez descongeladas, las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% i.a., durante 10 min (Abdelnour y Muñoz 2005, Ramírez et ál. 2003). Para la germinación y recuperación de plantas in vitro, las semillas fueron cultivadas individualmente en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 ml del medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (MS) (1962) enriquecido con 0,5 mg.l⁻¹ BAP (6-Benzylaminopurina), 3% sacarosa; el pH fue ajustado a 5,7 antes de la esterilización en autoclave (21°C, 1,2 ATM/cm² de presión, 25 min) y como gelificante se adicionó 2,7 g.l⁻¹ Phytigel™ (Sigma, St. Louis, MO, USA) (Ramírez et ál. 2003). Por último, los cultivos fueron colocados en el cuarto de crecimiento a 25°C y mantenidos en la oscuridad durante una semana, después de este periodo, fueron expuestos a un fotoperiodo de 16 h luz y 24,2 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidad lumínica. El material fue evaluado semanalmente durante un mes, en relación con el porcentaje de germinación, número de hojas y longitud de brote y raíz.

Crioconservación de semillas con endocarpos

Las semillas con endocarpo (contenido de humedad de 8%) fueron sometidas a 3 tratamientos pregerminativos y adicionalmente cada uno de estos fue sometido al congelamiento en NL, para obtener 6 tratamientos experimentales: semillas con endocarpo sin lijar (SL), semillas con endocarpo sin lijar + NL (SL+NL), semillas con endocarpo lijado con papel lija #100 (L), semillas con endocarpo lijado + NL (L+NL) y semillas con endocarpo lijado e incubados por 24 h en una solución de 10 mg.l⁻¹ de AG₃ (ácido giberélico) (L+AG₃) y semillas con endocarpo lijado

e incubadas en AG₃ después del congelamiento en NL (L+AG₃+NL). Las semillas con endocarpo fueron colocadas en crioviales de polipropileno de 15 ml y congelados por inmersión directa en NL, donde permanecieron durante una hora. El descongelamiento se llevo a cabo por incubación de los criotubos en un baño de agua a 40°C durante 2 min. Los tratamientos sin la exposición al NL fueron cultivados inmediatamente después del tratamiento pregerminativo. La unidad experimental fue un endocarpo conteniendo de 1 a 3 semillas, cada tratamiento consistió de 25 endocarpos y cada tratamiento se repitió 3 veces. La germinación de las semillas con endocarpo se llevó a cabo en 2 condiciones diferentes: en cámara de germinación (30°C y 100% humedad relativa) con Peat Moss (*Sphagnum* sp.) como sustrato en cajas plásticas y en condiciones de invernadero (aproximadamente 27°C, 60% humedad relativa y 22,6 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidad lumínica) con arena de río lavado como sustrato.

Las variables evaluadas fueron el porcentaje de germinación, número de plantas por endocarpo, número de hojas y longitud del brote y raíz. Los ensayos se evaluaron semanalmente por un mes. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el análisis de varianza. Las diferencias entre tratamiento fueron determinadas con la prueba de Tukey (Di Rienzo et ál. 2009, Statsoft, Inc. 2005).

RESULTADOS

Crioconservación de semillas

Las semillas con un contenido de humedad de 6% sobrevivieron la inmersión en nitrógeno líquido por una hora. En condiciones de cultivo in vitro, el porcentaje de germinación de las mismas se incrementó con el tiempo y de acuerdo con el análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados después de 28 días en cultivo. El porcentaje de germinación total fue 84% para las semillas congeladas (+LN) y 92% para las no congeladas (-LN) (Figura 2A).

