

Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales

Physiology of recalcitrant seeds of tropical trees

Stanislav V. Magnitskiy¹ y Guido A. Plaza²

Resumen: Las semillas recalcitrantes se caracterizan por su sensibilidad a la deshidratación y una rápida pérdida de viabilidad posterior a la diseminación, lo que implica limitaciones graves para el almacenamiento de la semilla con fines de propagación de árboles tropicales. La presente revisión resume los datos teóricos y prácticos existentes con respecto a la fisiología de la tolerancia a la deshidratación, la viabilidad y el almacenamiento de semillas recalcitrantes de especies forestales tropicales.

Palabras clave: almacenamiento de semillas, viabilidad de semillas, deshidratación de semillas.

Abstract: Recalcitrant seeds are characterized by low desiccation tolerance and rapid reduction in viability after shedding. This implicates a serious limitation for storage of recalcitrant seeds of tropical forest species and propagation of tropical trees. The present review summarizes current theoretical and practical data in physiology of desiccation tolerance, viability, and storage of recalcitrant seeds of tropical forest.

Key words: seed storage, seed viability, dehydration of seeds.

Introducción

TODAS LAS SEMILLAS DIFIEREN en su tolerancia a la desecación que sigue tras su diseminación. Según este parámetro, las semillas se pueden clasificar en ortodoxas, recalcitrantes e intermedias. Las semillas ortodoxas toleran una deshidratación hasta de 5% en el contenido de humedad; por su parte, las semillas que toleran la deshidratación entre 10% y 12,5% de contenido de humedad se consideran intermedias y las que toleran la deshidratación entre 15% y 50% de humedad se denominan recalcitrantes (Farrant *et al.*, 1993; Gentil, 2001).

La principal característica fisiológica de las semillas ortodoxas es su gran tolerancia a la deshidratación. Su fase final de maduración está acompañada por deshidratación celular, la cual inicia con la pérdida de agua del suministro vascular de la planta madre a la semilla, como resultado de la separación de funículos entre 40 y 50 días después de la polinización (Bewley y Black,

1994). En este período las semillas adquieren la tolerancia para ceder a la deshidratación, característica que mejora su viabilidad y el potencial de almacenamiento (Nkang, 2002; Hoekstra *et al.*, 1994).

Las semillas recalcitrantes no experimentan deshidratación en la planta madre y, sin detener su desarrollo, pasan directamente a la germinación (Farrant *et al.*, 1993), aun cuando ocurren algunos casos de latencia (Berjak y Pammenter, 2004). Al contrario de las semillas ortodoxas, las semillas recalcitrantes se diseminan en una condición húmeda y metabólicamente activa (Leprince *et al.*, 1993; Kainer *et al.*, 1999), perdiendo rápidamente su capacidad de germinación al quedar expuestas a condiciones de baja humedad (Kermode y Finch-Savage, 2002). El nivel de humedad al momento de la diseminación en semillas recalcitrantes de los árboles tropicales varía entre 23% en cocura (*Pourouma cecropiifolia* Mart.) (Sánchez *et al.*, 2005) y 25% en la nuez del Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. Bonpl.) (Kainer *et*

Fecha de recepción: 5 de diciembre de 2006
Aceptado para publicación: 06 de junio de 2007

¹ Profesor asistente, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: svmagnitskiy@unal.edu.co

² Profesor asociado, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: gaplazat@unal.edu.co

al., 1999), hasta 46-51% en palma *Euterpe espirotantensis* Fernand. (Martins *et al.*, 1999) y 47-53% en cagaita (*Eugenia dysenterica* D.C.) (Andrade *et al.*, 2003). Adicionalmente, muchas semillas recalcitrantes de origen tropical son sensibles al frío y no pueden ser almacenadas a temperaturas inferiores a 15°C. La sensibilidad a la deshidratación y a temperaturas bajas prolongadas implica limitaciones graves para el almacenamiento comercial a largo plazo de las semilla recalcitrantes (Floriano, 2004). El tiempo de almacenamiento es corto, si bien presenta variación en periodos de días (Farnsworth, 2000) o meses (Gomes *et al.*, 2006) (tabla 1).

Algunas especies, como la palma datilera silvestre *Phoenix reclinata* (Berjack y Pammenter, 2004) o especies arbóreas del género *Citrus* (Villegas-Monter y Andrade-Rodríguez, 2005) producen semillas con características intermedias entre ortodoxas y recalcitrantes (LePrince *et al.*, 1993). La habilidad para germinar de estas semillas depende del grado de tolerancia a la pérdida de agua, al tiempo y las condiciones de almacenamiento (Berjak y Pammenter, 2004). Por ejemplo, las semillas de ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) pierden su viabilidad en aproximadamente seis meses cuando se mantienen a 25° C (Tomassi *et al.*, 2006) quedando viables por un tiempo mucho más prolongado en comparación con la mayoría de especies recalcitrantes. Sin embargo, las semillas de ginkgo no son sensibles al frío (Tomassi *et al.*, 2006) y no presen-

tan alta tolerancia a la deshidratación, como se espera de las especies ortodoxas; de acuerdo con algunos autores las semillas ginkgo constituyen una clase intermedia de semillas (Liang y Sun, 2002). En especies no forestales, un cultivo indicativo con semillas que pueden presentar conducta de almacenamiento intermedio es *Coffea sp.* (Dussert *et al.*, 1998; Eira *et al.*, 2006). El contenido de humedad mínimo que toleran las semillas de *C. arabica*, *C. canephora* y *C. liberica* sin reducir su viabilidad, es de aproximadamente 9, 11, y 24% respectivamente (Gentil, 2001; Eira *et al.*, 2006) con reducción en la viabilidad a bajas temperaturas (Gentil, 2001) a diferencia de las semillas de *C. costatifructa*, *C. racemosa* y *C. sessiliflora* las cuales mostraron un nivel crítico de humedad de semilla de 19, 30 y 30%, respectivamente (Dussert *et al.*, 1998).

