

Determinación del efecto de la crioconservación a largo plazo en la germinación de semillas de tomate silvestre (*Solanum pimpinellifolium*).

Dr. Byron E. Zevallos Bravo

Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López (ESPAM-MFL), Campus Politécnico El Limón, Carrera de Ingeniería Agrícola, Calceta, Manabí, Ecuador. Contacto. bzevallos@espam.edu.ec, byronze@hotmail.com

RESUMEN

Con el objetivo de determinar el efecto de la crioconservación a largo plazo en la germinación de semillas de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium*), se estudió la accesión 56 de una anterior colecta y porque se correspondía con las características propias de la especie en estudio. Se colectó a 95 m sobre el nivel del mar, en la localidad de Zapote, cantón Bolívar, provincia de Manabí, Ecuador. Se empleó un diseño bifactorial: un factor fue la forma de almacenamiento de las semillas: a 4°C (testigo) y semillas crioconservadas. El otro factor fue el tiempo de almacenamiento (0, 6, 12, 18 y 24 meses). Se usaron semillas con 9% de humedad, determinado en base a la masa fresca y mediante su secado a 130°C durante 1,5 horas (ISTA, 2005). La recuperación de las semillas del nitrógeno líquido se realizó de acuerdo con (Stanwood y Bass, 1981). Las semillas (tres repeticiones de 50 semillas por tratamiento) se colocaron sobre tres capas de papel de filtro Whatman No.1 en placas de Petri (Ø: 100 mm) con 15 mL de agua destilada durante 7 días (oscuridad, 27±1°C). Se evaluó el porcentaje de germinación (7 días después de la siembra).

A pesar de que se determinó una disminución en el porcentaje de germinación de las semillas crioconservadas después de 12 meses de almacenamiento, éstas conservaron un valor cercano al 75% hasta el final de la evaluación (24 meses). Se estableció que a pesar de que el proceso de deterioro de las semillas ocurre irremediablemente, la crioconservación hace más lento el proceso y se obtienen niveles de germinación altos.

PALABRAS CLAVE: Crioconservación, Germinación, Tomate silvestre.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más cultivadas en el mundo y los principales países productores son China, India, Estados Unidos y Turquía. En el año 2012 el área de cultivo alcanzó 4,803.680 ha con un volumen de producción total de 211,021.843 t (FAOSTAT, 2012). Es una fuente rica en vitaminas A, B1, B2, B6, C, E y de diversos minerales, además de proteínas, carbohidratos, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido salicílico y fuente de licopeno (Jaramillo *et al.*, 2007).

Por su importancia existen programas de mejoramiento genético encaminados a incrementar la resistencia de la planta al estrés biótico y abiótico (Florido *et al.*, 2007; Álvarez-Hernández, 2009). Sin embargo, éstos programas requieren de la diversidad que existe en las accesiones no cultivadas pues durante su evolución, los parientes silvestres desarrollaron múltiples características que les permitieron sobrevivir en condiciones extremas (Hunter y Heywood, 2012). Además, el potencial del mejoramiento en tomate al utilizar solo germoplasma cultivado llegará a un tope donde las futuras iniciativas de fitomejoramiento utilizarán la diversidad disponible en las especies silvestres emparentadas (Bai y Lindhout, 2007; Menda *et al.*, 2013).

El género *Solanum* L. subsección *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. incluye 17 especies entre las que se encuentran el tomate cultivado (*S. lycopersicum* L.) y la especie silvestre *Solanum pimpinellifolium* L. (Spooner *et al.*, 2005; Peralta *et al.*, 2006). Ambas especies son auto-compatibles y con frutos rojos, pero difieren en el tamaño del fruto y la forma de su hoja (Peralta y Spooner, 2000; Van der Knaap *et al.*, 2014). Esta última se ha utilizado como fuente de genes para el mejoramiento de importantes rasgos del tomate comercial (Juvik *et al.*, 1982; Rick y Chetelat, 1995; Mieslerova *et al.*, 2000; Zuriaga *et al.*, 2009; Pratta *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2012; Merk *et al.*, 2012; Mahuad *et al.*, 2013) por sus facilidades de hibridación con la especie *S. lycopersicum* (Rick, 1979).