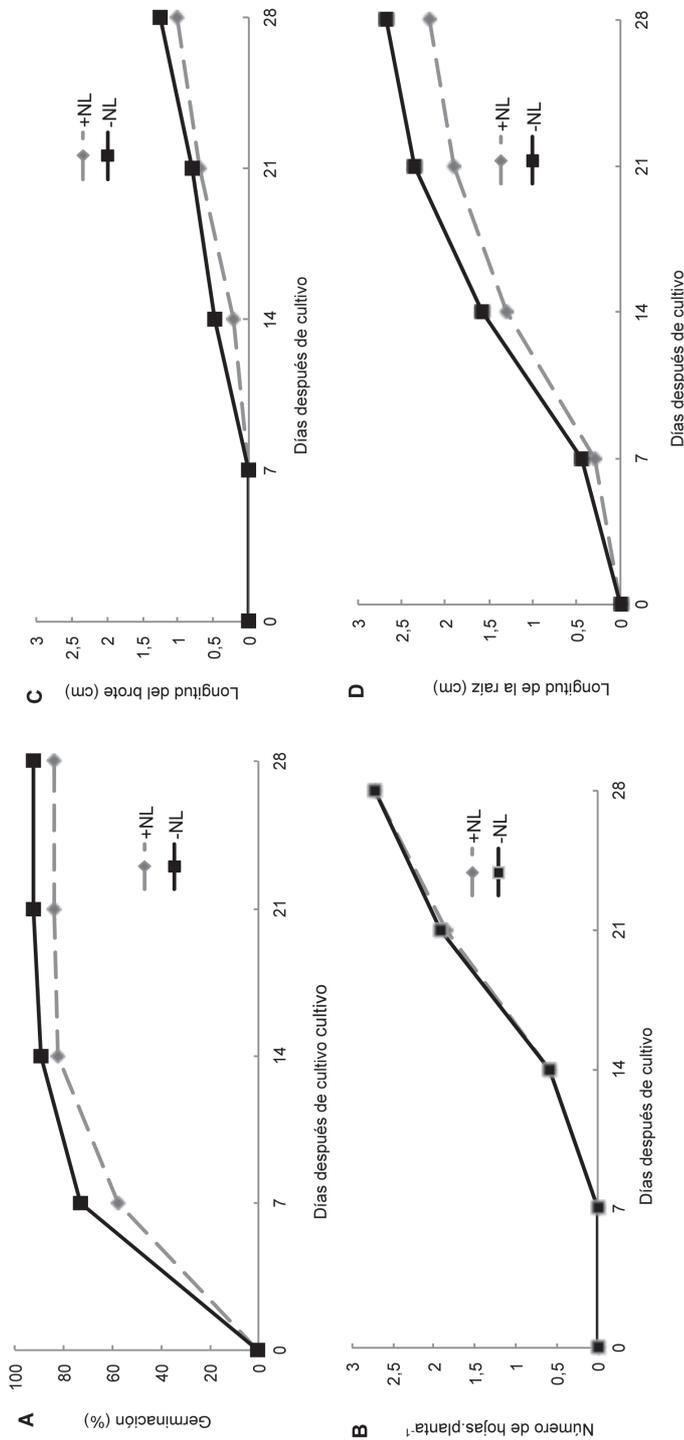


Fig. 2. A. Porcentaje de germinación de la semilla de teca (*Tectona grandis*). Promedio de: B. Número de hojas por brote, C. Longitud de brote y D. Longitud de raíz de plántulas germinadas a partir de semilla congelada (+NL) y no congelada (-NL), evaluadas durante 28 días en condiciones in vitro.

Al evaluar las plántulas desarrolladas a partir de las semillas congeladas y no congeladas, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, con respecto al número de hojas, obteniéndose un promedio de 2 hojas verdaderas por planta después de 21 días en cultivo (Figura 2B). De igual manera, no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos en términos de longitud de brote y la longitud promedio fue de 1 cm para ambos tratamientos, semillas congeladas y no congeladas (Figura 2C). Tampoco se observaron diferencias significativas para la longitud de la raíz, por ser la longitud promedio de 2 cm para ambos tratamientos, semillas congeladas y no congeladas (Figura 2D).

