

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Estudio de la respuesta al cultivo de semillas y embriones de maíz (*Zea mays*) antiguo de la época Chimú (1420 años d.C.)

Víctor F. Vásquez¹, Teresa E. Rosales², Gabriel Dorado³

¹ Autor para correspondencia, Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas ARQUEOBIOS, Apartado Postal 595, Trujillo (Perú); ² Laboratorio de Arqueobiología, Avda. Universitaria s/n, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo (Perú); ³ Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales C6-1-E17, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba (Spain)

Resumen

Se ha estudiado la respuesta al cultivo de semillas y embriones de maíz de la época Chimú de hace unos 700 años. Se ha observado crecimiento de tejido blanquecino en embriones de una mazorca recuperada de excavaciones en el sitio "El Brujo" (valle de Chicama, Perú). Se detectaron otros indicios de vida celular, como movimientos citoplasmáticos similares a ciclosis. Los cultivos de estos embriones permitieron recuperar ADN de buena calidad, el cual fue amplificado mediante RAPD. Ello ha permitido estudiar la biodiversidad de este material antiguo y compararla con entradas de germoplasma de maíz del CIMMYT, almacenadas durante más de 50 años. Sin embargo, no fue posible inducir la germinación de las semillas antiguas ni la regeneración de plantas a partir de los embriones en las condiciones de cultivo empleadas en este trabajo. Sin embargo, dado que las pruebas realizadas indican que las semillas antiguas contienen tejido vivo, podría ser posible obtener plantas de maíz a partir de las mismas, si se usaran medios de cultivo apropiados, desconocidos hasta el momento.

Palabras clave: arqueología, viabilidad, diacetato de fluoresceína, recuperación, rescate recursos fitogenéticos, DNA.

Abstract

The culture response of maize seeds and embryos of the Chimu epoch of about 700 years has been studied. White tissue growth has been observed on embryos from a cob recovered from excavations at the "El Brujo" site (Chicama valley, Peru). Other cellular life evidences were detected, like cytoplasmic movements similar to cyclosis. The cultures of these embryos allowed to recover good-quality DNA, which was amplified by RAPD. This has allowed to study the biodiversity of such ancient material and to compare it to maize germplasm accessions at the CIMMYT that had been stored for more than 50 years. Yet, it has not been possible to induce the ancient seed germination nor the plant regeneration from the embryos with the culture conditions tested in this work. Yet, since the tests carried out indicate that the ancient seeds contain live tissue, it could be possible to obtain maize plants from them, if appropriate, albeit so far unknown, culture media were used.

Keywords: archaeology, viability, fluorescein diacetate, recovery, rescue, phytogetic resources.

Introducción

Se han llevado a cabo diversos estudios sobre la germinación de semillas antiguas (Turner, 1933; Walters *et al*, 2005; Boerner, 2006; Rajjou y Debeaujon, 2008; Sallon *et al*, 2008; Li y Pritchard, 2009; Probert *et al*, 2009; Merritt y Dixon, 2011).

En general, se recomiendan ambientes secos y fríos (–18 a –20 °C) para preservar la capacidad germinativa de las semillas (Benson *et al*, 1998; Rao *et al*, 2006). La capacidad germinativa de semillas antiguas ha sido analizada usando distintas estrategias experimentales, dada la relevancia teórica y practica de este proceso. Estos experimentos han demostrado que la viabilidad germinativa de las semillas antiguas de no está necesariamente correlacionada con un perfil de historial tafonómico concreto (Odum, 1965). Dicha disparidad puede deberse al hecho de que las semillas de diferentes especies tienen distintos requerimientos de conservación.