La ubicación geográfica de la especie *S. pimpinellifolium* está restringida a las áreas costeras de Perú y Ecuador, y las accesiones ecuatorianas son las menos representadas en la base de datos a nivel internacional (Zuriaga *et al.*, 2009). Además, las poblaciones de esta especie se han reducido o presentan

riesgos de extinción debido a la pérdida de hábitat por factores climáticos (Bioversity, 2006; Bauchet y Causse, 2012).

En este sentido Ecuador figura a nivel mundial entre los cinco países con más alto grado de diversidad biológica (MAE, 2010). Sin embargo, las especies silvestres afines a las cultivadas han sido poco estudiadas y no consideradas de manera explícita en las políticas ambientales (Tapia *et al.*, 2008; Grijalva *et al.*, 2012). En el caso particular de Manabí, provincia costera localizada en el emplazamiento centro-noroeste del Ecuador continental, se considera un centro de agrobiodiversidad muy importante, donde varios de sus cantones (por ejemplo, el cantón Bolívar con 600 km² de extensión) presentan una alta vulnerabilidad al cambio climático (Cuesta *et al.*, 2006; COPISA, 2012).

El concepto de estrategia de conservación complementaria incluye una combinación de diferentes acciones que conducen al uso sostenible de la diversidad (Dulloo *et al.*, 2009). El principio considera el rango de opciones de conservación disponibles y aplica la combinación apropiada y específica (Hunter y Heywood, 2012).

Los dos principales enfoques (*ex situ* e *in situ*) son importantes (Hunter y Heywood, 2012). Mientras que la conservación *in situ* es esencial para generar nueva diversidad por procesos de selección natural, tiene desventajas para la conservación en cuanto a la posibilidad de usar estos recursos genéticos en el fitomejoramiento (Engels *et al.*, 2008; Maxted y Kell, 2009). Es importante respaldar la intervención *in situ* con una conservación complementaria *ex situ* en bancos de germoplasma como semilla, plantas vivas (en campo o en jardines botánicos), cultivo de tejidos o crioconservación (Hunter y Heywood, 2012). Todo conocimiento que se logre se enmarca en el alcance e integración necesaria con la fisiología de la conservación de las especies (Cooke *et al.*, 2013).

La crioconservación es uno de los métodos más prometedores para la conservación a largo plazo y una de sus ventajas es que requiere poco espacio, comparada con las colecciones *in vitro* o de campo (Reed *et al.*, 2001; Panis y Lombardi, 2005; Benson, 2008; Reed, 2008; Houry *et al.*, 2010; Berjak *et al.*, 2011). La crioconservación mediante la utilización de temperaturas ultra

bajas, a través del nitrógeno líquido (NL, -196°C), inhibe la división celular y la mayoría de los procesos metabólicos y físicos (Ramírez y Salcedo, 2013). Además, es un método eficiente en términos de costos (Dulloo *et al.*, 2009).

En ensayos preliminares, se comprobó que la semilla de *S. pimpinellifolium* sobrevive a la exposición al NL. Sin embargo, en el contexto de los bancos de germoplasma *ex situ*, los efectos de la crioconservación deben estudiarse durante todo el crecimiento y desarrollo de la planta, antes de convertir esta técnica en un método de rutina (Pritchard *et al.*, 2009; Benson *et al.*, 2011). Hasta donde se conoce, no se ha realizado trabajo semejante con la diversidad del tomate silvestre en el cantón Bolívar (provincia de Manabí, Ecuador), al considerar la vulnerabilidad de esos recursos genéticos y la necesidad de protegerlos.

DESARROLLO

En los primeros seis meses, las semillas que se guardaron en frío a 4°C alcanzaron un porcentaje de germinación que no difirió estadísticamente con las que estaban almacenadas en NL (Figura 1). Sin embargo, a los 12 meses para las semillas del tratamiento testigo (semillas almacenadas a 4°C), disminuyó el porcentaje de germinación con diferencias estadísticas respecto a las semillas crioconservadas hasta el final del tiempo de evaluación.