Crioconservación de semillas con endocarpo

Cuando las semillas con endocarpo fueron congeladas (8% contenido de humedad) y

recuperadas en condiciones de cámara de germinación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos pregerminativos congelados en NL: SL+NL, SL+AG₃+NL, L+NL y el tratamiento que consistió de los endocarpos lijados sin congelar (L-NL), observándose alrededor de 40% de germinación a los 14 días de cultivo (Figura 3).

Por otra parte, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos SL-NL (sin lijar, sin congelar) (25% de germinación) y los tratamientos L-NL (lijados sin congelar) (44% de germinación), L+AG₃-NL (lijados e incubados en AG₃) (60% de germinación). En general, se observó un efecto positivo en los porcentajes de germinación cuando se efectuó alguno de los tratamientos pregerminativos adicionales (Figura 3). El promedio de germinación de semillas por endocarpo fue de una planta con 2 hojas verdaderas después de 14 días de cultivo.

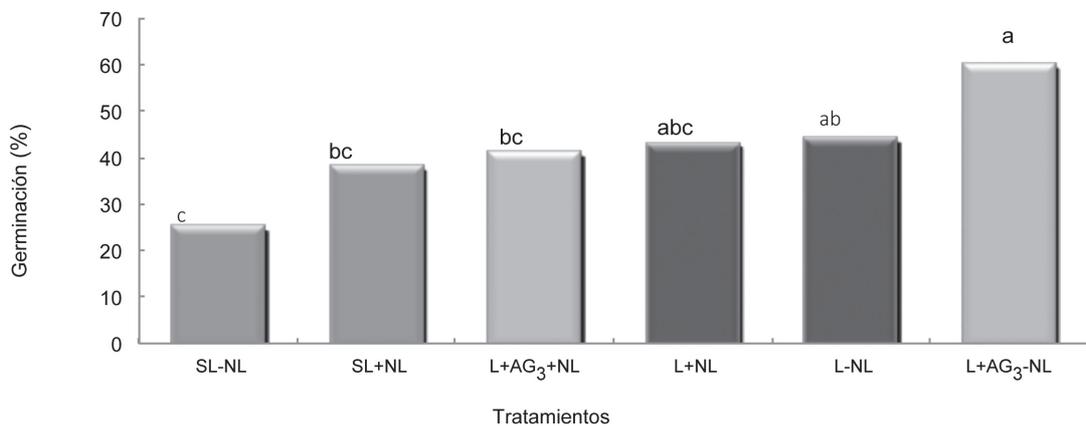


Fig. 3. Germinación de semillas con endocarpo de teca (*Tectona grandis*) en condiciones de cámara de germinación, sin lijar (SL), lijados (L), lijados e incubados en una solución AG₃ (L+AG₃) congeladas (+NL) y no congeladas (-NL), evaluadas durante 14 días.

Al comparar el desarrollo de las plantas, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el tratamiento L+NL y los tratamientos SL+NL y L-NL, con respecto a la longitud de los brotes y la raíz, observándose las mayores longitudes promedio con el tratamiento L+NL con un promedio de longitud de brote y raíz de 3,8 cm y 2,9 cm respectivamente (Cuadro 1).

Las semillas con endocarpo germinadas en condiciones de invernadero, no mostraron diferencias estadísticas entre los tratamientos congelados y no congelados en NL, los tratamientos mostraron un crecimiento muy similar, con porcentajes

de germinación de 65% y 80% respectivamente, 56 después de la siembra (Figura 4A). Resultados similares fueron observados con respecto al número de plantas por endocarpo (1 planta por endocarpo) y con respecto al número de hojas por planta (2 hojas verdaderas por planta) (Figura 4B y C). En cuanto a la longitud de los brotes, a los 28 días de la siembra, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos. Sin embargo, a los 56 días, los tratamientos que no fueron sometidos al congelamiento mostraron brotes más elongados que aquellos provenientes de semillas con endocarpos congelados (Figura 4D).

Cuadro 1. Efecto del congelamiento sobre el crecimiento de plántulas de teca (*Tectona grandis*) germinadas en cámara a partir de semillas con endocarpo sin lijar (SL), lijados (L) y lijados e incubados en una solución AG_3 (L+ AG_3), congeladas (+NL) y no congeladas (-NL), después de 14 días después de la siembra.