Existen abundantes referencias bibliográficas de viabilidad germinativa de semillas antiguas conservadas hasta 2.000 años; por ejemplo:

- Tojo enano doble (*Cytisus biflorus*, ahora llamado *Cytisus ratisbonensis*), arbusto de mariposas (*Cassia bicapsularis*) y hormiguerilla (*Cassia multijuga*, ahora llamada *Senna multijuga*), con 84, 87 y 150 años de antigüedad, respectivamente (Labouriau, 1983).
- Hinojillo de conejo (*Bupleurum tenuissimum*), de 144 años (Godefroid *et al*, 2011).
- Árbol de la seda o "acacia" (sic) de Constantinopla (*Albizia julibrissin*), conservadas en el Museo Británico durante 200 años (Hartman y Kester, 1981).
- Acacias de varias especies (*Acacia* spp.) de 151 años (Leino y Edqvist, 2010).
- Acacia (*Acacia* sp.), Liparia (*Liparia* sp.) y acerico (*Leucospermum* sp.) de más de 200 años (Daws *et al*, 2007).
- Loto sagrado o loto de la India (*Nelumbo nucifera*), tras estar enterradas 1.288 años en una turbera de Manchuria (China) (Hartman y Kester, 1981; Shenmiller *et al*, 1995).
- Esparcilla (*Spergula arvensis*) tras 1.700 años (Odum, 1965).
- Maíz (*Zea mays*) del ex-museo de paleopatología del Hospital Dos de Mayo en Lima (Perú) de unos 1.800 años, procedentes de ofrendas de un fardo funerario Paracas, obteniéndose cuatro generaciones de plantas (sin publicar).
- Dátil (*Phoenix dactylifera*) de hace 2.000 años (Sallon *et al*, 2008).
- Alubia (*Phaseolus vulgaris*), pallar o alubia del Perú (*Phaseolus lunatus*) y pallar del gentil (*Canavalia ensiformis*), que provienen de cementerios

prehispánicos de Chancay, algunos sitios arqueológicos de la costa norte del Perú, e incluso de semillas almacenadas en museos de dicha zona (sin publicar).

No obstante, hay que tener cuidado con este tipo de estudios, ya que se prestan a generar resultados erróneos (falsos positivos), como ya denunció Turner en 1933. Un ejemplo más reciente es el de semillas de *Lupinus arcticus*, con una supuesta edad de 10.000 años (Porsild *et al*, 1967). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que correspondían a semillas modernas (Zazula *et al*, 2009).

El presente trabajo representa un estudio controlado de la viabilidad de germinación de semillas arqueológicas de maíz de la costa norte del Perú. En esta Investigación han participado especialistas en arqueobiología, biotecnología, biología molecular y química.

Materiales y Métodos

Excavación arqueológica

Con la finalidad de obtener muestras de semillas de *Zea mays* de contextos de la época Chimú, se llevaron a cabo excavaciones en contextos domésticos en el complejo arqueológico de “El Brujo”, realizando excavaciones controladas y dirigidas a recuperar las semillas en las condiciones más apropiadas para el estudio. Una vez recuperadas las semillas, fueron embaladas en bolsas de aluminio forradas con papel y selladas de inmediato para su traslado al laboratorio. Se tomaron diversos datos del contexto, como la temperatura y humedad del suelo mediante un termo-higrómetro digital con sonda móvil “EC Tester - Soil Tester” HI 98331 de Hanna Instruments (Woonsocket, RI, EUA).

Análisis físico-químico de suelos arqueológicos

Se realizaron muestreos de los suelos que las contenían. Se realizaron un total de 64 análisis, incluyendo valores de pH, conductividad eléctrica, y concentración de los iones de potasio, calcio, magnesio y fosfato.

Cultivos de embriones

Los cultivos de embriones del maíz Chimú se realizaron en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) con sede en México. Las semillas recuperadas en las excavaciones fueron puestas en cuarentena y refrigeración, antes de su procesamiento para el cultivo de los embriones. Las semillas que aún estaban en mazorcas se desgranaron. Las semillas fueron esterilizadas y el embrión fue escindido de la semilla. Se usaron medios de cultivo especial para gramíneas, realizándose pruebas de viabilidad de semillas completas y de embriones aislados. Todo el proceso se realizó en condiciones de asepsia, control de temperatura y humedad. Se tomaron fotografías para registrar los progresos en el crecimiento celular. Las zonas de crecimiento

fueron sometidas a pruebas de viabilidad con carmín, fucsina ácida y DiAcetato de Fluoresceína (DAF). Paralelamente se realizaron pruebas con embriones de semillas de maíz almacenadas en el banco de germoplasma del CIMMYT, con edades que fluctuaban entre 10 a 30 años. De este modo se observó su crecimiento celular y se comparó con el cultivo de los embriones arqueológicos, determinando aquellas que crecían normalmente y podían ser sembradas en macetas para su evaluación en campo.