A pesar de que se determinó una disminución en el porcentaje de germinación de las semillas crioconservadas después de 6 meses de almacenamiento, éstas conservaron un porcentaje de germinación cercano al 75% hasta el final del tiempo de evaluación (24 meses). La viabilidad de las muestras debe controlarse periódicamente (Iriondo, 2001) y establecerse en dependencia de su uso. Si el porcentaje de germinación es inferior al 85% del valor inicial en muestras almacenadas en colecciones a largo plazo y al 65% del valor inicial en colecciones activas, se recomienda su regeneración ya sea mediante nuevas recolecciones o por multiplicación a partir de las semillas viables, todo esto, independientemente de las condiciones de almacenamiento utilizadas. Sin embargo, según Van Treuren, (2013) los niveles de germinación de semillas para las especies silvestres emparentadas a los cultivos es menos

estricto que sus correspondientes cultivos, y se consideran buenos resultados de germinación valores mayores al 57% si se almacenan a largo-plazo.

Determinación del efecto de la crioconservación a largo plazo en la germinación de semillas de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium* L.).

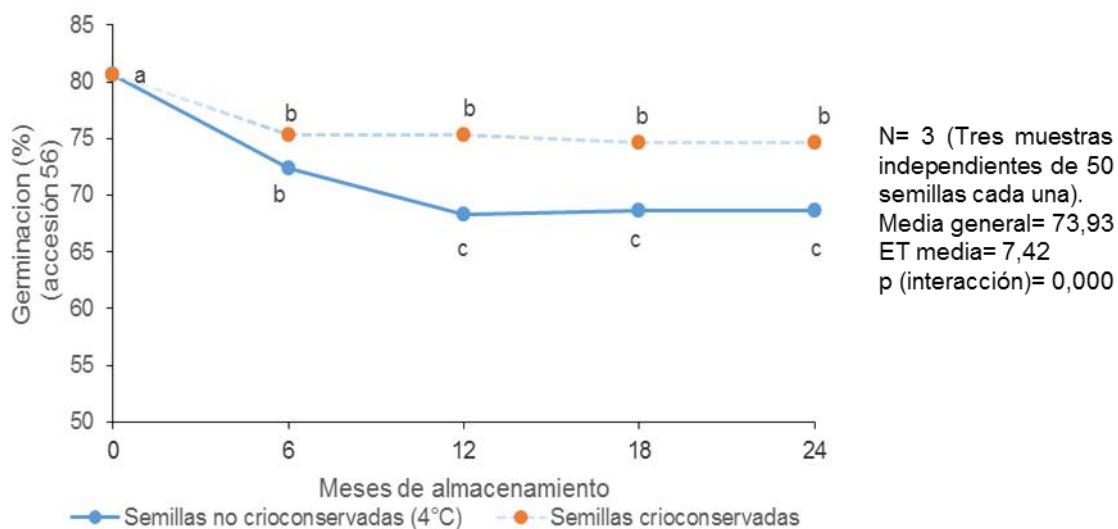


Figura 1. Germinación a los 7 días posteriores a la inmersión en nitrógeno líquido por 0, 6, 12, 18 y 24 meses. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA bifactorial, Tukey, $p \leq 0,05$). Para el análisis estadístico, los porcentajes se transformaron según $y' = 2 \cdot \arccos(y/100)^{0.5}$.

La limitación de los cambios químicos que son originados por el metabolismo o los procesos de envejecimiento, es un principio básico para la conservación de semillas. No obstante, se conoce que condiciones de baja temperatura y bajo contenido en humedad prolongan la longevidad de las semillas (Iriondo, 2001). Las reglas de Harrington, establecen que existe una relación exponencial entre la longevidad de las semillas, la temperatura y el contenido de humedad de almacenamiento, de manera que la longevidad de una semilla se duplica por cada reducción de 5°C en la temperatura y por cada reducción de un 1% en el contenido de humedad.

De acuerdo con este criterio, las semillas conservadas a muy bajas temperaturas y con muy bajos contenidos de humedad deberían mantenerse viables durante milenios. Sin embargo, Vertucci y Roos (1990) y Ellis *et al* (1990), establecieron que los efectos beneficiosos de la desecación de la

semilla sobre la longevidad de ésta, tiene límites y que depende de la composición química de la misma.