En general, la variación en la tolerancia a la deshidratación de semillas puede ser atribuida a características intrínsecas de la planta y condiciones ambientales (bajo condiciones de estrés la planta madre puede producir semillas con un menor grado de recalcitrancia); por consiguiente, las necesidades en investigación se deben ubicar en estas dos líneas. Muchas preguntas quedan aún con respecto a la longevidad de semillas recalcitrantes de especies forestales y los procesos que ocurren durante la pérdida su viabilidad. Las condiciones óptimas para el almacenamiento de las semillas a largo plazo son poco conocidas (Fonseca y Freire, 2003) teniendo

Tabla 1. Viabilidad de semillas recalcitrantes de algunas especies de árboles tropicales a condiciones y tiempo de almacenamiento.

Especie	Condiciones (T°, HR y otros)	Tiempo (meses)	Viabilidad %	Referencias
Nuez de Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> Humb. Bonpl.)	22-26 °C arena húmeda	5,5	≥ 54	Kainer <i>et al.</i> , 1999 modificado
Cooba (<i>Swietenia macrophylla</i> King.)	3-5 °C 12-14% HR contenedores de metal	7	≥ 44	Gómez <i>et al.</i> , 2006 modificado
Araucaria (<i>Araucaria angustifolia</i> Bertol.)	4-6 °C 38-42% HR empaque plástico	9	≥ 35	Chaves <i>et al.</i> , 1999 modificado
Fruta dorada (<i>Virola surinamensis</i> (Rol.) Warb.)	25 °C vermiculita húmeda	1,5	≥ 31	Piña-Rodríguez y Figliolia, 2006 modificado
Sandalwood (<i>Osyris lanceolata</i> Hochst. Steud.)	3-5 °C 20% HR	9	60	Mwang'Ingo <i>et al.</i> , 2004
Palma (<i>Euterpe espirotantensis</i> Fernand.)	10 °C 20-25% HR empaque plástico	1	≥ 89	Martins <i>et al.</i> , 1999 modificado
Roble (<i>Quercus rugosa</i> Née)	5-7 °C agrolita húmeda empaque plástico sellado	11	34	Zavala-Chávez, 2004
Maitén (<i>Maytenus boaria</i> Molina)	3-5 °C arena húmeda empaque plástico	1,5	≥ 56	Cabello y Camelio, 1996 modificado

en cuenta que hay una alta variedad en las respuestas fisiológicas en semillas recalcitrantes una vez cosechadas. Este conocimiento se requiere para la propagación sexual de especies forestales tropicales con fines como el abastecimiento de viveros, conservación de germoplasma de especies en peligro de extinción o la reforestación de comunidades perturbadas. La presente revisión resume los datos teóricos y prácticos existentes sobre la tolerancia a la deshidratación y viabilidad de semillas recalcitrantes de especies forestales tropicales.

Ecofisiología de semillas recalcitrantes en especies forestales tropicales

La recalcitrancia de las semillas es frecuente tanto en Angiospermas como en Gimnospermas. Los árboles que producen semillas recalcitrantes se restringen típicamente a ambientes tropicales acuáticos y semiacuáticos (Tweddle *et al.*, 2003; Mata y Moreno-Casasola, 2005) donde el establecimiento de las plántulas puede ser continuo a través del año (Kainer *et al.*, 1999), condiciones que favorecen menores requerimientos en latencia si se comparan con las semillas ortodoxas (Baskin y Baskin, 2000; Tweddle *et al.*, 2003; Mata y Moreno-Casasola, 2005). Estas condiciones dan al ecosistema tropical una dinámica muy específica de regeneración. Por ejemplo, las nueces de la palma *Geonoma brevispatha* Barb-Rodr. no germinan en condiciones de anoxia, permaneciendo viables sumergidas en agua por lo menos por dos meses después de la diseminación (Gomes *et al.*, 2006), germinando posteriormente como respuesta al incremento en la concentración de oxígeno al disminuir el nivel de agua (Gomes *et al.*, 2006). Esta estrategia se presenta en otras especies tales como jagua (*Genipa americana* L.) cuyas semillas se mantuvieron viables durante cuatro meses sumergidas en agua (Scarano *et al.*, 1992) y rayo (*Parkia pendula* (Willd.) Walp.) cuyas semillas permanecieron viables en condiciones anóxicas por más de siete meses (Souza *et al.*, 2004). El efecto de la flotación induce el estado de latencia en semillas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), árbol del Amazonas brasileño que produce plántulas en ambas circunstancias, secano (libre de inundación) y bosques propensos a la inundación (Scarano *et al.*, 2003). De todas formas la dinámica de la pérdida de la viabilidad de las semillas, así como la interacción de los factores externos e internos de la semilla que regulan su longevidad en el piso del bosque, son desconocidas para muchas especies forestales.

Una característica de las semillas recalcitrantes de árboles tropicales es su tamaño relativamente grande (Mata

y Moreno-Casasola, 2005), logrando exceder en algunos casos los cuatro centímetros de largo (Farnsworth, 2000). Cerca del 75% de estas especies poseen embriones que ocupan más de la mitad del volumen de la semilla y poco o inexistente endospermo (Farnsworth, 2000), característica que permite su germinación en áreas sombreadas y en ambientes de sucesión maduros (Foster, 1986). El gran tamaño y la recalcitrancia puede ser ventajosa para reducir el período de exposición a los depredadores y una baja inversión en medios físicos de defensa permitiendo a las semillas recalcitrantes, mayor velocidad de germinación y ser un recurso más eficiente en la propagación de plantas (Daws *et al.*, 2005). De otro lado, aquellas semillas recalcitrantes de gran tamaño y grosor de la testa pueden relacionarse con alta sensibilidad a la deshidratación pudiendo usarse estas características como parámetros para predecir la respuesta a la misma y a las condiciones de almacenamiento (Daws *et al.*, 2006). Por su parte Vertucci y Farrant (1995) comentan lo inadecuado de usar en semillas recalcitrantes la masa seca máxima y el contenido relativo de humedad como parámetros de madurez fisiológica. Las semillas recalcitrantes de algunas especies, por ejemplo *Guilfoylia monostylis* (Benth.) F. Muell., acumulan materia seca de manera continua hasta el momento del desprendimiento de la planta (Nkang, 2002). Adicionalmente, los embriones de las semillas recalcitrantes pueden ser inmaduros a altos niveles en el contenido de humedad (55-80%) (Farrant *et al.*, 1993) presentándose casos de estado latente, los cuales se atribuyen a inmadurez del embrión, como sucede por ejemplo en el anón de agua (*Annona glabra* L.) (Mata y Moreno-Casasola, 2005) y la fruta dorada (*Virola surinamensis* (Rol.) Warb.) (Piña-Rodriguez y Figliolia, 2005).

Mecanismos bioquímicos y fisiológicos implicados en la sensibilidad a la deshidratación y viabilidad en semillas recalcitrantes

Azúcares y otras soluciones compatibles. La habilidad de las semillas para sobrevivir a la deshidratación depende de una serie de mecanismos de adaptación que previenen el deterioro celular durante la pérdida de agua. En semillas ortodoxas, la maduración y la adquisición de tolerancia a la deshidratación pueden estar relacionadas con la acumulación celular de sacáridos y otras soluciones compatibles (Blackman *et al.*, 1992), aunque algunos investigadores no informan correlación (Hoekstra *et al.*, 1994). Disacáridos (trehalosa y sacarosa) y oligosacáridos (rafinosa) han sido impli-

cados en la estabilización de membranas (Buitink *et al.*, 2000) y formación de vidrio (vitrificación) en las células de las semillas durante el secado (Blackman *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1994). Altas concentraciones de oligosacáridos y la formación de la fase vítrea viscosa demora la cristalización de solutos, inhibe la movilidad molecular y restringe las reacciones bioquímicas (Koster, 1991) previniendo así el deterioro de estructuras macromoleculares durante la deshidratación. Según Crowe *et al.* (1998), los azúcares también pueden contribuir a estabilizar las estructuras de las proteínas al formarse enlaces de hidrógeno entre grupos de hidroxilo de carbohidratos y residuos polares en proteínas de membrana.

Por su parte, en semillas recalcitrantes se ha documentado dependencia de la tolerancia a la deshidratación bajo concentraciones de azúcares solubles (Leprince *et al.*, 1993). La sensibilidad a la deshidratación puede ser explicada por el déficit de ciertos oligosacáridos (Blackman *et al.*, 1992) o su proporción en los tejidos de la semilla, especialmente en el eje embrionario (Kermode y Finch-Savage, 2002). Sin embargo, las medidas directas no muestran que el déficit de oligosacáridos ocurra en todas las semillas recalcitrantes (Farnsworth, 2000). Los niveles de rafinosa en el eje embrionario de semillas recalcitrantes de las diferentes especies pueden ser similares o exceder (Farrant *et al.*, 1993) los de semillas ortodoxas. La evidencia del reemplazo de agua entre membranas y vitrificación se ha demostrado también en semillas recalcitrantes (Vertucci y Farrant, 1995). Adicionalmente, la sensibilidad a la deshidratación no puede ser causada necesariamente por ausencia a bajas concentraciones de estos azúcares (Hoekstra *et al.*, 1994), así como la vitrificación por sí sola es incapaz de proteger las semillas contra la deshidratación (Sun *et al.*, 1994; Sun, 1999). Al mismo tiempo, el metabolismo de carbohidratos en semillas de especies tropicales forestales ha sido poco estudiado. Nkang (2002) sugiere la existencia de azúcares desconocidos en las semillas de árboles tropicales, los cuales pueden ayudar a explicar los mecanismos de recalcitrancia en estas especies.

Trabajos recientes sugieren la intervención, además de azúcares, de otras moléculas las cuales juegan un papel importante en la formación intracelular del vidrio, entre las que se encuentran varias proteínas (Buitink *et al.*, 2000) como las dehidrininas (Kermode y Finch-Savage, 2002). La presencia de proteínas oleosinas, que estabilizan los cuerpos grasos en semillas, pueden aumentar la recalcitrancia de semillas que tienen bajo (Guilloteau *et al.*, 2003) o ningún nivel de oleosinas (Leprince *et al.*,

1998). Por ejemplo, la fusión de cuerpos grasos sumada a una pérdida en la integridad celular durante la imbibición de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) fue causada por la ausencia de oleosinas (Leprince *et al.*, 1998) que posiblemente contribuyó en las propiedades recalcitrantes de las semillas. Del mismo modo puede ser que los niveles excepcionalmente altos de proteínasa aspártica en semillas de cacao y caucho (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) (Voigt *et al.*, 1997) causen la degradación masiva de proteínas en la semilla después de su diseminación y aumenten el nivel de recalcitrancia de éstas.

Una de las explicaciones del daño celular durante la deshidratación de las semillas recalcitrantes puede ser el alto porcentaje de saturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas (32-36%), un porcentaje considerablemente alto si es comparado con el de semillas ortodoxas (16-27%) (Blanche *et al.*, 1991). Aunque las membranas de muchas semillas recalcitrantes se caracterizan por contenidos significativos del insaturado ácido linolénico en fosfolípidos (Liu *et al.*, 2006), también se conoce que el alto grado de la saturación de los ácidos grasos facilita la pérdida de estabilidad de la membrana durante de la deshidratación (Nkang *et al.*, 2003). Así, altos contenidos de ácidos grasos saturados agilizan el proceso de deterioro de las semillas recalcitrantes durante su almacenamiento en roble americano (*Quercus rubra* L.) (Sun *et al.*, 1999) y caoba (*Swietenia macrophylla* King.) (Gómez *et al.*, 2006).

El estrés oxidativo. Es uno de los factores importantes en la pérdida de viabilidad de las semillas durante la maduración y el almacenamiento (Kermode y Finch-Savage, 2002; Pukacka y Ratajczak, 2005; Dussert *et al.*, 2006). Los sistemas antioxidantes de la ruta del ácido ascórbico-glutación tienen un papel importante en la disminución del daño celular durante el desarrollo y germinación de las semillas ortodoxas (Vertucci y Farrant, 1995; Tommasi *et al.*, 2006) eliminando los radicales libres de oxígeno (RLO) generados en estas condiciones.

Según Tommasi *et al.* (1999), al comparar semillas ortodoxas con semillas recalcitrantes, éstas se caracterizan por un mayor contenido de ácido ascórbico y mayor actividad de las enzimas de la ruta de ácido ascórbico-glutación, e incluso de la peroxidasa del ácido ascórbico y la reductasa del dehidroascorbato. Directamente después de la diseminación de las semillas recalcitrantes, la producción de RLO es controlada por el metabolismo de la semilla (Berjak y Pammenter, 2004), pero la deshidratación de éstas causa la rápida disminución de la

eficiencia de los sistemas antioxidantes al compararlas con semillas ortodoxas (Chaitanya *et al.*, 2000). La disminución en las actividades de las enzimas antioxidantes está directamente asociada con la pérdida de viabilidad en semillas de carvalho (*Quercus robur* L.) (Hendry *et al.*, 1992) y otras árboles (Tommasi *et al.*, 1999) donde el nivel del ácido ascórbico por si solo es incapaz de prevenir o retrasar el daño oxidativo inducido por la deshidratación. Esto tiene como resultado la peroxidación de lípidos de la membrana, seguido por la desintegración y muerte celular (Hendry *et al.*, 1992; Leprince *et al.*, 1999) como fue observado en semillas recalcitrantes de té (*Camellia sinensis* L.Kuntze), cacao (*Theobroma cacao* L.), jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) (Pence, 1991; Sun, 1999) y arce del azúcar (*Acer saccharinum* L.) (Pukacka y Ratajczak, 2005). El eje embrionario de las semillas de arce del azúcar (*Acer saccharinum* L.) está protegido por antioxidantes del sistema del ácido ascórbico-glutiación; no obstante, una deshidratación del eje embrionario por debajo del 43% de humedad debilita el equilibrio metabólico generando una sobreproducción incontrolable de RLO en los cotiledones (Pukacka y Ratajczak, 2005). Observaciones similares se reportan para semillas recalcitrantes de robles, cuando la deshidratación tuvo como resultado generación de las ROS y peroxidación de lípidos, precedido por oscurecimiento de los tejidos de la semilla (Sun, 1999), aumento en los lixiviados celulares y caída de la viabilidad (Finch-Savage *et al.*, 1996).

La alta actividad de antioxidantes se ha documentado también en semillas intermedias de ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) las cuales, a diferencia de las semillas ortodoxas, contienen gran cantidad de ácido ascórbico (Tommasi *et al.*, 1999). Los embriones de ginkgo están más equipados con sistemas antioxidantes que endospermo, pero éstos no son capaces de contrarrestar el daño oxidativo que ocurre durante el almacenamiento (Tommasi *et al.*, 2006).

Ácido abscísico. Durante el desarrollo de semillas el ácido abscísico (ABA) influye en la síntesis de varias clases de proteínas implicadas en la adquisición del estado latente y la tolerancia a la deshidratación (Bewley y Black, 1994; Berjak y Pammenter, 2004). Así, las semillas con contenidos bajos de ABA desarrollarán testas delgadas (Bewley and Black, 1994) que hacen las semillas más susceptibles a la deshidratación. El ejemplo más típico de la regulación de genes modulados por ABA son los genes *LEA*, los cuales se expresan en algunas plantas como respuesta a diferentes tipos de estrés ambientales (Farnsworth, 2000). Las proteínas LEA así como las dehidrinas confieren resistencia a la deshidratación en

semillas ortodoxas al reducir la desnaturalización de proteínas de membrana, lo que permite preservar la configuración fija de membrana durante la pérdida de agua (Leprince *et al.*, 1993).

Diferentes investigadores sugieren que el ABA es necesario para la adquisición de la tolerancia a la deshidratación, pero éste por si solo no es suficiente para conferir dicha tolerancia en semillas recalcitrantes (Finch-Savage *et al.*, 1996; Kermodé y Finch-Savage, 2002). Por ejemplo, las dehidrinas están ausentes en algunas semillas recalcitrantes y algunas semillas vivíparas (germinación precoz) (Farnsworth, 2000). Su presencia en especies recalcitrantes, incluso en semillas del género *Quercus*, sugiere que las dehidrinas no son el único factor para lograr la tolerancia a la deshidratación en este tipo de semillas (Farnsworth, 2000). En general, la recalcitrancia puede ser en parte atribuida a bajos niveles o a falta de ABA en las semillas (Finch-Savage *et al.*, 1996) las cuales muestran baja sensibilidad a los efectos inhibitorios de ABA en la germinación (González y Fischer, 1997). Asimismo, Vertucci y Farrant (1995), trabajando con mutantes insensibles al ABA, muestran la intolerancia las semillas a la deshidratación.

Desde el punto de vista ecológico, un aumento en la tolerancia a la deshidratación y el consecuente estado latente de la semilla puede ocurrir por el cambio de un ambiente semi-acuático a ambientes más secos (Farnsworth, 2000). A bajos niveles de estrés (ambiente semi-acuático), se espera menos ABA producido en tejido vegetativo y acumulado en semillas (Bewley and Black, 1994). Un aumento en la producción de ABA en la planta como respuesta al cambio de ambiente (en ambientes más áridos) aumenta la habilidad de sobrevivir (Leprince *et al.*, 1993) reduciendo el nivel de recalcitrancia de las semillas en los ambientes secos. Algunos mangles presentan niveles de ABA de intermedios a altos en tejidos vegetativos o tejidos maternos de la fruta, pero muy bajos niveles de ABA en el embrión de la semilla (Farnsworth, 2000) lo que afecta la regulación de la acumulación de ABA en diferentes partes de la planta y a la adquisición de la recalcitrancia en semillas.

Las cubiertas de la semilla. Las cubiertas de la semilla (testa) y el fruto (pericarpio) son importantes en la prevención de la deshidratación después de la dispersión de las semillas, funcionando como barreras mecánicas que evitan la deshidratación en (Chacón y Bustamante, 2001; Moreno *et al.*, 2006). Testas duras se presentan en más del 40% de las especies que producen

semillas recalcitrantes, mientras los tejidos carnosos que rodean la semilla son a veces suaves y tienen alto contenido de agua (Farnsworth, 2000). La tasa de pérdida de agua se relaciona con el grosor de las cubiertas de la semilla (Chacón y Bustamante, 2001) de modo que semillas recalcitrantes con cubiertas rotas se desecan más rápidamente y en un porcentaje más alto (Mwang'Ingo *et al.*, 2004). Por otra parte, la testa gruesa de las semillas de *Cryptocarya floribunda* Nees. (Thapliyal *et al.*, 2004) o del árbol de sándalo (*Osyris lanceolata* Hochst. Steud.) (Mwang'Ingo *et al.*, 2004) restringen la imbibición e intercambio gaseoso en sus semillas, imponiendo así el estado de latencia física. Este tipo de latencia se demostró de igual forma para las semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) (Moreno *et al.*, 2006), nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. Bonpl.) (Kainer *et al.*, 1999) y las semillas de maitén (*Maytenus boaria* (Molina) (Cabello y Camelio, 1996). Semillas recalcitrantes rodeadas por pericarpio y testa delgadas, como el arce del azúcar (*Acer saccharinum* L.), se desecan en un tiempo relativamente corto cuando son colocadas en condiciones de baja humedad (Pukacka y Ratajczak, 2005).

Los cambios en la composición bioquímica de las cubiertas de semillas, por ejemplo los producidos por la oxidación de compuestos fenólicos, pueden contribuir aún más a su impermeabilidad (Bewley y Black, 1994). Por lo tanto, la impermeabilidad de las cubiertas de la semilla contra el agua y los gases gobierna el equilibrio entre los niveles de latencia física y la viabilidad de las semillas recalcitrantes: embriones encapsulados en cubiertas gruesas de baja impermeabilidad tienen un grado más alto de latencia pero, por otro lado, son menos susceptibles a la deshidratación.

Los inhibidores de la germinación en las testas imponen la latencia fisiológica de las semillas colocándolas en un estado de baja actividad metabólica menos susceptible al deterioro (Kainer *et al.*, 1999; Baskin y Baskin, 2000). La extracción o degradación de los inhibidores de la germinación por un factor químico (luz, temperatura) contribuyen a la liberación de semillas del estado inactivo. Mientras se reporta la presencia de sustancias inhibitoras en semillas recalcitrantes, tal como en la nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. Bonpl.) (Vazquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1993), la información acerca de la presencia de inhibidores en el embrión así como para los tejidos que rodean el embrión (endospermo y perispermo) es escasa para muchas especies arbóreas (Vazquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1993; Kainer *et al.*, 1999); estos tejidos pueden prevenir la germinación actuando como

barreras mecánicas para restringir el crecimiento del eje embrionario (Bewley y Black, 1994).

Implicaciones prácticas

El almacenamiento de las semillas de especies forestales del trópico húmedo es, a menudo, difícil a causa de la sensibilidad de las semillas a la deshidratación y las bajas temperaturas, condiciones tradicionalmente consideradas necesarias para el almacenamiento a largo plazo de semillas (Kainer *et al.*, 1999). El desafío principal en el almacenamiento de semillas recalcitrantes a largo plazo es evitar de la pérdida de viabilidad, lo cual requiere conocer a profundidad las condiciones óptimas de almacenamiento, terreno aún por explorar mediante investigación práctica.

Evitar la deshidratación de las semillas recalcitrantes durante el almacenamiento puede lograrse implementando ambientes húmedos. El polietileno glicol (Bewley y Black, 1994), la arena húmeda (Kainer *et al.*, 1999), el suelo húmedo (Mata y Moreno-Casasola, 2005), agua (Mata y Moreno-Casasola, 2005; Gomes *et al.*, 2006), carbón (Bewley y Black, 1994) o atmósferas modificadas (uso de empaques plásticos sellados o perforados) (Chaves *et al.*, 1999; Zavala, 2004) pueden ser útiles para el almacenamiento de estas semillas (ver tabla 1).

Se han establecido las condiciones de humedad óptimas basándose en la medición del contenido de la humedad de la semilla inmediatamente después de la diseminación; sin embargo, el nivel de humedad en el embrión, y en particular en el eje embrionario, puede ser el mejor indicador de la viabilidad de la semilla comparado con el nivel de humedad de la semilla entera, tal como sucede en el cacao (*Theobroma cacao* L.) (Liang y Sun, 2002). En semillas recalcitrantes, la finalización del almacenamiento en condiciones de bajas temperaturas, así como un alto nivel de humedad, las hace susceptibles al ataque de patógenos, principalmente de los hongos típicos de las condiciones de almacenamiento, pero también de hongos endémicos de las semillas (Fonseca y Freire, 2003; Calistru *et al.*, 2000); por ello se recomienda un tratamiento pre-almacenamiento con fungicidas (Villegas-Monter y Andrade-Rodríguez, 2005).

Temperaturas que oscilan entre 3 y 5°C son convenientes para almacenar semillas recalcitrantes del bosque templado, mientras que el rango de 7 a 17°C es el apropiado para almacenar semillas recalcitrantes del bosque tropical (Hong y Ellis, 2003 citado por Floriano, 2004). Se ha re-

portado un almacenamiento exitoso, durante largo plazo y con temperaturas bajas (2 a 6°C), para muchas especies recalcitrantes del bosque tropical, entre ellas, andiroba (*Carapa guianensis*) (Ferraz y Sampaio, 1996), araucaria (*Araucaria angustifolia* Bert. O. Kuntze) (Chaves *et al.*, 1999; Floriano, 2004) y los encinos (*Roble* sp.) (Zavala Chávez, 2004). La ventaja de utilizar temperaturas bajas durante el almacenamiento de las semillas, es la reducción del metabolismo y la tasa de respiración, que reducen la susceptibilidad al deterioro. Una pregunta aún sin respuesta es: ¿se pueden usar en la práctica los tratamientos que disminuyen el nivel metabólico en semillas para prevenir el deterioro de las semillas recalcitrantes durante el periodo de almacenamiento? (Magnitskiy *et al.*, 2005). Es importante considerar la exploración de nuevas medidas prácticas para la elaboración de protocolos de almacenamiento de semillas recalcitrantes.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a Edna Constanza Ricaurte Beltrán, por su excelente asesoría y valioso apoyo en la corrección del artículo e idioma.

Literatura citada

- Andrade, A.C.S., R. Cunha, A.F. Souza, R.B. Reis y K.J. Almeida. 2003. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree *Eugenia dysenterica* DC. *Seed Sci. Tech.* 31, 125-137.
- Baskin, C.C. y J.M. Baskin. 2000. Ecology and evolution of specialized seed dispersal, dormancy and germination strategies. *Plant Spec. Biol.* 2, 95-96.
- Berjak, P. y N. Pammenter. 2004. Recalcitrant seeds. pp. 305-345. En: Benech-Arnold, R. y R. Sánchez (eds.). *Handbook of seed physiology*. Food Products Press, New York.
- Bewley, J.D. y M. Black. 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum Press, New York. 445 pp.
- Blackman, S.A., R. Obendorf y A.C. Leopold. 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 100, 225-230.
- Blanche, C.A., J.D. Hodges, A.E. Gómez y E. González. 1991. Seed chemistry of the tropical tree *Vochysia hondurensis* Sprague. *Forest Sci.* 37(3), 949-952.
- Buitink, J., M. Hemminga y F. Hoekstra. 2000. Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. *Plant Physiol.* 122, 1217-1224.
- Cabello, A. y M.E. Camelio. 1996. Germinación de semillas de maitén (*Maytenus boaria*) y producción de plantas en vivero. *Rev. Cienc. Forest.* 11, 1-14.
- Calistru, C., M. McLean, N.W. Pammenter y P. Berjak. 2000. The effects of mycofloral infection on the viability and ultrastructure of wet-stored recalcitrant seeds of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. *Seed Sci. Tech.* 10(3), 341-353.
- Chacón, P. y R.O. Bustamante. 2001. The effects of seed size and pericarp on seedling recruitment and biomass in *Cryptocarya alba* (Lauraceae) under two contrasting moisture regimes. *Vegetatio* 152 (2), 137-144.
- Chaitanya, K., R. Naithani y S.C. Naithani. 2000. Ascorbic acid metabolism in ageing recalcitrant sal (*Shorea robusta* Gaertn. f.) seeds. *Indian J. Exp. Bot.* 38, 1031-1035.
- Chaves, A., A. Mugredgei, H. Fassola, D. Alegranza y R. Fernández. 1999. Conservación refrigerada de semillas de *Araucaria angustifolia*. *Bosque* 20, 117-124.
- Crowe, J.H., J.F. Carpenter y L.M. Crowe. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 73-103.
- Daws, M., N. Garwood y H. Pritchard. 2005. Traits of recalcitrant seeds in a semi-deciduous tropical forest in Panamá. *Func. Ecol.* 19, 874-885.
- Daws, M., N. Garwood y H. Pritchard. 2006. Prediction of desiccation sensitivity in seeds of woody species. *Ann. Bot.* 97, 667-674.
- Dussert, S., M.W. Davey, A. Laffargue, S. Doubeau, R. Swennen y H. Etienne. 2006. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. *Physiol. Plant.* 127, 192-204.
- Dussert, S., N. Chabrilange, F. Engelmann, F. Anthony, J. Louarn y S. Hamon. 1998. Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. *Seed Sci. Res.* 8, 9-15.
- Eira, M.T.S., E.A. da Silva, R. de Castro, S. Dussert, C. Walters, J.D. Bewley y H.W. Hilhorst. 2006. Coffee seed physiology. *Braz. J. Plant Physiol.* 18(1), 149-163.
- Farnsworth, E. 2000. The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31, 107-138.
- Farrant, J.M., N.W. Pammenter y P. Berjak. 1993. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. *Seed Sci. Res.* 3, 1-13.
- Ferraz, I. y P.T. Sampaio. 1996. Métodos simples de armazenamento de sementes de andiroba (*Carapa guianensis* e *Carapa procera*). *Acta Amazon.* 26, 137-144.
- Finch-Savage, W.E., P.S. Blake y H.A. Clay. 1996. Desiccation stress in the recalcitrant species *Quercus robur* L. seeds results in lipid peroxidation and increased synthesis of jasmonates and abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 47, 661-667.
- Floriano, E. 2004. Armazenamento de sementes florestais. ANORGS, Santa Rosa. 10 p.
- Fonseca, S.C.L. y H.B. Freire. 2003. Sementes recalcitrantes: Problemas na pos-colheita. *Bragantia* 62(2), 297-303.
- Foster, S.A. 1986. On the adaptive value of large seeds for tropical moist forest trees: a review and synthesis. *Bot. Rev.* 52, 260-299.
- Gentil, D.F.O. 2001. Conservação de sementes do caféiro: resultados discordantes ou complementares? *Bragantia* 60(3), 149-154.
- Gomes, P., I. Marques y F. Martins. 2006. Germination of *Geonoma brevispatha* in laboratory and its relation to the palm spatial distribution in a swamp forest. *Aquat. Bot.* 85, 16-20.
- Gómez, T.J., J.J. Jasso-Mata, J.J. Vargas-Hernández y M.R.S. Hernández. 2006. Deterioro de semilla de dos procedencias de *Svietenia macrophylla* King, bajo distintos métodos de almacenamiento. *Ra Ximhai* 2(1), 223-239.
- Gonzalez, J.E. y R.F. Fisher. 1997. Effect of desiccation, temperature, and moisture content on seed storage of three tropical tree species. *Forest Sci.* 43 (4), 595-601.
- Guilloteau, M., M. Laloi, D. Blais, D. Crouzillat y J. McCarthy. 2003. Oil bodies in *Theobroma cacao* seeds: cloning and charac-

- terization of cDNA encoding the 15.8 and 16.9 kDa oleosins. *Plant Sci.* 164, 597-606.
- Hendry, G.A., W.E. Finch-Savage, P.C. Thorpe, N.M. Atherton, S.M. Buckland, K.A. Nilsson y E. Seel. 1992. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. *New Phytol.* 122, 273-279.
- Hoekstra, F., A. Haigh, F. Tettero y T. van Roekel. 1994. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. *Seed Sci. Res.* 4, 143-147.
- Kainer, K., M. Duryeaa, M. Malavasi, E. Rodrigues da Silva y J. Harrison. 1999. Moist storage of Brazil nut seeds for improved germination and nursery management. *Forest Ecol. Manag.* 116, 207-217.
- Kermode, A.R. y W.E. Finch-Savage 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: Black, M. y H.W. Pritchard, editors. *Desiccation and survival in plants. Drying without dying*. CABI Publishing. pp. 149-184.
- Koster, K.L. 1991. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 96, 302-304.
- Leprince, O., A. Van Aelst, H. Pritchard y D. Murphy. 1998. Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and sensitive oil seeds. *Planta* 204, 109-119.
- Leprince, O., G.A. Hendry y B.D. McKersie. 1993. The mechanism of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 3, 231-246.
- Liang, Y.H. y W.Q. Sun. 2002. Rate of dehydration and cumulative desiccation stress interated to modulate desiccation tolerance of recalcitrant Cocoa and Ginkgo embryonic tissues. *Plant Physiol.* 128, 1323-1331.
- Liu, M.S., C.Y. Chang y T.P. Lin. 2006. Comparison of phospholipids and their fatty acids in recalcitrant and orthodox seeds. *Seed Sci. Tech.* 34(2), 443-452.
- Magnitskiy, S.V., C.C. Pasian, D.W. Burger, M.A. Bennett y J.D. Metzger. 2005. Viability, metabolic heat, and respiration rates of paclobutrazol treated verbena and marigold seeds. *Seed Tech.* 27(2), 223-229.
- Martins, C., J. Nakagawa y M. Alves. 1999. Tolerância à dessecação de sementes de palmito-vermelho (*Euterpe espirotosantensis*). *Rev. Brasil. Bot.* 22(3), 391-396.
- Mata, D.I. y P. Moreno-Casasola. 2005. Effect of in situ storage, light, and moisture on the germination of two wetland tropical trees. *Aquat. Bot.* 83, 206-218.
- Moreno, F., G. Plaza y S. Magnitskiy. 2006. Efecto de la testa sobre la germinación en semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). *Agron. Colomb.* 25 (1), 290-295.
- Mwang'Ingo, P., Z. Teklehaimanot, S. Maliondo y H. Msanga. 2004. Storage and pre-sowing treatment of recalcitrant seeds of Africa sandalwood. *Seed Sci. Tech.* 32, 547-560.
- Nkang, A. 2002. Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Gulfoylia monostylis*). *J. Plant Physiol.* 159 (5), 473-483.
- Nkang, A., D. Omokaro, A. Egbe y G. Amanke. 2003. Variations in fatty acid proportions during desiccation of *Telfairia occidentalis* seeds harvested at physiological and agronomic maturity. *Afric. J. Biotech.* 2, 33-39.
- Pence, V.C. 1991. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. *Plant Cell Rpt.* 10, 144-147.
- Piña-Rodrigues, F. y M. Figliolia. 2005. Embryo immaturity associated with delayed germination in recalcitrant seeds of *Vriola surinamensis*. *Seed Sci. Tech.* 33, 375-386.
- Pukacka, S. y E. Ratajczak. 2005. Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. *J. Plant Physiol. (En prensa)*.
- Sánchez, D., E. Arends, A. Villarreal y A. Cegarra. 2005. Fenología y caracterización de semillas y plántulas de *Pourouma cecropiifolia* Mart. *Ecotropicos* 18(2), 96-102.
- Scarano, F. y R. Crawford. 1992. Ontogeny and the concept of anoxia tolerance: the case of the Amazonian leguminous tree *Parkia pendula*. *J. Trop. Ecol.* 8, 349-352.
- Scarano, F.R., T.S. Pereira y G. Rôças. 2003. Seed germination during floatation and seedling growth of *Carapa guianensis*, a tree from flood-prone forests of the Amazon. *Vegetatio* 168(2), 291-296.
- Souza, A.F. y E.R. Martins. 2004. Microsite specialization and spatial distribution of *Geonoma brevispatha*, a clonal palm in south-eastern Brazil. *Ecol. Res.* 19, 521-532.
- Sun, W. Q. 1999. State and phase transition behaviors of *Quercus rubra* seed axes and cotyledonary tissues: Relevance to the desiccation sensitivity and cryopreservation of recalcitrant seeds. *Cryobiol.* 38, 372-385.
- Sun, W.Q., T.C. Irving y A.C. Leopold. 1994. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiol. Plant.* 90, 621-628.
- Thapliyal, R.C., S.S. Phartyal, J.S. Nayal. 2004. Germination, desiccation tolerance and storage of seed of a tropical evergreen tree – *Cryptocarya floribunda* Nees (Lauraceae). *Seed Sci. Technol.* 32(2), 537-545.
- Tommasi, F., C. Paciolla y O. Arrigoni. 1999. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. *Physiol. Plant.* 105, 193-198.
- Tommasi, F., C. Paciolla, M.C. de Pinto y L. de Gara. 2006. Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 359-368.
- Tweddle, J.C., J.B. Dickie, C.C. Baskin y J.M. Baskin. 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J. Ecol.* 91, 294-304.
- Vasquez-Yanes, C. y A. Orozco-Segovia. 1993. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. *Annu. Rev. Ecol. System.* 24, 69-87.
- Vertucci, C. y J. Farrant. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. pp. 237-271. En: Kigel, J. y G. Galilli (eds.). *Seed development and germination*. Marcel Dekker, New York.
- Villegas-Monter, A. y M. Andrade-Rodríguez. 2005. Secado y almacenamiento de semillas de mandarina 'Cleopatra'. *Pesq. Agropec. Bras.* 40(1), 79-86.
- Voigt, G., B. Biehl, H. Heinrichs y J. Voigt. 1997. Aspartic proteinase levels in seeds of different angiosperms. *Phytochem.* 44(3), 389-392.
- Zavala, F. 2004. Deshidratación de bellotas y su relación con la viabilidad y germinación en nueve especies de encinos mexicanos. *Ciencia Ergo Sum* 11(2), 177-185.