Análisis de ADN antiguo del producto del cultivo de embriones

Estos estudios también se realizaron en CIMMYT, empleando varios métodos, tanto para el maíz arqueológico, como para el moderno. En el caso del ADN antiguo, éste se realizó a partir de los tejidos regenerados en el cultivo de embriones, utilizando muestras muy pequeñas. Se llevó a cabo la amplificación de marcadores moleculares de tipo ADN polimórfico amplificado al azar (del inglés, "Random Amplified Polymorphic DNA"; RAPD). Se usaron cuatro pares de cebadores. El ADN amplificado se segregó mediante electroforesis en gel de agarosa MetaPhor al 3%. Para propósitos comparativos, se realizaron análisis con ADN de maíz moderno, y así tratar de establecer algunos cambios ocurridos después de 500 a 700 años.

Resultados y Discusión

Cultivo de Embriones

Los cultivos de embriones empezaron a realizarse en agosto de 1994, en los medios especiales enriquecidos con fitohormonas y nutrientes esenciales. En total se cultivaron 630 embriones, observándose resultados prometedores de crecimiento celular en cinco embriones que provenían de la muestra 12 del complejo arqueológico de "El Brujo" (Figura 1).



Figura 1. Mazorca de maíz Chimu (muestra 12). Se aprecian las hileras rectas de granos de color púrpura, cuyos embriones experimentaron crecimiento celular.

Esta mazorca de maíz, fue fechada en los laboratorios del Museo Nacional de Dinamarca, arrojando resultados de 1300 a 1420 años después de

Cristo; es decir, Chimú tardío (590 ± 70 ^{14}C ref. 1950, con δ^{13} de $-12,9\%$ en relación al estándar de belemnites del Pee Dee (del inglés, "Pee Dee Belemnite"; PDB).

Ninguna de las semillas que fueron puestas en medios de cultivo presentaron signos de germinación, pero varios embriones, especialmente aquellos de la muestra 12, desarrollaron abultamientos pequeños, blanquecinos y amarillentos, los cuales fueron sugerentes de un desarrollo de callos o tejidos desorganizados (Figuras 2 y 3).