Tratamiento	Longitud promedio del brote (cm)*	Longitud promedio de la raíz (cm)*
L+NL	3,8 a	2,9 a
L+ AG_3 +NL	2,8 ab	2,0 ab
L+ AG_3 -NL	2,7 abc	2,1 ab
SL-NL	1,5 abc	2,0 ab
SL+NL	2,1 bc	1,7 b
L-NL	1,5 c	1,4 b

* Valores con letras distintas indican diferencias significativamente por la prueba de Tukey $p \leq 0,05$.

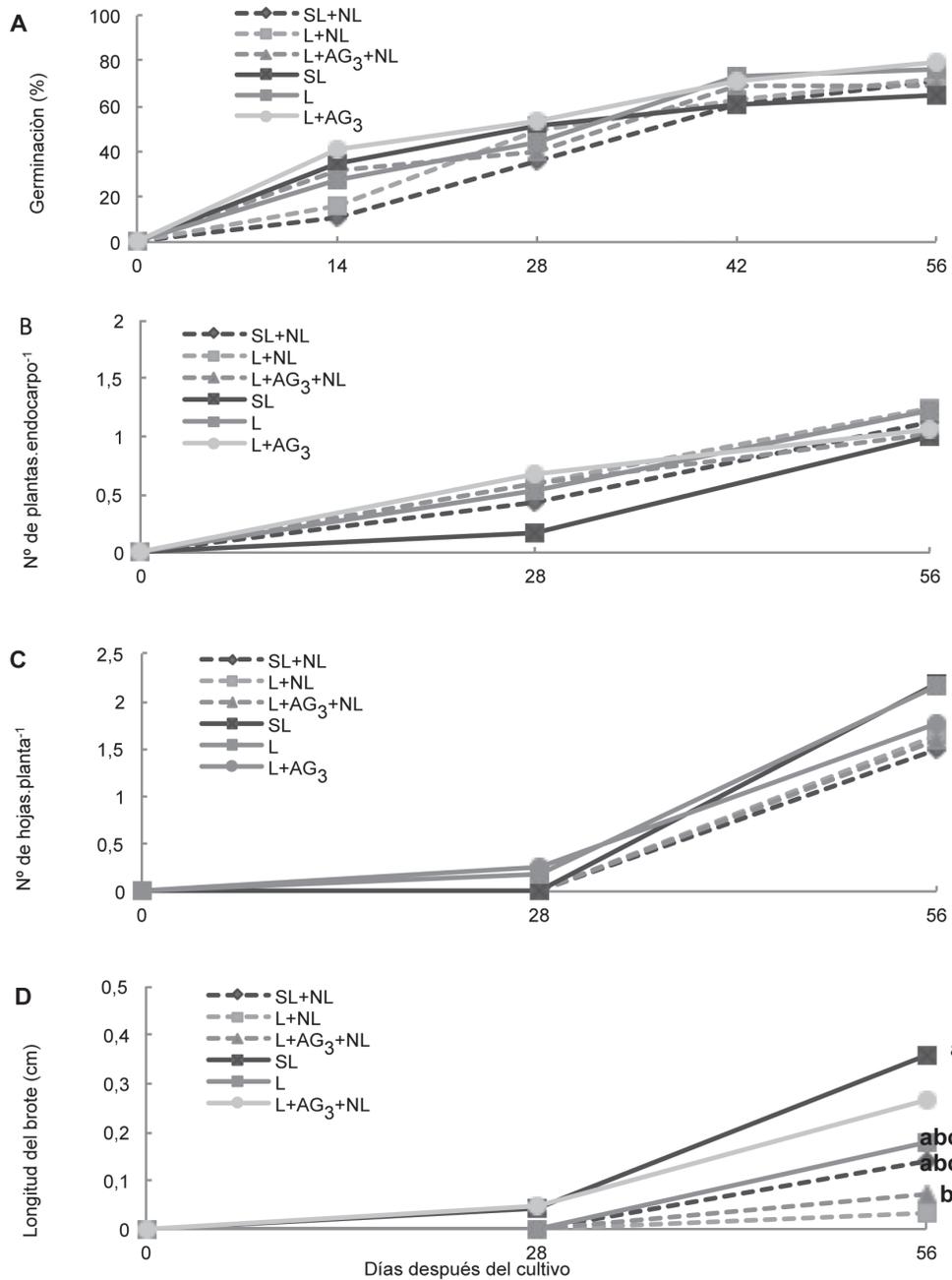


Fig. 4. A. Germinación de semillas con endocarpo de teca (*Tectona grandis*). Promedio de: B. Número de plantas germinadas por endocarpo, C. Número de hojas por planta y D. Longitud del brote de plántulas germinadas a partir semilla con endocarpos sin lijar (SL), lijados (L) y lijados e incubados en una solución AG₃ (L+AG₃) congeladas (+NL) y no congeladas (-NL) y evaluadas a los 28 y 56 días después del cultivo en condiciones de invernadero.

DISCUSIÓN

Las semillas de teca con contenido de humedad de 6% no fueron sensibles a la exposición a las ultra bajas temperaturas del NL. De igual manera, las semillas con endocarpo, con contenido de humedad de 8%, fueron capaces de resistir el congelamiento en NL, pero la respuesta varió de acuerdo con las condiciones de germinación evaluadas.

Las semillas con endocarpo germinadas en condiciones de invernadero mostraron similares porcentajes de germinación, sin importar el tratamiento pregerminativo o si fueron o no congeladas, lo que parece indicar que no hubo efecto negativo del congelamiento en su germinación. De manera similar, cuando las semillas con endocarpo fueron cultivadas en cámara de germinación, los resultados después de 14 días de cultivo indicaron que, no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos, que incluyeron las congeladas en NL, la única diferencia se observó al comparar los tratamientos con AG₃, donde el tratamiento que incluyó la congelación mostró un porcentaje de germinación menor que el control (no congelado, -NL).