Se ha comprobado también que, contrario a lo establecido por las reglas de Harrington, los efectos de la temperatura y el contenido de humedad no son independientes (Vertucci y Roos, 1990). El uso apropiado de estos dos factores proporciona una vía aceptable para la conservación a largo plazo de muestras de semillas en bancos de germoplasma (Iriondo, 2001).

Las semillas ortodoxas, es decir semillas capaces de permanecer viables largo tiempo bajo determinadas condiciones, sobreviven a un estado de sequía inicial, pero pueden también perder la viabilidad durante el almacenamiento (Mira *et al.*, 2010). El deterioro de las semillas puede seguir un patrón sigmoideal, en el cual la viabilidad permanece por un período constante, seguido de una abrupta disminución y finalizan en un período lento durante el cual unas pocas semillas se mantienen viables (Walters, 1998; Walters *et al.*, 2005).

Es muy importante para la regeneración de las accesiones en los bancos de germoplasmas predecir la duración de la fase inicial (Walters, 1998; Walters *et al.*, 2004). Sin embargo, los mecanismos exactos que conllevan a la pérdida de la viabilidad de las semillas no están bien definidos y la susceptibilidad de la semilla a envejecer varía dentro de las familias y las especies (Walters *et al.*, 2005; Niedzielski *et al.*, 2009; Nagel y Borner, 2010).

El deterioro de la semilla durante la fase inicial depende de la humedad y la temperatura durante el almacenamiento y otros aspectos más como la calidad, de los antecedentes genéticos y, muy importante, las condiciones ambientales en que se desarrollaron las mismas (Walters *et al.*, 2004). Esta es una fase asintomática difícil de medir (Mira *et al.*, 2010).

En este sentido, se ha planteado un mecanismo de dos etapas que involucra la oxidación durante el envejecimiento de las semillas ortodoxas según reconocen Smith y Berjak (1995). Es decir, aún para este tipo de semillas con bajo contenido de humedad durante el almacenamiento se ha comprobado que ocurren las reacciones de auto-oxidación que provocan la producción de radicales libres (McDonald, 1999; Bailly, 2004). En estas condiciones la

actividad de las enzimas de desintoxicación son casi nulas y, por lo tanto es poco probable la eliminación de las sustancias reactivas del oxígeno, las que tienen un efecto negativo en los componentes celulares (lípidos, ácidos nucleicos y proteínas estructurales y enzimáticas) o se encuentran atrapadas en las estructuras intracelulares (Smirnof, 1993).

Por otra parte, se conoce que las semillas ortodoxas presentan características apropiadas para la formación del estado vítreo (Walters *et al.*, 2004). Sin embargo, el contenido de agua mediante el cual el citoplasma se transforma en ese estado durante la desecación almacenamiento depende de la temperatura (Buitink y Leprince, 2008). Es decir, mientras más baja es la temperatura de desecación, es mayor el contenido de agua al que el citoplasma pasa a estado vítreo. Así, aunque la formación vítrea en las semillas de manera drástica disminuye la movilidad molecular, las moléculas en estas condiciones no están muy restringidas en movimiento y una pequeña difusión en el tiempo es posible. Esto en parte puede explicar por qué las semillas envejecen a más altas temperaturas debido a los procesos de deterioro de las semillas como la peroxidación lipídica pero de manera lenta.

Existen evidencias donde muestran que la degradación es mucho más lenta y la durabilidad aumenta cuando las células son almacenadas a temperaturas criogénicas y se comparan con el refrigerador. Por ejemplo, diferentes líneas de patógenos, cultivos celulares, espermatozoides, y embriones se mantienen viables en criogenia durante 10-40 años (Walters, 2004; Buitink y Leprince, 2008; Volk, 2010). Similares resultados se informaron por Day (1998), donde se menciona que la viabilidad de algas crioconservadas se mantiene por más de 20 años sin afectaciones.