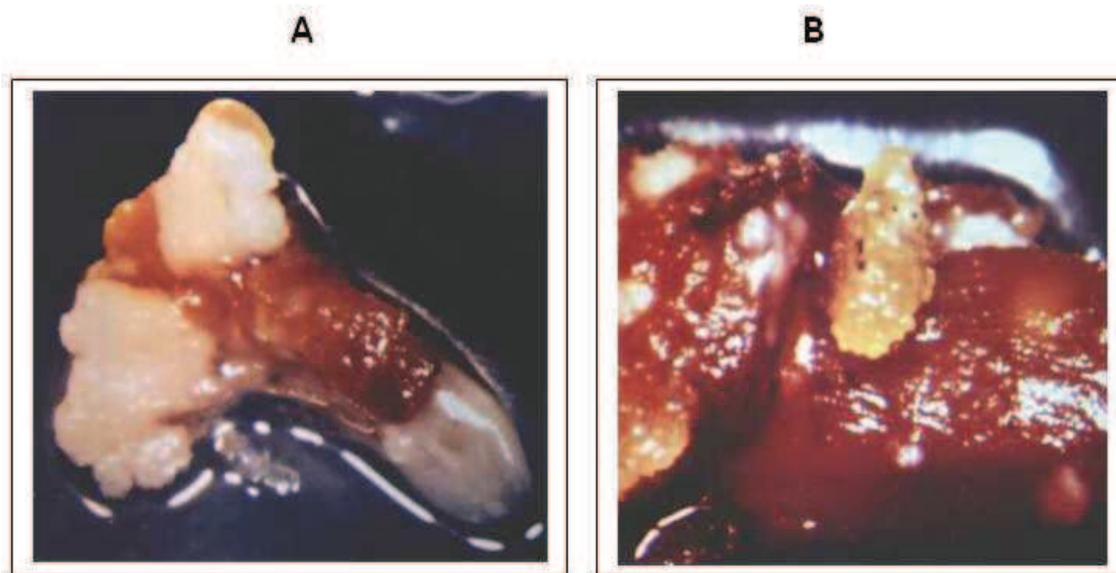


Figura 2. Cultivo de embriones de maíz Chimú (muestra 12). A. Embrión de la muestra 12, con zonas abultadas de color blanquecino correspondiente al crecimiento de tejido para formar callos. B. Abultamiento amarillento de tejido nuevo crecido a partir del cultivo de embrión (células meristemáticas).

El cultivo de embriones produjo crecimiento de callos; es decir, conjuntos de células meristemáticas, y por tanto no diferenciadas (Figura 2B), que fueron aislados y cultivados en medio especial de crecimiento de callos, aunque no se logró la generación de plántulas.

La viabilidad de los tejidos regenerados se analizó mediante hidrólisis de diacetato de fluoresceína, siendo observados bajo luz ultravioleta (UV; revisado de Priestley, 1986:129). Los resultados fueron intrigantes, porque la fluorescencia obtenida era amarillo-verde de intensidad fuerte en muchas células (Figura 3), lo cual suele considerarse un indicio de funcionamiento enzimático celular.

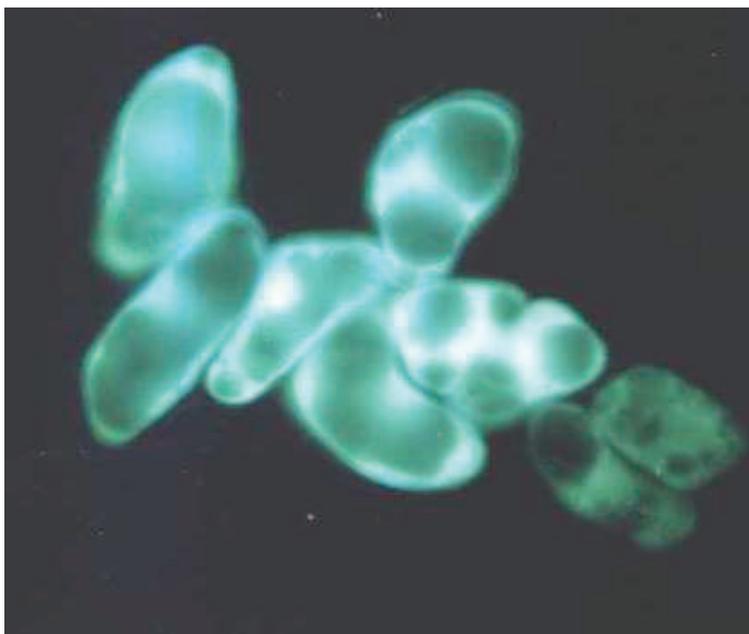


Figura 3. Test de viabilidad. Células de tejido regenerado a partir de los cultivos de embriones del maíz Chimú (muestra 12), teñidas con DAF e irradiadas con luz UV. Se observa el color verde-amarillo, típico de células vivas.

Adicionalmente, se observaron flujos citoplásmicos en las células, parecidos a ciclosis, si bien no tan rápido o extenso como en células modernas, por lo que podría tratarse de un movimiento browniano (Figura 4).



Figura 4. Posible movimiento citoplásmico. Células de tejido regenerado a partir de embriones de maíz Chimú (muestra 12), con un posible movimiento citoplasmático parecido a la ciclosis.

Estos resultados indican que las células provenientes de los tejidos formados a partir del cultivo de embriones del maíz Chimú no estaban muertas, presentando un lento incremento celular en el medio de cultivo. Dichos cultivos se mantuvieron durante casi nueve meses, conservando el mismo aspecto blanquecino-amarillento, pero sin aumentar en tamaño, por lo que el estudio experimental culminó en dicho momento.

La revisión de diversos casos donde hubo excepcionales eventos de germinación de semillas antiguas sugiere un posible cuadro fisiológico conocido como *criptobiosis*. Éste se presenta cuando las semillas se liberan de la planta con embriones muy pequeños e inmaduros. Este fenómeno se caracteriza por una tasa muy pequeña de consumo de oxígeno y una disminución de la velocidad de liberación de CO₂. Esta ralentización metabólica está ligada a una disminución de actividades de las enzimas de la glucólisis y ciclo de Krebs (Labouriau, 1983). Así, una de las probables explicaciones del lento crecimiento de los callos formados y su escasa actividad catabólica sería la también escasa actividad anabólica, parándose entonces muchas reacciones metabólicas por la falta de los respectivos catalizadores específicos. De este modo se ralentizaría y bloquearía el proceso global de crecimiento celular.

Los resultados de viabilidad obtenidos con las células regeneradas a partir del cultivo de los embriones del maíz Chimú son interesantes porque un embrión muerto cambia de color, luego se vuelve suave, de color café, y en el lapso de dos a 10 días son invadidos por hongos (Hartman y Kester, 1981), situación que no ocurrió con los embriones de maíz Chimú, que se mantuvieron intactos hasta durante nueve meses, pero en condiciones controladas de asepsia.

Análisis de suelos arqueológicos

En la actualidad, los suelos que albergaron estas muestras tenían valores de pH superiores a 8, a excepción de la muestra de suelo 3 (pH 7,8) y la muestra de suelo 6 (pH 7,7) (Tabla 1). Estos altos valores indican la presencia de carbonatos, producto de la lixiviación de las conchas de moluscos, con las que se encontraban asociadas algunas muestras de semillas de *Zea mays* de la época Chimú. La alcalinidad del suelo puede deberse a distintos factores. La muestra de maíz 12 (muestras de suelo 7 y 8 en la Tabla 1), presentó altos valores de pH (8,2 y 8,1, respectivamente), lo que indica que el pH actual no está significativamente correlacionado con la viabilidad, siendo por tanto un parámetro no significativo para este tipo de estudios.

Por su parte, la Conductividad Eléctrica (CE) está relacionada con el gradiente de potencial de reducción-oxidación (redox), que puede tener importantes consecuencias físicas, químicas, bioquímicas y biológicas. Los bajos valores actuales en las muestras de suelo 3, 4, 7 y 8 (asociadas a la muestra de semilla 12), sugieren una relativa estabilidad de estos suelos en relación a posibles cambios físicos y químicos. Ello implica que parámetros como la temperatura y la humedad son uniformes en la actualidad, lo que debe favorecer su conservación.

Tabla 1. Resultados de los análisis de suelos arqueológicos de la época Chimú.

Muestra	pH	CE (mmΩ/cm)	Humus (%)	P (ppm)	Ca ⁺² (%)	Mg ⁺² (%)	K ⁺ (%)	Na ⁺ (%)
1	8,1	1,324	2,52	292	0,27	0,22	0,53	0,750
2	8,1	1,106	2,41	385	0,27	0,37	0,718	0,845
3*	7,8	0,317	2,16	163	0,66	0,12	0,215	0,550
4*	8,0	0,328	2,04	140	0,45	0,13	0,140	0,465
5	8,3	1,115	10,35	460	0,98	0,24	0,990	3,6
6	7,7	1,090	10,05	466	0,70	0,34	0,975	4,4
7*	8,2	0,415	2,04	140	1,37	0,23	0,370	0,855
8*	8,1	0,482	1,88	152	1,79	0,40	0,33	0,840

* Muestras de suelos asociadas a la mazorca Chimú denominada muestra 12 (ver texto anterior). CE: Conductividad Eléctrica. Ω: ohmio. ppm: partes por millón.

Por otro lado, se observaron altos porcentajes de calcio (Ca²⁺) en las muestras de suelo 7 y 8, que albergaron la muestra de maíz 12 previamente descrita. Esto sugiere que la matriz del suelo que albergó dicha mazorca habría sido sometida a temperaturas bajas estables y constantes. Ello permitiría que dicho catión se acumulara en este tipo de suelo, con un posible efecto favorable sobre la conservación de la semilla. De hecho, se han descrito también altos valores de calcio en los suelos de sitios daneses que albergaban semillas de diversas especies que mostraron resultados positivos de germinación (Odum, 1965: tabla II).

Los demás parámetros químicos (Tabla 1) no muestran correlación con los resultados del cultivo de embriones de maíz Chimú. Por lo tanto, la determinación del calcio (Ca⁺²) y la CE de los suelos que albergan las semillas antiguas podrían ser parámetros a considerar en futuras investigaciones de viabilidad de semillas de maíz arqueológico. Debe tenerse en cuenta que el maíz mantiene la viabilidad germinativa en condiciones de temperatura y humedad relativa óptimas durante al menos 100 años (CIMMYT, 1990).

Análisis de ADN antiguo

Se aisló ADN de los embriones y abultamientos que crecieron de ellos, a partir de 22 muestras arqueológicas y de 24 variedades modernas, incluyendo cuatro variedades de la costa norte del Perú, tres de la sierra (Apurímac y Cuzco) y una de Panamá.

El marcador molecular de tipo RAPD usa cebadores inespecíficos o aleatorios de 10 bases que pueden hibridar con muchas dianas en el genoma. Suelen producir múltiples bandas tras la electroforesis en geles de agarosa y pueden presentar el inconveniente de falta de reproducibilidad; sobre todo si se modifican las condiciones experimentales. Por todo ello pueden presentar problemas de interpretación de las bandas generadas, que a veces pueden ser o parecen iguales o equivalentes. En tal caso puede llevarse a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida, a fin de obtener una mayor resolución de las bandas generadas. Asimismo, presentan herencia co-dominante, lo que los hace menos ventajosos para estudios de genotipaje, trazabilidad, paternidad y mejora genética. No obstante, tienen la ventaja de no requerir un

conocimiento previo de la secuencia del ADN a amplificar y son relativamente baratos y rápidos. Por ello se han usado y todavía se usan para analizar los genomas de microorganismos, plantas y animales.

En el presente trabajo se emplearon marcadores moleculares de tipo RAPD para evaluar la calidad del ADN extraído de los abultamientos del cultivo de embriones del maíz Chimú, a fin de usar posteriormente otros marcadores, como las repeticiones de secuencia simple o microsatélites (del inglés, "Simple Sequence Repeats"; SSR) y el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (del inglés, "Restriction Fragment Length Polymorphism"; RFLP).

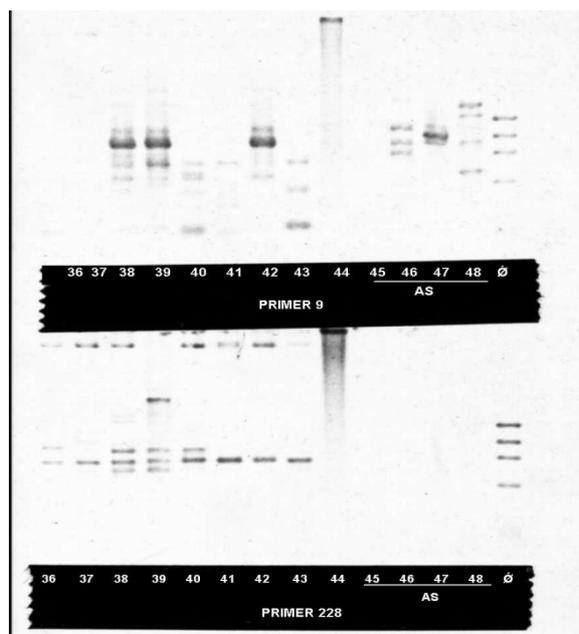


Figura 5. Amplificación de ADN moderno y antiguo mediante RAPD y separación electroforética. Se muestran las bandas generadas tras electroforesis en gel de agarosa MetaPhor. El cebador 228 no amplificó ninguna muestra arqueológica (AS), pero el cebador 9 amplificó ADN de tres muestras antiguas (46, 47 y 48).