De acuerdo con Pritchard and Nadarajan (2008), el contenido de humedad es un factor clave para la sobrevivencia a las ultra bajas temperaturas, y mencionan que las semillas ortodoxas, con contenido de humedad $\leq 8\%$ no son afectadas por el nitrógeno líquido. Afirmación confirmada por los resultados de esta investigación en teca. Además, mencionan que las semillas almacenadas con mayores contenidos de humedad tienden a presentar disminuciones en su germinación, mueren o las plantas germinadas muestran anomalías.

Por otra parte, el ácido giberélico (AG₃) es ampliamente utilizado en ensayos de germinación para romper la dormancia en semillas, ya que induce la actividad de enzimas hidrolíticas, como la α -amilasa y proteasas, que permiten la movilización de las reservas del endospermo (George et ál. 2008). Otra función atribuida a este regulador del crecimiento es en el control del ciclo celular, ya que promueve la entrada de la

célula a la fase de síntesis y mitosis (Taiz y Zeiger 2006, George et ál. 2008). Sin embargo, en esta investigación no se confirmó, ni con el análisis estadístico, que el AG₃ o el lijado incrementaran el porcentaje de germinación de las semillas con endocarpo.

La crioconservación de semillas ha sido evaluada tanto en especies herbáceas como en especies maderables (Engelmann 2010). En especies forestales, el efecto del nitrógeno líquido sobre la germinación y desarrollo de las plantas es muy variable. En *Cedrela fissilis* y *Alnus glutinosa* no se presentaron diferencias significativas entre la germinación de las semillas y el desarrollo de las plantas cuando se compararon semillas congeladas y no congeladas en NL (Da costa et ál. 2003, Chmielarz 2010). En el caso de *Salix alba* and *Salix matsudana*, el congelamiento no afectó la germinación propiamente dicha, pero la germinación si se afectó conforme se disminuyó el contenido inicial de humedad de las semillas (Maroder et ál. 2000). También en *Pinus* sp., se ha demostrado la capacidad de las semillas de resistir el congelamiento sin ver afectada su viabilidad, sin embargo, el efecto sobre la germinación varió entre las diferentes especies de este género (Pita et ál. 1998, Beardmore et ál. 2008).