El estudio de los mecanismos de envejecimiento de las semillas y la determinación de indicadores de calidad pueden salvar enormes cantidades de tiempo, esfuerzo y materiales en los bancos de germoplasma (Stanwood, 1985) y preservar de esta forma la biodiversidad genética. También en los bancos de semillas que emplean el método de crioconservación se deben realizar pruebas de viabilidad y de vigor de forma periódica.

Walters *et al.* (2004), realizaron importantes estudios de longevidad en germoplasma criopreservado. Estos autores informaron sobre cambios medibles en la germinación de semillas secas en NL por más de 10 años. Se demostró que existe variabilidad en el deterioro de las semillas entre las especies y dentro de una misma especie y que la longevidad de la semilla puede superar los 500 años. Por otro lado, también concluyeron que el almacenamiento a temperaturas criogénicas, no es suficiente para disminuir el deterioro, principalmente si el estado inicial de envejecimiento de la semilla ocurre a temperaturas mayores antes de ser colocadas en NL.

Sin embargo, lo anterior se contradice con los estudios realizados por Ellis *et al.* (1990) y Pritchard y Dickie (2003), donde consideran que los efectos de las reacciones del envejecimiento se limitan con las ultra-bajas temperaturas según modelos de predicción de la viabilidad en el tiempo. Además, existen evidencias que demuestran que la posible degradación durante el almacenamiento criogénico se debe atribuir también a las fluctuaciones en la temperatura que provoca la devitrificación del estado vítreo con el crecimiento de cristales de hielo dañinos, más allá que las reacciones de envejecimiento que tienen lugar a esta temperatura de almacenamiento (Day *et al.*, 1998; Buitink y Leprince, 2008; Volk, 2010).

De esta forma, se estableció que a pesar de que el proceso de deterioro de las semillas debe ocurrir irremediablemente, la criopreservación hace más lento el mismo y se obtienen niveles de germinación altos durante los 24 meses de la investigación.

BIBLIOGRAFIA

- Álvarez-Hernández JC. 2009. Injerto de Jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en germoplasma silvestre como fuente de resistencia a plagas y enfermedades. Tesis de Maestría, Instituto Politecnico Nacional, Mich., Mex.
- Bai Y, Lindhout P (2007) Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future. *An Bot* 100:1085-1094
- Bailly C (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* 14:93–107
- Bauchet G, Causse M (2012) Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. In: Caliskan PM (ed) *Genetic Diversity in Plants*, Croatia, pp 133-162

- Benson E (2008) Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critic Rev Plant Sci* 27:141–219
- Benson E, Harding K, Debouck D, Dumet D, Escobar R, Mafla G, Panis B, Panta A, Tay D, Van den Houwe I, Roux N (2011) Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part III. Multi-crop guidelines for developing *in vitro* conservation best practices for clonal crops System-wide Genetic Resources Programme, Rome, Italy, pp 145
- Berjak P, Bartels P, Benson EE, Harding K, Mycock DJ, Pammenter NW, Wesley-Smith J (2011) Cryoconservation of South African plant genetic diversity. *In Vitro Cell Devel Biol-Plant* 47:65-81
- Bioversity (2006) *Parientes silvestres de cultivos*. Geneflow, Roma.
- Buitink J, Leprince O (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C R Biol* 331:788-795
- Cooke S, Sack L, Franklin C, Farrell A, Beardall J, Wikelski M, Chown S (2013) What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conser Physiol* 1:1-23
- COPIA. 2012. Conferencia Plurinacional e Intercultural de Soberanía Alimentaria. Propuesta de Ley Orgánica de Agrobiodiversidad, Semillas y Fomento Agroecológico, *In Comisión Técnica de Agrobiodiversidad S, Agroecología, Soberanía Alimentaria, (ed.)*, Quito.
- Cuesta F, Peralvo M, Ganzenmüller A, Sáenz M, Novoa J, Riofrío G, Beltrán K. 2006. Identificación de Vacíos y Prioridades de Conservación en el Ecuador Continental, pp. <http://protectedareas.info/upload/document/ecuador_terrestrial_gap_analysis.pdf>, Ecociencia ed. Ministerio del Ambiente del Ecuador, Quito.
- Day JG, Fleck RA, Benson EE, . (1998) Cryopreservation of multicellular algae: problems and perspectives. *CryoLetters* 19:205-206
- Duan H, Zhu Y, Qi D, Li W, Hua X, Liu Y, Deng X (2012) Comparative study on the expression of genes involved in carotenoid and ABA biosynthetic pathway in response to salt stress in tomato. *J Integr Agric* 11:1093-1102
- Dulloo ME, Ebert AW, Dussert S, Gotor E, Astorg C, Vásquez N, Rakotomalala JJ, Rabemiafar A, Eira M, Bellachew B, Omondi C, Engelmann F, Anthony F, Watts J, Qamar Z, Snook L (2009) Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. *Crop Sci* 49:2123-2138
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH, Tao KL (1990) Low moisture limits to relations between seed longevity and moisture. *Ann Bot* 65:493-504
- Engels JM, Maggioni L, Maxted N, Dulloo ME (2008) Complementing *in situ* conservation with *ex situ* measures. In: J. Iriando N, Maxted. M. Dulloo, (ed) *Conserving Plant Genetic Diversity in Protected Areas*. CAB International, Wallingford, Reino Unido, pp 169-181
- FAOSTAT (2012) Statistical database of the food and agriculture of the United Nations. <http://faostatfaorg/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#anchor>
- Florido M, Arencibia A, Plana D, Alvarez M, Lopez J, Lara R (2007) Análisis de la diversidad genética en tomate (*Solanum* L. sección *Lycopersicom* subsección *Lycopersicom*) utilizando AFLP. *Cult Trop* 28:83-87

- Grijalva J, Checa X, Ramos R, Barrera P, R L (2012) Situación de los Recursos Genéticos Forestales - Informe País Ecuador. In: FAO (ed) Primer Informe sobre el Estado de los Recursos Genéticos Forestales en el Mundo. FAO, Roma
- Hunter D, Heywood V (2012) Parientes silvestres de los cultivos: manual para la conservación *in situ*. Bioersity International, Roma, Italia.
- Iriondo JM (2001) Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. ISTA, Bassersdorf.
- ISTA (2005) International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Bassersdorf.
- Jaramillo J, Rodríguez V, Guzmán M, Zapata M, Rengifo T (2007) Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la Producción de Tomate Bajo Condiciones Protegidas. Consultado 2013. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1374s/a1374s02.pdf>.
- Juvik J, Berlinger M, Ben-David T, Rudich J (1982) Resistance among accessions of the genera *Lycopersicon* and *Solanum* to four of the main insect pest of tomato in Israel. *Phytoparasitica* 10:145-156
- Khoury C, Laliberte B, Guarino L (2010) Trends in *ex situ* conservation of plant genetic resources: a review of global crop and regional conservation strategies. *Gen Res Crop Evol* 57:625-639
- MAE (2010) Cuarto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica. Quito.
- Mahuad SL, Pratta GR, Rodriguez GR, Zorzoli R, Picardi LA (2013) Preservation of *Solanum pimpinellifolium* genomic fragments in recombinant genotypes improved the fruit quality of tomato. *J Genet* 92:195-203
- Maxted N, Kell SP (2009) Establishment of a Global Network for the *In Situ* Conservation of Crop Wild Relatives: Status and Needs. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura de la FAO, Roma, Italia.
- McDonald M (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Scien Technol* 27:177-237
- Menda N, Strickler S, Mueller L (2013) Advances in tomato research in the post-genome era. *Plant Biotech* 30:243-256
- Merk H, Yarnes S, Van Deynze A, Tong N, Menda N, Mueller L, Mutschler M, Loewen S, Myers J, Francis D (2012) Trait diversity and potential for selection indices based on variation among regionally adapted processing tomato germplasm. *J Am Soc Hortic Sci* 137:427-437
- Mieslerova B, Lebeda A, Chetelat R (2000) Variation in response of wild *Lycopersicon* and *Solanum* sp. against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). *J Phytopathol* 148:303-311
- Mira S, González-Benito ME, Hill LM, Walters C (2010) Characterization of volatile production during storage of lettuce (*Lactuca sativa*) seed. *J Exp Bot* 61:3915-3924
- Nagel M, Borner A (2010) The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Sci Res* 20:1-12
- Niedzielski M, Walters C, Luczak W, Hill LM, Wheeler LJ, Puchalski J (2009) Assessment of variation in seed longevity within rye, wheat and the intergeneric hybrid triticale. *Seed Sci Res* 19:213-224

- Panis B, Lombardi M (2005) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). The Role of Biotechnology for the Characterisation and Conservation of Crop, Forestry, Animal and Fishery Genetic Resources. FAO, Turín.
- Peralta IE, Spooner DM (2000) Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana* 28:45-54
- Peralta IE, Knapp S, Spooner DM (2006) Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Rep Tom Genet Coop* 56:6-12
- Pratta G, Rodriguez G, Zorzoli R, Valle E, Picardi L (2011) Phenotypic and molecular characterization of selected tomato recombinant inbred lines derived from the cross *Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*. *J Genet* 90:229-237
- Pritchard H, Dickie J (2003) Predicting seed longevity: use and abuse of seed viability equations. In: Smith R (ed) *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp 653-722
- Pritchard H, Ashmore S, Berjak P, Engelmann F, González-Benito M, Li D, Nadarajan J, Panis B, Pence V, Walters C (2009) Storage stability and the biophysics of preservation. *Proc Plant Conservation for the Next Decade: A celebration of Kew's 250th anniversary, 12-16 Oct 2009*. Royal Botanic Garden Kew, London
- Ramírez M, Salcedo J (2013) Los recursos fitogenéticos y la importancia estratégica de su conservación en las Américas. In: Gonzalez-Arnao MT, F E (eds) *Crioconservacion de plantas en America Latina y el Caribe*. IICA, San Jose, C.R., pp 17
- Reed BM, Dumet DJ, Denoma JM, Benson E (2001) Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L. *Biodiver Conserv* 10:939-949
- Reed BM (2008) Cryopreservation-practical considerations. In: Reed BM (ed) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer, New York, pp 3-13
- Rick CM (1979) Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. In: Hawkcs JG, Lester RN, Skelding AD (eds) *The Biology and Taxonomy of Solanaceae*. Linnean Soc. Symp., Academic Press, London, pp 667-677
- Rick CM, Chetelat RT (1995) Utilization of related wild species for tomato improvement. *Act Hort* 412:21-38
- Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125:27-58
- Smith M, Berjak P (1995) Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored dessiccated-tolerant and desiccation-sensible seeds. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Spooner DM, Peralta I, Knapp S (2005) Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes *Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.). *Taxon* 54:43-61
- Stanwood P, Bass L (1981) Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Sci Technol* 9:423
- Stanwood P (1985) Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: Kartha K (ed) *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 199-226
- Tapia C, Zambrano E, Montero A (2008) Estado de los recursos fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación. INIAP, Quito.

- Van der Knaap E, Chakrabarti M, Chu Y, Clevenger J, Illa-Berenguer E, Huang Z, Keyhaninejad N, Mu Q, Sun L, Wang J, Wu S (2014) What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Front Plant Sci* 5(227):1-13
- Van Treuren R, Van Hintum T, De Groot E (2013) Preservation of seed viability during 25 years of storage under standard genebank conditions. *Genet Resour Crop Evol* 60:1407-1421
- Vertucci CW, Roos EE (1990) Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiol* 94:1019-1023
- Volk G (2010) Application of Functional Genomics and Proteomics to Plant Cryopreservation. *Current Genomics* 11:24-29
- Walters C (1998) Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci Res* 8:223-244
- Walters C (2004) Temperature dependency of molecular mobility in preserved seeds. *Biophys J* 86:1253–1258
- Walters C, Wheeler L, Stanwood P (2004) Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology* 48:229-244
- Walters C, Wheeler LJ, Grotenhuis JM (2005) Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Sci Res* 15:1-20
- Zuriaga E, Blanca JM, Cordero L, Sifres A, Blas-Cerdán W, Morales R, Nuez F (2009) Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*. *Gen Res Crop Evol* 56:39-51