Se muestran los resultados obtenidos con muestras modernas (carriles 36 a 42), y antiguas (carriles 45 a 48) tras amplificación mediante la técnica RAPD y segregación en gel de agarosa (Figura 5). El cebador 228 no amplificó ADN de las muestras antiguas. Sin embargo, el cebador 9 amplificó ADN de tres (46 a 48) de las cuatro muestras de embriones antiguos (del inglés, "Ancient Sample" AS). Dichas bandas son únicas y muy probablemente no son contaminantes. También se observó una amplificación inespecífica en la muestra 44, mostrando ADN degradado.

Estos resultados permitieron además correlacionar que el color y la textura de los embriones arqueológicos pueden guiar para seleccionar aquellos embriones blanquecinos y/o amarillentos, que pueden proveer ADN de mejor calidad, que pueda ser amplificado y separado electroforéticamente en bandas específicas en geles de agarosa.

Todo ello puede facilitar el aislamiento de ADN de embriones antiguos para futuras evaluaciones comparativas entre genomas antiguos y modernos, analizar las relaciones evolutivas y de domesticación mediante árboles filogenéticos o dendrogramas, e incluso llevar a cabo experimentos de transgénesis.

Conclusiones

La germinación de semillas antiguas y el cultivo de embriones de semillas antiguas pueden ser difíciles, e incluso imposible en algunos casos. La viabilidad germinativa depende de la especie considerada, el tiempo transcurrido y el historial tafonómico del lugar de donde se obtuvieron dichas semillas. El presente trabajo no ha logrado la germinación de semillas de maíz de la época Chimú, pero sí ha logrado un cierto crecimiento celular a partir de los embriones de dichas semillas. No obstante, dicho crecimiento no prosiguió, por lo que no ha sido posible regenerar plantas completas a partir de dichos embriones.

El presente estudio ha servido también para determinar una serie de parámetros físico-químicos del lugar (suelo) de donde se obtuvieron las semillas que puedan servir de guía a fin de elegir muestras con una mayor viabilidad germinativa potencial. En este sentido, conviene resaltar que este tipo de investigaciones deben abordarse desde una perspectiva multidisciplinaria, para poder articular todos los datos obtenidos y convertirlos en una información de valor práctico para el avance de la ciencia y también desde el punto de vista económico.

El cultivo de embriones de maíz de la época Chimú, no sólo ha permitido conocer aspectos interesantes de la viabilidad de las semillas y embriones de maíz antiguo, sino que ha permitido extraer ADN de suficiente calidad como para ser amplificado mediante marcadores moleculares de tipo RAPD. Este tipo de material amplificable permitirá el estudio de los genomas antiguos del maíz prehispánico, no sólo mediante marcadores moleculares, sino también mediante las nuevas técnicas de secuenciación de segunda y tercera generación (Walters *et al*, 2006; Dorado *et al*, 2008; Leino *et al*, 2009).

Finalmente, este estudio ha permitido que el Banco de Germoplasma de Maíz del CIMMYT haya podido regenerar numerosas entradas de maíz que llevaban almacenadas más de 50 años y que habían perdido su viabilidad para germinar por métodos convencionales, lo cual permitió rescatar un valioso germoplasma para el futuro de la agricultura de este cereal. Todos estos resultados ponen de manifiesto la relevancia de las técnicas de biología molecular en arqueología (Dorado *et al*, 2007) y sus implicaciones en genética de poblaciones y evolución (Leino y Hagenblad, 2010).

Agradecimientos. Esta investigación fue posible gracias a la beca concedida por la Agencia Danesa de Desarrollo Internacional (DANIDA). Asimismo agradecemos el soporte logístico de los laboratorios de Biotecnología Aplicada y Biología Molecular del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en México. Se agradece especialmente el apoyo de los científicos Natasha Bohorova, David Hoisington, Larry Buttler y Robert McKelvy Bird, que permitió obtener valiosos resultados. Asimismo, se agradece la ayuda de Regulo Franco y

César Gálvez (directores del proyecto arqueológico “El Brujo” en el Perú), que facilitaron las labores de campo. Agradecemos al Ingeniero Químico Jorge Rivero su participación en los análisis físico-químicos de los suelos arqueológicos, brindando valiosos resultados. Finalmente, mostramos también nuestro agradecimiento a la Dra. Ing. Schjellerup (Museo Nacional de Dinamarca) y al Dr. Ramiro Matos (Smithsonian Institute de Washington), quienes fueron los supervisores de esta investigación.

Referencias Bibliográficas

- Benson EE, Lynch PT, Stacey GN (1998): Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. *AgBiotech News and Information* 10: 133N-141N.
- Boerner A (2006): Preservation of plant genetic resources in the biotechnology era. *Biotechnology Journal* 1: 1393-1404.
- CIMMYT (1990): Una vida más larga para *Zea mays*. *Geneflow*. Marzo 1990. IBPGR Italia.
- Daws MI, Davies J, Vaes E, VanGelder R, Pritchard HW (2007): Two-hundred-year seed survival of *Leucospermum* and two other woody species from the Cape Floristic region, South Africa. *Seed Science Research* 17: 73-79.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P (2008): Sequencing ancient and modern genomes (Review). *Archaeobios* 2: 75-80.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Vega JL (2007): Archaeology meets Molecular Biology (Review). *Archaeobios* 1: 1-2.
- Godefroid S, VanDeVyver A, Stoffelen P, Robbrecht E, Vanderborcht T (2011): Testing the viability of seeds from old herbarium specimens for conservation purposes. *Taxon* 60: 565-569.
- Hartman H, Kester D (1981): “Propagación de Plantas: Principios y Prácticas”. Compañía Editorial Continental (México).
- Labouriau L (1983): “A Germinação das Sementes”. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (Caracas) y Secretaria General de la OEA, programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Washington DC).
- Leino MW, Edqvist J (2010): Germination of 151-year old *Acacia* spp. seeds. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57: 741-746.
- Leino MW, Hagenblad J (2010): Nineteenth Century Seeds Reveal the Population Genetics of Landrace Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution* 27: 964-973.
- Leino MW, Hagenblad J, Edqvist J, Strese EMK (2009): DNA preservation and utility of a historic seed collection. *Seed Science Research* 19: 125-135.
- Li DZ, Pritchard HW (2009): The science and economics of ex situ plant conservation. *Trends in Plant Science* 14: 614-621.
- Merritt DJ, Dixon KW (2011): Restoration seed banks-a matter of scale. *Science* 332: 424-425.
- Odum, S. 1965. Germination of ancient seeds. Floristical observations and experiments with archaeologically dated soil samples. *Danks Botanisk Ark* 24: 1-70.
- Porsild A, Harrington C, Mulligan G. 1967. *Lupinus arcticus* Wats. Grown from seeds of Pleistocene age. *Science* 158: 113-114.

- Priestley, DA. 1986. Seed Aging. Implications for seed storage and persistence in the soil. Comstock Publishing Associates (Cornell University Press) Ithaca, NY.
- Probert RJ, Daws MI, Hay FR (2009): Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals Of Botany* 104: 57-69.
- Rajjou L , Debeaujon I (2008): Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies* 331: 796-805 .
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D and Larinde M (2006): "Manual of Seed Handling in Genebanks". Handbooks for Genebanks No. 8. Bioversity International (Roma).
- Sallon S, Solowey E, Cohen Y, Korchinsky R, Egli M, Woodhatch I, Simchoni O, Kislev M (2008): Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science* 13:1464.
- Shenmiller J, Mudgett MB, Schopf JW, Clarke S, Berger R (1995): Exceptional seed longevity and robust growth - ancient sacred lotus from China. *American Journal of Botany* 82: 1367-1380.
- Turner JH (1933): The viability of seeds. *Kew Bull Misc Inform* 1933: 257-269.
- Walters C, Reilley AA, Reeves PA, Baszczak J, Richards CM (2006): The utility of aged seeds in DNA banks. *Seed Science Research* 16: 169-178.
- Walters C, Wheeler LM, Grotenhuis JM (2005): Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research* 15: 1-20.
- Zazula GD, Harington CR, Telka AM, Brock F (2009): Radiocarbon dates reveal that *Lupinus arcticus* plants were grown from modern not Pleistocene seeds. *New Phytologist* 182: 788-792.