Por otra parte, Salomão (2002) mencionó que al trabajar con especies forestales que presenta semillas rodeadas por un endocarpo duro, por ejemplo, en *Buchenavia tomentosa* and *Guettarda pohliana*, su germinación no se vio afectada con el congelamiento. Sin embargo, en *Byrsonima basiloba*, *Schinopsis brasiliensis* y *Spondias mombin* se observó una baja germinación de las semillas que no fueron congeladas y un incremento considerablemente en la germinación de las congeladas. Pritchard y Nadarajan (2008) explican que el descongelamiento rápido después del almacenamiento a las ultra bajas temperaturas del nitrógeno líquido reduce la dureza del endocarpo y lo desquebraja al reducir su impermeabilidad al agua, lo que facilita la germinación. Lo anterior podría explicar los resultados obtenidos en esta investigación en aquellos tratamientos

donde se utilizaron semillas con endocarpo sin lijar congeladas y no congeladas.

Por otra parte, en *Gmelina arborea*, el lijado del endocarpo y la incubación en una solución de 10 mg.l⁻¹ de AG₃, incrementó la germinación de las semillas sometidas al congelamiento en nitrógeno líquido, en comparación con los controles sin congelar (Abdelnour et ál. 2007). En el presente estudio con teca, el AG₃ no tuvo un efecto significativo sobre la germinación de las semillas con endocarpo que fueron congeladas, lo que confirma las observaciones de Salomão (2002) sobre la variabilidad en la respuesta de las diferentes especies forestales a los factores evaluados.

Al observar los resultados obtenidos con teca durante esta investigación y con respecto al desarrollo del brote (in vitro, en cámara de germinación y en invernadero) y la raíz (in vitro y en cámara de germinación) fue evidente que para potenciar la germinación de las semillas se deben proporcionar las condiciones apropiadas de temperatura (27°C a 30°C) y humedad (100%), condiciones proporcionadas in vitro y en la cámara de germinación, que son también clave para el desarrollo de las plántulas. En estas condiciones controladas, las plántulas mostraron un mejor crecimiento comparadas con las provenientes de semillas germinadas en invernadero, donde las condiciones de temperatura y humedad no permanecieron constantes durante los ensayos. Por lo anterior, para reproducir los resultados obtenidos en el laboratorio es importante considerar el uso de invernaderos con condiciones controladas. Esta afirmación es válida cuando se comparan los resultados obtenidos con respecto a la longitud del brote en los tratamientos con y sin congelación en condiciones de invernadero y cámara de germinación. El desarrollo y el crecimiento de las plántulas son notablemente sensibles a la temperatura y cada especie tiene una temperatura óptima que crece al máximo, cuando la temperatura disminuye, el metabolismo se retarda porque las reacciones enzimáticas que ocurren dentro de las plantas se ven afectadas (Salisbury y Ross 2002). Adicionalmente, Flores (1999), señala que

el efecto de la temperatura está unido al efecto de la humedad y la luz y que en conjunto determinan la capacidad y porcentaje de germinación de las semillas.

Los resultados de esta investigación indican que la técnica de crioconservación puede ser considerada como una estrategia complementaria para el almacenamiento a largo plazo de semillas de teca, para mantener duplicados de materiales valiosos conservados por otros medios, lo que asegura la existencia del recurso.

LITERATURA CITADA

- ABDELNOUR A. 2003. Conservación in vitro de los recursos fitogenéticos. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica. 27 p.
- ABDELNOUR A., MUÑOZ A. 2005. Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). Kurú: Revista Forestal 5:1-11.
- ABDELNOUR A., ROJAS G., ALFARO U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. Tecnología en marcha 1:98-103.
- BEARDMORE T., WANG B.S.P., PENNER M., SCHEER G. 2008. Effects of seed water content and storage temperature on the germination parameters of white spruce, black spruce and lodgepole pine seed. *New Forests* 36:171-185.
- CAB INTERNACIONAL. 2000. Forestry Compendium Global Module: *Tectona grandis* L. f. Wallingford, UK, CABI. 1 cd.
- CARDOSO F., PITA J.M., PALMEIRA J. 2000. Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. Campiña Grande. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais 2:67-71.
- CHMIELARZ P. 2010. Cryopreservation of orthodox seeds of *Alnus glutinosa*. *CryoLetters* 31:139-146.
- DA COSTA E., BENSON E., OLTRAMARI A., SILBILA P., RIGHETTO J., VIANA A. 2003. In vitro conservation of *Cedrela fissilis*. *Biodiversity and conservation* 12:837-848.
- DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. 2009. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- ENGELMANN F. 2010. Use of biotechnologies for the conservation of plant diversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 47:5-16.
- GARCÍA L., DE FERIA M., ACOSTA K. 2007. Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Biocología Vegetal* 2:67-79.
- FLORES V.E. 1999. La planta: estructura y función. Vol II. Cartago, CR, Libro Universitario regional, p. 884.

- FONSECA W. 2004. Manual para productores de teca (*Tectona grandis L.f*) en Costa Rica. San José, Costa Rica, FONAFIFO. Consultado 17 enero 2006. Disponible en <http://www.fonafifo.com>
- GEORGE E.F., HALL M.A., DE KLERK G. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3^a ed. Springer, The Netherlands, pp. 2-3.
- GONZÁLEZ M.E., CLAVERO R.I., LÓPEZ A.J.M., REVIEW. 2004. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. Spanish Journal of Agricultural Research 3:341-351.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 2008. International Ruler For Seed Testing: The germination test. Seed Science and Technology, p. 7.
- INTERNATIONAL UNION OF FOREST RESEARCH ORGANIZATION. FOREST GENETICS MEETING PROCEEDINGS. 2004. Breeding teak in Costa Rica, pp. 105-110. In: L. Bailian and S. McKeand (eds.). North Caroline, USA, IUFRO.
- MARODER H.L., PREGO I.A., FACCIUTO G.R., MALDONADO S.B. 2000. Storage behaviour of *Salix alba* and *Salix matsudana* seeds. Annals of Botany 86:1017-1021.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- PITA J.M., SANZ V., ESCUDERO A. 1998. Seed cryopreservation of seven spanish native pine species. Silvae Genetica 4:220-223.
- PRITCHARD H.W., NADARAJAN J. 2008. Cryopreservation of Orthodox (Desiccation tolerant) Seeds, pp. 485-494 . In: B.M. Reed (ed.). Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer. USA.
- RAMÍREZ D., AGRAMONTE D., GUTIÉRREZ O., BARBÓN R., PÉREZ M., COLLADO R., JIMÉNEZ F. 2003. Propagación in vitro de explantes de teca obtenidos a partir de semillas. Biotecnología Vegetal 3:161-167.
- SALISBURY F.B., ROSS C.W. 2002. Fisiología de plantas 3. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Madrid, ES, International Thomson Editores Spain Paraninfo. S.A, pp. 928-929.
- SALOMÃO A.N. 2002. Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure. Brazilian Journal of Plant Physiology 2:133-138.
- STATSOFT INC. 2005. Staditistica (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com. Tulsa, OK, USA.
- TAIZ L., ZEIGER E. 2006. Plant Physiology. 4th ed. Sunderland, Massachusetts, US Sinauer Associates. Inc. p. 478.
- VALLEJOS J., BADILLA Y., PICADO F., MURILLO O. 2010. Metodología para la selección e incorporación de árboles plus en programas de mejoramiento genético forestal. Agronomía Costarricense 1:105-119.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr