

ALMACENAMIENTO

TRAN D. HONG Y RICHARD H. ELLIS

Facultad de Agricultura
Universidad de Reading, Reino Unido

La importancia del almacenamiento de semillas para la humanidad ha sido reconocida desde tiempos prehistóricos (Priestley, 1986). La mayoría de las prácticas de almacenamiento de semillas se han desarrollado empíricamente, con frecuencia como resultado de una combinación de observación casual y decisiones pragmáticas sobre lo que se puede lograr más fácilmente, a manera de control o modificación ambiental. En la agricultura, por ejemplo, la fuerza impulsora para tal conocimiento empírico ha sido el simple requisito práctico de almacenar semillas con seguridad, desde una cosecha hasta la siguiente temporada de producción. De manera similar en la silvicultura, existen una serie de consejos disponibles sobre el almacenamiento de semillas de árboles desde hace largo tiempo. Por ejemplo, hace milenio y medio se recomendó respecto al castaño (probablemente *Castanea mollissima*) que “las semillas frescas deben almacenarse en suelo húmedo colocado en la casa, y durante el transporte las semillas deben llevarse en una bolsa de cuero, porque las semillas del castaño morirán si se exponen al sol y al viento” (Ssu-Hsieh Chia, 535).

En discusiones sobre el almacenamiento de semillas de árboles, se requieren considerar cuatro factores principales: supervivencia de la semilla (esto es,

viabilidad, la capacidad de una semilla de permanecer viva, de manera que, cuando se necesite, germine y produzca una plántula capaz de generar un crecimiento autotrófico); ambiente de almacenamiento; duración del almacenamiento; y las especies (en efecto, cinco factores si también se considera la variación entre lotes de semillas dentro de una especie).

Una estructura para tal ensayo sería el enfatizar la duración requerido del almacenamiento de semillas. Con frecuencia es conveniente clasificar tales requerimientos en tres categorías un tanto arbitrarias: almacenamiento a corto plazo, típicamente de unos cuantos días hasta quizás 6 ó 9 meses; almacenamiento a mediano plazo, comúnmente de 1 a 5 años (por ejemplo, para suministrar semillas que permitan evitar la escasez después de años donde la producción de semillas fue escasa); y almacenamiento a largo plazo, cuyo periodo es de más de 10 años (principalmente para conservación de recursos genéticos). Sin embargo, el almacenamiento a largo plazo es actualmente posible sólo para especies con ciertas características. Consecuentemente creemos que es útil estructurar este ensayo en torno a las principales diferencias del comportamiento de semillas almacenadas entre especies. Mientras que la mayoría de los lectores se

interesarán solamente en semillas de árboles, la literatura sobre otras especies también se menciona aquí donde es útil, dado que las principales diferencias entre especies en cuanto al comportamiento de semillas en almacenamiento que se han identificado, aplica para todas las especies de plantas superiores.

CLASIFICACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LAS SEMILLAS EN ALMACENAMIENTO

Aunque lejos de estar completa, la literatura mundial incluye varios compendios amplios que proporcionan información sobre el almacenamiento de semillas de árboles (Tabla 1). Algunos compendios sobre el comportamiento de semillas en almacenamiento se

basaron en la duración de la supervivencia de las semillas (ya sea secadas al aire, en el suelo, o en agua), sin considerar el papel de factores ambientales en la longevidad de la semilla (Altman y Dittmer, 1972; Ewart, 1908; Harrington, 1972). Más adelante se descubrió que las semillas de ciertas especies clasificadas inicialmente por Ewart (1908) como “microbióticas”, o semillas de “corta vida” (Harrington, 1972), pueden de hecho ser almacenadas por largos períodos de tiempo bajo condiciones más apropiadas. Por lo tanto, los compendios posteriores han clasificado especies a base de la tolerancia de la semilla a la deshidratación y/o de la supervivencia o longevidad de la semilla como respuesta al ambiente (Hong *et al.*, 1996; King y Roberts, 1979; Tompsett y Kemp, 1996).

Tabla 1. Colección de varios compendios de información sobre el almacenamiento de semillas de especies de árboles.

Referencia	Gama de Especies	Comentarios
Ewart (1908)	2,371 especies de malezas, cultivos y árboles	Información sobre la supervivencia de semillas con relación a la duración del almacenamiento en el suelo, agua y al aire libre (principalmente almacenamiento abierto a temperatura ambiente)
Dent (1948)	244 especies de árboles forestales de India	Información sobre la supervivencia de semillas con relación a la duración del almacenamiento (principalmente almacenamiento abierto a temperatura ambiente)
Holmes y Buszewicz (1958)	170 especies de árboles de bosques templados	Información sobre la supervivencia de semillas con relación a la duración del almacenamiento y el ambiente
Altman y Dittmer (1972)	123 especies de malezas, cultivos y árboles de clima templado	Información sobre la supervivencia de semillas con relación a la duración del almacenamiento y el ambiente
Harrington (1972)	857 especies de malezas, cultivos y árboles de clima templado	Información sobre la supervivencia de semillas con relación a la duración del almacenamiento y el ambiente
Wang (1974)	48 especies de árboles de bosques templados	Información sobre la supervivencia de semillas con relación a la duración del almacenamiento y el ambiente
King y Roberts (1979)	77 especies (principalmente árboles) con comportamiento de semillas recalcitrantes en almacenamiento	Información sobre la supervivencia de semillas con relación a la duración del almacenamiento y el ambiente de semillas recalcitrantes
Hofmann y Steiner (1989)	211 especies (principalmente árboles) con comportamiento de semillas recalcitrantes en almacenamiento	Lista actualizada de especies con semillas recalcitrantes
Gordon (1992)	40 géneros de árboles de bosques templados	Consejos sobre ambientes de almacenamiento a medio plazo de semillas de árboles
Tompsett y Kemp (1996)	120 especies dentro de 29 géneros de árboles de bosques tropicales	Resumen de los resultados de los estudios de los autores sobre deshidratación y/o almacenamiento de semillas
Hong <i>et al.</i> (1996)	6,914 especies dentro de 2,069 géneros y 251 familias, incluyendo cultivos y árboles de todo el mundo	Clasificación de comportamiento de semillas en almacenamiento con información sobre la supervivencia de semillas en relación a deshidratación y almacenamiento

En este artículo consideramos la supervivencia y la longevidad de la semilla en el contexto de la respuesta al ambiente, habiéndose identificado tres distintas categorías separadas: comportamiento de semillas ortodoxas en almacenamiento (Roberts, 1973); comportamiento de semillas recalcitrantes en almacenamiento (Roberts, 1973); y comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento (Ellis *et al.*, 1990a).

COMPORTAMIENTO DE SEMILLAS ORTODOXAS EN ALMACENAMIENTO

Las semillas ortodoxas pueden secarse sin dañarse a bajos contenidos de humedad y, en una gama amplia de ambientes, su longevidad aumenta con la disminución del contenido de humedad y temperatura del almacenamiento, de una manera cuantificable y pronosticable (Roberts, 1973). Esto último se define por la ecuación de viabilidad de la semilla:

$$v = K_i - p / 10^{K_E - C_w \log_{10} m - C_H t - C_Q t^2} \quad (1)$$

donde v es viabilidad en porcentaje probit después de p días en almacenamiento a un porcentaje m de contenido de humedad (sobre base del peso), t °C, K_i es una constante específica del lote de semilla y K_E , C_w , C_H , y C_Q son constantes de viabilidad de especies (Ellis y Roberts, 1980). La constante K_i indica la viabilidad inicial (en probits) de la acésion de la semilla cuando se pone en almacenamiento. El valor de K_i puede variar considerablemente entre diferentes lotes de semillas dentro de especies, por ejemplo como resultado de diferencias en el ambiente de producción de semillas, tiempo de cosecha o genotipo (Ellis *et al.*, 1993).

Las constantes C_H y C_Q describen juntas la respuesta de la longevidad de la semilla a la temperatura. La forma particular de la relación entre longevidad y temperatura es una relación negativa curvilínea semilogarítmica, por medio de la cual el beneficio relativo para la longevidad de cada reducción de 10 °C en temperatura (Q_{10}) disminuye, cuanto más fresca es la temperatura (Dickie *et al.*, 1990; Ellis y Roberts, 1981). Una comparación de especies contrastantes, que incluía una especie de árboles, encontró que los valores de los términos de temperatura C_H y C_Q no difieren significativamente entre especies (Dickie *et al.*, 1990). De manera similar, los valores de C_H y C_Q determinados para cuatro especies de árboles forestales (*Liquidambar styraciflua* L., *Pinus elliotii*, *P. taeda* y *Platanus occidentalis*) por Bonner (1994) fueron 0.0306 – 0.0508 y 0.000328 – 0.000976, respectivamente, y por lo tanto, cercanos a los estimados comunes para

distintas especies de 0.0329 y 0.000478, respectivamente, determinados anteriormente (Dickie *et al.*, 1990). Esto indica que la longevidad de las semillas en todas las especies ortodoxas puede bien exhibir una respuesta cuantitativa similar a la temperatura de almacenamiento.

A una temperatura, el gradiente de la relación logarítmica negativa entre el contenido de humedad de la semilla (m) y la longevidad, proporciona el valor de la constante C_w . Por lo tanto, el valor de esta constante cuantifica el efecto del contenido de humedad en la longevidad. El valor de C_w difiere considerablemente entre especies. Por ejemplo, los valores de C_w comparados por Hong *et al.*, (1996) para 53 especies de 24 familias, varían de 0.983 para *Pinus elliotii* (Bonner, 1994) y 6.305 para *Sorghum bicolor* (Kuo *et al.*, 1990). En general, las especies que tienen semillas con un contenido alto de almidón (cereales), tienen valores altos para C_w (cerca de 6) pero en semillas de oleaginosas son mucho más bajos (entre 3.5 y 4) para la cebolla (*Allium cepa*) y soya (*Glycine max*). Puesto que las semillas de árboles son por lo general ricas en aceite en el embrión y/o en el endospermo (Tompsett y Kemp, 1996), las especies de árboles tienden a tener valores más bajos para C_w , esto es, 0.983 para *Pinus elliotii* (Bonner, 1994) y 4.23 para el maple noruego (*Acer platanoides*) (Dickie *et al.*, 1991). En una comparación de cálculos de C_w , el valor medio para especies de árboles forestales fue 2.8 comparado con un valor medio de 4.72 para especies herbáceas (Tompsett, 1994). Una consecuencia es que para obtener el mismo aumento relativo en longevidad, es necesario secar las semillas de árboles ortodoxas y oleaginosos más que las semillas almidonosas, a partir de un contenido de humedad inicial determinado.

Como consecuencia de la relación logarítmica negativa entre el contenido de humedad de la semilla y la longevidad, el beneficio relativo para la longevidad se hace mayor con cada reducción sucesiva del contenido de humedad. Por ejemplo, basado en los parámetros estimados de viabilidad para las semillas de *Ulmus carpinifolia* por Tompsett (1986), el efecto de una reducción desde 7 a 5% en el contenido de humedad, proporciona un aumento aproximado de 2.7 veces en longevidad, mientras que una reducción de 5 a 3% en el contenido de humedad de la semilla, aumenta la longevidad de la semilla cerca de 4.5 veces. Sin embargo, parece haber una respuesta común de longevidad a la humedad relativa de equilibrio entre especies de cultivos contrastantes, por lo menos, donde la longevidad aumenta por un factor de aproximadamente 2.2 por cada 10% de reducción en la humedad relativa de equilibrio (Ellis *et al.*, 1990c, Zanakis *et al.*, 1993). Sin embargo, se desconoce si

esta generalización para semillas de cultivos agrícolas y hortícolas también aplica para semillas de especies arbóreas.

Hay dos límites a la relación logarítmica negativa entre el contenido de humedad de la semilla y su longevidad (Roberts y Ellis, 1989). Uno es un límite superior, sobre el cual la longevidad de la semilla en almacenamiento hermético ya no se reduce con aumentos adicionales en la humedad, y por encima del cual en almacenamiento aireado, la longevidad de la semilla incrementa con aumentos adicionales en el contenido de humedad (Roberts y Ellis, 1982). El otro es un límite inferior, por debajo del cual reducciones adicionales en el contenido de humedad ya no aumenta la longevidad en almacenamiento hermético (Ellis *et al.*, 1988, 1989, 1990b, 1990c, 1992). El límite superior del contenido de humedad parece ser 11 a 12% en el pino (*Pinus elliottii* y *P. taeda*) (Bonner, 1994), 22% en el olmo (*Ulmus carpinifolia*) (Tompsett, 1986) y *Araucaria columnaris* (Tompsett, 1984a), y entre 15% en la lechuga (*Lactuca sativa*) (Ibrahim y Roberts, 1983) y cerca del 26% en trigo duro (*Triticum durum*) (Petruzzelli, 1986) para especies de cultivos. A pesar de la amplia variación entre especies en cuanto al contenido de humedad, estos valores coinciden con un potencial hídrico de aproximadamente -14 MPa (Roberts y Ellis, 1989; Zewdie y Ellis, 1991), esto es, el límite superior del contenido de humedad para la ecuación de viabilidad ocurre cuando los contenidos de humedad de la semilla están en equilibrio con aproximadamente 90% de humedad relativa (h.r.) a 20°C. El límite inferior varía considerablemente entre especies de cultivos, esto es, entre un contenido de humedad de cerca del 6 % para la arveja (*Pisum sativum*) y frijol mungo (*Vigna radiata*), y aproximadamente 2% para el girasol (*Helianthus annuus*) (Ellis *et al.*, 1988, 1989). Sin embargo, estas variaciones en los contenidos de humedad coinciden con 10 a 12% de equilibrio de la humedad relativa a 20°C (Ellis *et al.*, 1988, 1989, 1992), o con un potencial hídrico de la semilla de aproximadamente -350 MPa a esta temperatura (Roberts y Ellis, 1989). Se desconoce si este límite inferior también es pertinente para semillas de árboles forestales.

En almacenamiento abierto (donde las semillas están expuestas directa o indirectamente a la humedad relativa del ambiente; esto es, en una bolsa de papel, bolsa de tela, o bolsa de polietileno delgada no sellada que permite que la humedad relativa ambiental influya sobre el contenido de humedad de la semilla) a temperatura ambiente, la longevidad de semillas ortodoxas varía considerablemente. Por ejemplo, la viabilidad de *Salix* spp. no puede mantenerse más allá de 10 días en almacenamiento abierto (Brinkman, 1974b) mientras que las semillas de *Cassia multijuga* fueron capaces de germinar al

100% cuando se probaron después de 158 años en almacenamiento abierto a temperatura ambiente en un clima mediterráneo (Becquerel, 1934). Para el mantenimiento de viabilidad en almacenamiento a largo plazo, *Salix* spp. requiere almacenamiento hermético a bajos contenidos de humedad y temperaturas frescas, esto es, temperaturas bajo cero y contenidos de humedad en equilibrio con una humedad relativa de 10 a 30% (Zasada y Densmore, 1977). Evidentemente, las semillas de *Cassia multijuga* no necesitan control tan preciso del ambiente de almacenamiento para mantener la viabilidad en almacenamiento a largo plazo.

Siempre que los estimadores de las constantes de viabilidad estén disponibles, la ecuación de viabilidad puede aplicarse para determinar ambientes apropiados de almacenamiento de secado al aire para una determinada duración de almacenamiento para una especie ortodoxa determinada. Puesto que la misma vida en almacenamiento puede obtenerse por medio de diferentes combinaciones de temperatura de almacenamiento y contenido de humedad de la semilla – los valores exactos dependen de la especie – puede haber considerable flexibilidad. Dado que el beneficio relativo para la longevidad al reducir la temperatura disminuye, cuanto más baja es la temperatura de almacenamiento, mientras que el beneficio relativo para la longevidad al reducir el contenido de humedad aumenta, cuanto más bajo es el contenido de humedad (dentro de la amplia gama de ambientes para los cuales aplica esta ecuación de viabilidad) (Ellis y Roberts, 1980), con frecuencia es más eficaz en relación con el costo reducir el contenido de humedad de la semilla que reducir la temperatura de almacenamiento. Este método es de particular importancia para centros de almacenamiento de semillas donde no se puede proporcionar refrigeración a temperaturas de cero y bajo cero. En tales situaciones se ha recomendado que las semillas se sequen a contenidos de humedad en equilibrio con una humedad relativa de 10 a 12% a 20°C y que luego se almacenen herméticamente a temperaturas ambiente o (preferentemente) más frescas (Ellis *et al.*, 1989). Este método de baja tecnología ha sido descrito por algunos como almacenamiento de semillas “ultra seco” (International Board for Plant Genetic Resources, 1992). Los resultados de un estudio de 5 años han demostrado que la longevidad de semillas ultra secas a temperaturas ambiente es mayor que la de semillas de cultivo almacenadas a un contenido de humedad de entre 5 y 6%, al menos para varios cultivos (Ellis *et al.*, 1996). Asimismo, a través de una duración mucho más larga, se reportó un 90% de germinación de semillas de cebada (*Hordeum vulgare*) cuando se probaron después de 110 años de almacenamiento ultraseco (a un contenido de humedad de 3.1%) a

entre 10 y 15°C (Steiner y Ruckenbauer, 1995). Sin embargo, hasta la fecha, almacenamiento de semillas ultraseco no se ha aplicado a semillas de árboles, según lo que se sabe.

El almacenamiento exitoso de semillas de árboles ortodoxas durante un largo plazo bajo las condiciones propuestas por la FAO/IPGRI, i.e. un contenido de humedad entre 3 y 7% y -18°C (Food and Agriculture Organization/International Plant Genetics Resources Institute, 1994), se ha llevado a cabo por más de dos décadas en el Banco de semillas de los Reales Jardines Botánicos de Kew (Linington, 1994) y por aproximadamente 7 años en el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (Ng *et al.*, 1993). Por ejemplo, las semillas de *Rhus verniciflua* y *Acacia tortilis* almacenadas en el Banco de Semillas de Kew desde 1970 y 1974, respectivamente (Linington, 1994), mostraron 100% de germinación en pruebas recientes (Hong *et al.*, 1996).

Almacenamiento a largo plazo de semillas ortodoxas de árboles, también se ha logrado por criopreservación (o criopreservación) a temperaturas extremadamente bajas desde -80°C a -196°C, con nitrógeno líquido (Pence, 1991b; Stanwood, 1985; Touchell y Dixon, 1993; Wang *et al.*, 1993). Por ejemplo, no se reportó pérdida de viabilidad en *Pinus ponderosa*, *Pseudotsuga menziesii*, *Thuja plicata* y *Tsuga heterophylla* después de 3 años de criopreservación en nitrógeno líquido (Stanwood, 1985). Un primer paso esencial en criopreservación de semillas es la determinación de contenidos de humedad óptimos (seguros) para cada especie ortodoxa, especialmente aquéllas con semillas oleaginosas. Wang *et al.*, (1993) recopilaron información sobre la criopreservación de semillas ortodoxas de árboles; ésta sugiere que los contenidos de humedad entre 3.8 y 11% son seguros para cortos períodos de tiempo (de 4 días a 3 años). Sin embargo, se reportó una pérdida de viabilidad de aproximadamente 10% después de 14 días de almacenamiento en nitrógeno líquido a un contenido de humedad entre 6 y 8% para semillas de ciertas especies de árboles (Wang *et al.*, 1993). Una posible causa de problemas con el almacenamiento de semillas en nitrógeno líquido es el requerimiento de optimizar tanto la tasa de enfriamiento como la subsecuente tasa de calentamiento; éstas deben determinarse empíricamente (Meryman y Williams, 1981). Pretratamiento con crioprotectores a veces mejora la supervivencia de la semilla en nitrógeno líquido, pero en algunas circunstancias puede ser perjudicial (Touchell y Dixon, 1993). También se ha reportado daño mecánico a la semilla por inmersión directa en nitrógeno líquido causando pérdida de viabilidad para algunas especies (Pritchard *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1993). Finalmente, y a pesar de

existir afirmaciones sobre la longevidad infinita de semillas por criopreservación en nitrógeno líquido, no existe una firme evidencia de que reduciendo la temperatura del almacenamiento de semillas por debajo de -20°C resulten futuros beneficios significativos en cuanto a longevidad, por lo menos para semillas de árboles (Stanwood, 1985; Tompsett, 1986, 1994). Por ejemplo, Tompsett (1986) encontró longevidad similar para semillas de *Ulmus carpinifolia* almacenadas a -13°C y -75°C.

Para el mantenimiento de viabilidad durante un mediano plazo, esto es en un período de 2 a 10 años más o menos, el almacenamiento hermético en una amplia gama de ambientes contrastantes puede ser exitoso. Por ejemplo, con contenidos de humedad relativamente altos (en la escala de secado al aire) combinados con temperaturas frescas, de 8 a 10% en el contenido de humedad y 0 a 10°C para la mayoría de los árboles leguminosos (Albrecht, 1993), o contenidos de humedad bajos combinados con temperaturas relativamente cálidas, de un contenido de humedad de 3 a 7% y 10°C a temperatura ambiente. Barton (1961) reportó 33% de germinación para semillas de *Ulmus americana* L. después de 4 años de almacenamiento hermético a un contenido de humedad de 3% a temperatura ambiente. El almacenamiento ultraseco de semillas puede ser aplicable a semillas de árboles para almacenamiento a mediano plazo a temperatura ambiente. Por ejemplo, Joseph (1929) y Brinkman (1974a) recomendaron que las semillas de *Betula* spp. se almacenen a contenidos de humedad tan bajos como 0.6 a 1% a temperatura ambiente. Para consejo práctico sobre el almacenamiento de semillas de árboles a mediano plazo vea Gordon (1992).

Además del almacenamiento de secado al aire a través de una amplia gama de ambientes diferentes, el almacenamiento exitoso de semillas ortodoxas por un corto plazo, de unos meses a 1 ó 2 años, puede lograrse también por almacenamiento húmedo a temperaturas frescas. Este método se usa comúnmente para especies de árboles que presentan un estado latente fuerte, como aquéllas adaptadas a climas templados (latitudes templadas y altitudes altas de los trópicos) puesto que el preenfriamiento durante el almacenamiento puede erradicar la dormancia. Por ejemplo, varias especies ortodoxas de árboles de climas templados, como *Carya* spp., *Chionanthus virginicus*, *Euonymus* spp., *Hamamelis virginiana*, *Ilex* spp., *Juglans* spp., *Juniperus* spp., *Liriodendron tulipifera*, *Nyssa* spp., *Picea* spp. y *Taxus* spp. pueden almacenarse húmedas de 3 a 5°C (Schopmeyer, 1974). Asimismo, las semillas ortodoxas de varias especies que son nativas de altitudes altas en los trópicos y que muestran un considerable estado latente pueden también almacenarse húmedas de 3 a 5°C. Por

ejemplo, las semillas de *Prunus africana*, nativa de montañas altas entre 900 y 3,400 m en África (Albrecht, 1993), y *Michelia champaca* L. y *M. compressa*, nativas de montañas altas de Asia (Lin y Wu, 1995), pueden almacenarse húmedas a 4 °C por 1 año (Albrecht, 1993; Lin y Wu, 1995). Además, las semillas de algunos árboles forestales colonizadores que tienen un requisito absoluto de luz para germinar también pueden almacenarse húmedas sin luz a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo. Por ejemplo, las semillas de *Piper aequale* pueden mantenerse por 7 años completamente empapadas en oscuridad sin pérdida de viabilidad (Vázquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1996).

COMPORTAMIENTO DE SEMILLAS RECALCITRANTES EN ALMACENAMIENTO

Las semillas recalcitrantes no pueden secarse sin que se dañen (Roberts, 1973) por lo que su longevidad no responde al ambiente de secado en la forma descrita por la ecuación de viabilidad de la semilla (1). Cuando las semillas recalcitrantes recién cosechadas se secan, en principio la viabilidad se reduce ligeramente a medida que se va perdiendo humedad, pero posteriormente inicia una reducción considerablemente a cierto contenido de humedad, llamado “contenido de humedad crítico” (King y Roberts, 1979) o “mínimo contenido de humedad seguro” (Tompsett, 1984b). Si el secado continúa, la viabilidad se reduce eventualmente a cero.

Los contenidos de humedad críticos para la pérdida de viabilidad en la deshidratación varían fuertemente entre las especies recalcitrantes (Chin, 1988; King y Roberts, 1979), entre cultivos y lotes de semillas (Chin, 1988; King y Roberts, 1979), y dependiendo de la etapa de madurez de la semilla al momento de su recolección (Finch-Savage y Blake, 1994; Hong y Ellis, 1990). El contenido de humedad crítico también puede variar con el método de secado de la semilla (Farrant *et al.*, 1985; Pritchard, 1991; Pritchard y Prendergast, 1986). Los valores del “mínimo contenido de humedad seguro” varían entre los extremos de cerca del 23% para cacao (*Theobroma cacao*) (Mumford y Brett, 1982) a 61.5% para *Avicennia marina* (Farrant *et al.*, 1986). A pesar de esta variación, estos contenidos de humedad equivalen a una franja relativamente angosta de humedad relativas de 96 a 98%, o potenciales de agua de la semilla de aproximadamente -1.5 MPa a -5 MPa (Dickie *et al.*, 1991; Poulsen y Eriksen, 1992; Pritchard, 1991; Roberts y Ellis, 1989; Tompsett y Pritchard, 1993).

No hay un método satisfactorio para mantener la viabilidad de las semillas recalcitrantes a mediano y largo plazo. Estas semillas no pueden secarse y tampoco almacenarse a temperaturas bajo cero, dado que pueden morir por el daño causado por la formación del hielo. La longevidad de las semillas recalcitrantes es corta, desde semanas hasta unos cuantos meses para especies adaptadas a ambientes tropicales (King y Roberts, 1979) y hasta un poco más de 3 años para varias especies adaptadas a ambientes templados (Suszka y Tylkowski, 1981, 1982). Sin embargo, si los ambientes de almacenamiento óptimos son cuidadosamente determinados, la longevidad de varias semillas recalcitrantes tropicales puede extenderse a 3 años, al menos para especies de *Symphonia globulifera* (Corbineau y Côme, 1989).

El principio de almacenamiento húmedo exitoso para semillas recalcitrantes, es que las semillas deben mantenerse a contenidos de humedad cercanos a aquéllos contenidos a los que éstas se desprenden, con continuo acceso a oxígeno; estas circunstancias minimizan la degradación de la semilla puesto que los mecanismos de reparación pueden funcionar (Villiers, 1975). Bajo estas condiciones (alta humedad de la semilla y oxígeno disponible), sin embargo, las semillas tienden a germinar. Claramente, también es esencial que las condiciones deban impedir o al menos retardar la germinación. Por lo tanto es más fácil almacenar especies recalcitrantes con semillas latentes (ya sea estado latente primario o inducido) que las semillas no latentes bajo tales condiciones. Para semillas no latentes, como se presenta en la mayoría de las semillas de árboles tropicales en la madurez (King y Roberts, 1979), las bajas temperaturas pueden reducir la tasa de degradación y de germinación, siempre que permanezcan por encima del valor que resulta en daño por frío, o del valor más bajo en el cual se da la cristalización de hielo. Por ejemplo, daño por frío ocurre entre 5 y 10°C para *Shorea roxburghii*, entre 5 y 12°C para *Symphonia globulifera* y *Hopea odorata* Roxb. (Corbineau y Côme, 1988). Es necesario determinar la temperatura óptima de almacenamiento de semillas empapadas para cada especie recalcitrante. Un protocolo que se sugiere para determinar estos valores se ha descrito en otra parte (Hong y Ellis, 1996). La temperatura óptima parece ser aquella a la cual las semillas no latentes permanecen vivas pero no pueden germinar, esto es, la temperatura base para la germinación (Corbineau y Côme, 1988; Pritchard *et al.*, 1996). Por ejemplo, las temperaturas óptimas de almacenamiento determinadas de esta forma son de 10°C para *Shorea roxburghii*, de 12°C para *Mangifera indica* y de 15°C para *Hopea odorata* y *Symphonia globulifera* (Corbineau y Côme, 1988). Sin embargo, las semillas recalcitrantes de especies adaptadas a climas templados (incluyendo grandes

altitudes en los trópicos), demuestran un estado latente considerable que requiere largos períodos de pre-enfriamiento a temperaturas entre 2 y 5°C para superarlo. Mas aún, las semillas de muchas especies templadas con comportamiento de semillas recalcitrantes en almacenamiento, tienen la capacidad para germinar a temperaturas entre 2 y 5°C, y por lo tanto, el almacenamiento húmedo de tales semillas recalcitrantes a temperaturas entre 0 y 10°C puede resultar en germinación durante dicho almacenamiento. En tales casos, la germinación puede prevenirse mediante una mínima reducción del contenido de humedad de la semilla (aproximadamente un 5% por debajo del de las semillas frescas), o ya sea reduciendo la temperatura de almacenamiento por debajo de la temperatura óptima de pre-enfriamiento (0 a -3°C) (Suszka, 1978), o aumentándola hasta la temperatura base para la germinación de semillas latentes (Pritchard *et al.*, 1996). Por ejemplo, la viabilidad de las semillas de sicomoro (*Acer pseudoplatanus*) y *Quercus robur* puede mantenerse por 3 años a un contenido de humedad de 24 a 32% y de 40 a 45%, respectivamente, entre -1 y -3°C (Suszka 1978; Suszka y Tylkowsky, 1981; Tylkowsky, 1989) y para el castaño de indias (*Aesculus hippocastanum*) por 3 años si las semillas latentes húmedas se almacenan a 16°C, aunque en este caso se requiere un pre-enfriamiento subsiguiente para erradicar el estado de dormancia (Pritchard *et al.*, 1996).

En términos prácticos, las especies con semillas recalcitrantes, pueden por lo tanto, ser divididas en dos sub-categorías (Bonner, 1990; Hong y Ellis, 1996): aquéllas adaptadas a climas tropicales y las adaptadas a climas templados (latitudes templadas o grandes altitudes en los trópicos). Generalmente, la viabilidad de las semillas recalcitrantes puede mantenerse (si bien sólo para períodos limitados en condiciones aireadas) con contenidos de humedad justamente antes de que estén completamente empapadas, es decir, valores de 2 a 5% por debajo de aquéllos de semillas frescas, o en equilibrio con una humedad relativa de 98 a 99%, a temperaturas óptimas de almacenamiento que varían desde 7°C a 17°C entre especies adaptadas a climas tropicales, y entre -3°C y 5°C entre muchas de aquéllas adaptadas a climas templados (Hong *et al.*, 1996). Es difícil mantener semillas recalcitrantes completamente empapadas o sub empapadas con aireación continua, y al mismo tiempo impedir la germinación y contaminación por hongos. La aireación puede resultar en pérdida de humedad de la semilla, y la respiración puede rápidamente agotar el oxígeno. Por lo tanto, el medio de almacenamiento, es muy importante para semillas recalcitrantes. Este debe cumplir dos funciones: primero, mantener la humedad de la semilla constante a valores altos; segundo, permitir la

difusión de suficiente oxígeno a las semillas húmedas. Se ha reportado que el almacenamiento de semillas recalcitrantes húmedas en carbón húmedo, aserrín o arena húmeda por lo general es más eficiente que el almacenamiento en bolsas de polietileno. Se ha recomendado el almacenamiento con un contenido de humedad de cosecha o contenidos cercanos a éste en medios como aserrín (a un contenido de humedad de 16%) o perlita (a un contenido de humedad entre 0 y 4%) dentro de envases apropiados, como sacos o bolsas caladas, colocadas en un cuarto de alta humedad (Tompsett y Kemp, 1996). También se reportó que revestir las semillas recalcitrantes con alginato o alginato con ABA alarga la vida de las semillas por un factor de hasta 3 ó 4 (Pammenter *et al.*, 1997).

Se ha reportado que la crioconservación de embriones cigóticos ha sido exitosa para un número de especies de árboles que muestran comportamiento en almacenamiento de semillas ortodoxas, intermedias o recalcitrantes (Engelmann *et al.*, 1995b). Para una crioconservación exitosa, los embriones extirpados o ejes embrionarios deben sobrevivir a la deshidratación debajo del contenido de humedad mínimo congelable (Hor *et al.*, 1990) de aproximadamente 18 a 33% (ver Hong *et al.*, 1996), valor debajo del cual no hay agua congelable para la formación de hielo en temperaturas ultra bajas. Los embriones y ejes embrionarios de algunas especies recalcitrantes son capaces de sobrevivir a la deshidratación a contenidos de humedad más bajos que las semillas enteras (Chandel *et al.*, 1995; Chin, 1988; Finch-Savage, 1992a, Normah *et al.*, 1986). Por ejemplo, semillas frescas (contenido de humedad de 36%) de *Hevea brasiliensis* toleraron la deshidratación a un contenido de humedad de 20%, pero ninguna semilla sobrevivió a una posterior deshidratación a un contenido de humedad de 15% (Chin *et al.*, 1981). Sin embargo, después de la deshidratación a un contenido de humedad de 16 % seguido de 16 horas de crioconservación en nitrógeno líquido, 87% y 69%, respectivamente, de los ejes embrionarios extirpados (contenido de humedad de 55%) sobrevivieron (Normah *et al.*, 1986). Lamentablemente, los embriones de muchas semillas recalcitrantes se dañan por la deshidratación antes que se reduzca el contenido de humedad de la semilla por debajo de esos valores a los cuales ya no ocurre cristalización de hielo, y así la crioconservación de embriones extirpados de estas especies terminan en muerte, ya sea por la formación de hielo para los embriones a contenidos de humedad por encima del contenido de humedad mínimo congelable, o por la deshidratación a contenidos de humedad por debajo de ese mínimo (Hor *et al.*, 1990).

El secado veloz (también denominado secado rápido) puede permitir que los embriones extirpados sobrevivan a la deshidratación a contenidos de humedad más bajos que aquéllos secados más lentamente dentro de semillas intactas (Finch-Savage, 1992a; Normah *et al.*, 1986; Pammenter *et al.*, 1991; Pritchard, 1991; Pritchard y Prendergast, 1986). Los embriones o los ejes embrionarios extirpados pueden secarse rápidamente en una vitrina de flujo laminar de aire a temperatura ambiente (Normah *et al.*, 1986) o bajo una corriente de aire comprimido a aproximadamente 9 litros min⁻¹ (Pammenter *et al.*, 1991). Después que el secado rápido de los ejes embrionarios extraídos de semillas maduras de *Landolphia kirkii* redujo el contenido de humedad de 67% a 23% en 30 minutos, 90% de los ejes embrionarios extirpados fueron capaces de germinar (Pammenter *et al.*, 1991). Secado rápido con gel de sílice o con una corriente de aire aséptico ha permitido que los ejes embrionarios extirpados sobrevivan a la deshidratación a un valor menor que el que se consigue por medio de secado al vacío (Fu *et al.*, 1993). La etapa de madurez de las semillas de las cuales se extirpan los embriones es un factor importante que influye sobre la supervivencia después de la deshidratación: los embriones extirpados de semillas maduras no solamente sobrevivieron la deshidratación a contenidos de humedad más bajos que los embriones inmaduros, sino que también sobrevivieron la subsecuente crioconservación en nitrógeno líquido (Chandel *et al.*, 1995; Engelmann *et al.*, 1995b). Congelación rápida puede permitir que los embriones desecados sobrevivan mejor la crioconservación en nitrógeno líquido (Berjak y Pammenter, 1997). En contraste, se ha reportado que congelación lenta con embriones inmaduros extirpados de cacao es más exitosa que congelación rápida (Pence, 1991a). El espécimen que va a ser congelado debe ser lo más pequeño posible, y un pretratamiento de los embriones con crioprotectores, como DMSO, prolina, sacarosa y glicerol (Assy-Bah y Engelmann, 1992; Dumet y Berjak, 1997; Pence, 1991a) son factores importantes que influyen sobre la supervivencia de los embriones extirpados (o ejes embrionarios) en nitrógeno líquido.

Los resultados reportados para *Aesculus* spp. (Pence, 1990; 1992), *Araucaria hunsteinii* (Pritchard y Prendergast, 1986), *Artocarpus heterophyllus* Lam. (citado por Engelmann *et al.*, 1995b), *Castanea sativa* (Pence, 1990, 1992), *Citrus hystrix* (Normah y Serimala, 1997), *Coffea liberica* (Hor *et al.*, 1993; Normah y Vengadasalam, 1992), *Cocos nucifera* (Assy-Bah y Engelmann, 1992; Chin *et al.*, 1989), *Dimocarpus longan* (Fu *et al.*, 1990, 1993), *Hevea brasiliensis* (Normah *et al.*, 1986), *Landolphia kirkii* (Vertucci *et al.*, 1991), *Quercus* spp. (González-Benito y Pérez-Ruiz, 1992; Jorgensen, 1990; Pence,

1990, 1992), *Trichilia dregeana* (Dumet y Berjak, 1997) y *Theobroma cacao* (Pence, 1991a) han demostrado el carácter factible de la crioconservación de los embriones extirpados o los ejes embrionarios de semillas recalcitrantes. Sin embargo, otros han reportado una falta de éxito utilizando las mismas especies. Por ejemplo, experimentos con embriones extirpados de *Artocarpus heterophyllus* (Dumet y Berjak, 1977), *Landolphia kirkii* (Dumet y Berjak, 1977), y *Quercus robur* (Poulsen, 1992; Chmielarz, 1997) encontraron que ninguna sobrevivió la crioconservación en nitrógeno líquido.

COMPORTAMIENTO DE SEMILLAS INTERMEDIAS EN ALMACENAMIENTO

A pesar de que el término “comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento” se introdujo solamente al principio de esta década, se aludió a esta tercera categoría de comportamiento de semillas en almacenamiento hace más de ocho décadas. Elliott (1912, citado por Baldwin, 1942) dividió las semillas de árboles de bosques templados en tres clases: (i) aquéllas que pueden secarse, (ii) aquéllas que pueden sobrevivir secado parcial y (iii) aquéllas que raramente pueden secarse por completo. Las clases primera y tercera son más o menos equivalentes al comportamiento de las semillas en almacenamiento, de las categorías ortodoxas y recalcitrantes, las cuales fueron definidas detalladamente por Roberts (1973), respectivamente; la segunda clase equivale al “comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento” definida por Ellis *et al.*, (1990a).

La definición del comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento se basa en la respuesta de la longevidad al ambiente de almacenamiento. En semillas que muestran comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento, la tendencia a aumentar la longevidad conforme baja el contenido de humedad de almacenamiento de la semilla (dentro de la escala de secado al aire) se invierte a un contenido de humedad relativamente alto, donde a contenidos de humedad más bajos la longevidad se reduce (Ellis *et al.*, 1990a, 1991a, 1991b, 1991c). Pero en tales especies, también se observa con frecuencia (pero no siempre) que las semillas pueden dañarse inmediatamente por deshidratación a contenidos de humedad relativamente bajos, aproximadamente un contenido de humedad de 7 a 12% dependiendo de la especie. Los contenidos de humedad críticos de las semillas intermedias por debajo de los cuales ocurre una pérdida en viabilidad más rápida durante almacenamiento hermético varían considerablemente

con la especie, grado de madurez y método de extracción de la semilla y/o manejo de post-recolección. En general, las semillas extraídas de frutos al momento de madurez toleran la deshidratación a contenidos de humedad en equilibrio con aproximadamente 40 a 50% de humedad relativa, esto es, un contenido de humedad de aproximadamente 10% para café arábica (*Coffea arabica*) (Ellis *et al.*, 1991a; Hong y Ellis, 1992a) y un contenido de humedad de 7% para *Citrus* spp. (Hong y Ellis, 1995). Una característica más de las semillas intermedias de origen tropical es el hecho que la longevidad de semillas secas (un contenido de humedad de 7 a 10%) se reduce con el descenso de la temperatura de almacenamiento por debajo de 10°C (Ellis *et al.*, 1990a, 1991a, 1991b, 1991c; Hong y Ellis, 1992a). En tales casos, entonces, hay un ambiente de almacenamiento de secado al aire óptimo para mantener la viabilidad de las semillas. En el café arábica éste es aproximadamente 10°C con un contenido de humedad de 10 a 11% (Hong y Ellis, 1992a).

Se sabe ahora que las semillas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) (Gaméné *et al.*, 1996; Hong y Ellis, 1998; Sacandé *et al.*, 1997a, 1997b), *Cinnamomum subavenium* (Lin, 1996), varias especies de *Citrus* (Hong y Ellis, 1995), *Coffea arabica* (Ellis *et al.*, 1990a, 1991a; Hong y Ellis, 1992a), café robusta (*Coffea canephora*) (Hong y Ellis, 1995), palma de aceite (*Elaeis guineensis*) (Ellis *et al.*, 1991c), *Khaya senegalensis* (Hong y Ellis, 1998), *Lindera megaphylla* (Lin, 1996), *Neolitsea parvigemma* (Lin, 1996) y *Swietenia macrophylla* (Hong y Ellis, 1998; Pukittayacamee *et al.*, 1995) muestran comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento. Entre aproximadamente 7,000 especies examinadas en un reciente estudio, se cree que aproximadamente 134 especies muestran comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento (Hong *et al.*, 1996). Muchas de estas especies son árboles de origen tropical, aunque algunas son herbáceas (Hong *et al.*, 1996). Por ejemplo, ese estudio sugiere que las siguientes especies de árboles importantes pueden mostrar comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento: *Acer macrophyllum*, *Afroparpus gracilior*, *Agathis macrophylla*, *Araucaria columnaris*, *A. nemorosa*, *A. rulei*, *A. scopulorum*, *Bertholettia excelsa*, *Bixa orellana*, *Chrysophyllum cainito*, *Dacrycarpus dacrydioides*, *Dipterocarpus alatus* Roxb. & G. Don, *D. intricatus*, *D. tuberculatus*, *Dipteryx odorata*, *Rhaphidophyllum hystrix* y *Virola surinamensis* (Hong *et al.*, 1996).

Desde el punto de vista de ambientes óptimos de almacenamiento de semillas de secado al aire libre, puede ser útil distinguir entre especies con comportamiento de semillas intermedias en

almacenamiento adaptadas a ambientes tropicales y aquéllas adaptadas a ambientes templados (incluyendo grandes altitudes en los trópicos). Por ejemplo, las semillas intermedias de origen tropical, como el café arábica (Bendana, 1962; Wellman y Toole, 1960) y papaya (*Carica papaya*) (Bass, 1975) pueden almacenarse a contenidos de humedad en equilibrio con una humedad relativa de 50% (un contenido de humedad de 9 a 10%) y 10°C por hasta 5 y 6 años respectivamente, sin pérdida de viabilidad. La viabilidad de semillas intermedias de origen templado también se mantiene bien a contenidos de humedad en equilibrio con una humedad relativa de aproximadamente 50%, pero a temperaturas frías de 5°C a -10°C. Por ejemplo, las semillas de *Corylus avellana* pueden almacenarse herméticamente a -5°C y con un contenido de humedad de 10 a 13% (Degeyter, 1987). Las especies que muestran comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento pueden almacenarse con éxito a mediano plazo, por lo cual, se han proporcionado y definido los ambientes óptimos, y deben ser mantenidos.

Al igual que las semillas ortodoxas, las semillas intermedias también pueden almacenarse húmedas a temperaturas frías si la germinación es prevenida o retardada. Por ejemplo, las semillas de café arábica (Van der Vossen, 1979) y té (*Camellia sinensis*) (Ammu y Watanabe, 1983) se almacenaron húmedas a 15°C y 1°C, respectivamente, por 2.5 y 6 años, respectivamente, con poca pérdida de viabilidad.

La situación con respecto a la crioconservación de semillas intermedias es un poco confusa. A pesar de informes sobre la muerte inmediata de semillas (enteras) de especies con comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento después de crioconservación en nitrógeno líquido, café arábica (Becwar *et al.*, 1983), *Corylus avellana* (Normah *et al.*, 1994), *C. cornuta* (Stanwood y Bass, 1981), palma de aceite (Grout *et al.*, 1983) y *Roystonea regia* (Kunth) O.F. Cook (Ellis *et al.*, 1991c), han habido varios informes sobre la supervivencia de semillas secas de especies con comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento después de inmersión en nitrógeno líquido, como en el caso de *Camellia sinensis* (Hu *et al.*, 1994), *Carica papaya* (Becwar *et al.*, 1983; Chin y Krisnapillay, 1989), *Citrus aurantifolia* y *C. halimii* (Normah y Serimala, 1997). Esto implica que puede ser posible mejorar las técnicas de crioconservación para hacerlas apropiadas para semillas intermedias.

Puesto que las semillas enteras de especies con comportamiento de semillas intermedias en almacenamiento toleran la deshidratación a un contenido de humedad relativamente bajo (7 a 10%), los embriones desecados pueden tener mayor

oportunidad de sobrevivir a la crioconservación en nitrógeno líquido que en el caso de semillas recalitrantes. Informes sobre crioconservación exitosa de embriones extirpados de *Azadirachta indica* (Dumet y Berjak, 1977), *Camellia sinensis* (Chandel *et al.*, 1995; Chaudhury *et al.*, 1990, 1991; Dumet y Berjak, 1977; Wesley-Smith *et al.*, 1992), *Citrus aurantifolia* y *C. halimii* (Normah y Serimala, 1997), *Coffea arabica* (Abdelnour *et al.*, 1992), *Corylus avellana* (González-Benito y Pérez, 1994; Normah *et al.*, 1994; Pence, 1990; Reed *et al.*, 1994), *Elaeis guineensis* (Engelmann *et al.*, 1995a, 1995b; Grout *et al.*, 1983), *Howea forsteriana* (Chin y Krishnapillay, 1989; Chin *et al.*, 1988), *Poncirus trifoliata* (Radhamani y Chandel, 1992) y *Veitchia merrilli* (Chin y Krishnapillay, 1989; Chin *et al.*, 1988) han demostrado la potencialidad para almacenamiento de semillas a largo plazo bajo tales condiciones.

TOLERANCIA A LA DESHIDRATACIÓN Y LONGEVIDAD POTENCIAL DE SEMILLAS EN DESARROLLO Y MADURACIÓN

La aplicación de la ecuación de viabilidad de la semilla (1) revela que la calidad inicial de la semilla (K_i) – longevidad potencial – juega un papel importante en asegurar buena supervivencia de la semilla en almacenamiento. A mayor valor de K_i , mayor será el período de viabilidad para un determinado ambiente de almacenamiento. Durante el desarrollo y la maduración de la semilla, el valor de la constante del lote de semilla K_i - potencial de longevidad de las semillas ortodoxas – aumenta notablemente. Actualmente hay buena evidencia en una amplia gama de especies de cultivo ortodoxas contrastantes, de que la longevidad potencial continúa aumentando durante el período posterior a la culminación del llenado de la semilla, a medida que ésta madura (Demir y Ellis, 1992, 1993; Ellis *et al.*, 1993; Ellis y Pieta Filho, 1992; Pieta Filho y Ellis, 1991a, 1991b; Sanhewe y Ellis, 1996; Zanakis *et al.*, 1994). También hay buena evidencia de la capacidad de semillas ortodoxas a tolerar la deshidratación a muy bajos contenidos de humedad, mejorando considerablemente durante últimas etapas de maduración de la semilla, además que mediante un estudio, se ha demostrado una fuerte asociación en las semillas en desarrollo y maduración entre la longevidad potencial (K_i) y la capacidad de las semillas de tolerar la deshidratación a contenidos de humedad muy bajos (Ellis y Hong, 1994).

Se ha reportado que la capacidad de las semillas a tolerar la deshidratación rápida forzada, se incrementa durante el desarrollo y la maduración de

semillas de árboles con comportamiento ortodoxo (Hong y Ellis, 1990, 1992b, 1997a), intermedio (Ellis *et al.*, 1991^a; Hong y Ellis, 1995), y recalitrantes (Finch-Savage, 1992a; Hong y Ellis, 1990; Tompsett y Pritchard, 1993). Las semillas ortodoxas de varias especies de cultivos, hierbas silvestres y árboles no pueden tolerar la deshidratación rápida forzada a contenidos de humedad bajos (4 a 5%) hasta un tiempo posterior a su madurez [definida como el final de la fase de llenado de la semilla (Ellis y Pieta Filho, 1992)], una vez que el secado de maduración ha reducido el contenido de humedad de la semilla en la planta progenitora, de manera substancial (Ellis y Hong, 1994; Fischer *et al.*, 1988; Hay y Probert, 1995; Hong y Ellis, 1990, 1992b, 1997a; Wechsberg *et al.*, 1993). La máxima tolerancia a la deshidratación rápida forzada ocurre un tiempo después de la madurez de la masa, probablemente en la dehiscencia natural (Hay y Probert, 1995; Hong y Ellis, 1990, 1992b, 1997a; Sanhewe y Ellis, 1996; Wechsberg *et al.*, 1993). Además, la deshidratación lenta de semillas inmaduras cosechadas antes de la madurez de la masa y mucho antes del secado de maduración ocurra naturalmente, permitiendo que sea adquirida la tolerancia a la deshidratación rápida (Dasgupta *et al.*, 1982; Hay y Probert, 1995; Hong y Ellis, 1997a; Kermodé y Bewley, 1985a; Sanhewe y Ellis, 1996). Por ejemplo, en el arce noruego (*Acer platanoides*), el secado rápido (reduciendo el contenido de humedad de 57.3% a 9% en 1 día, y a 5% en 4 días) de las semillas cosechadas en la madurez de la masa redujo la viabilidad de 100% a 61%, y de 38% a un contenido de humedad de 8.1% y 4.7%, respectivamente, mientras que para las semillas que se secaron primero lentamente por 32 días, período durante el cual el contenido de humedad se redujo de 57.3% a 29.9%, seguido de un secado rápido de 3.5% (en 4 días) dio como resultado un 93% de viabilidad (Hong y Ellis, 1997a). También se ha reportado que el secado lento de semillas o frutos cosechados antes de o en la madurez de la masa aumenta el vigor de las semillas y la longevidad potencial en varias especies silvestres y cultivadas (Hay y Probert, 1995; Sanhewe y Ellis, 1996; TeKrony y Egli, 1997).

Adicionalmente, la tolerancia a la deshidratación también disminuye cuando se someten inicialmente las semillas a condiciones bajo las cuales se inicia la germinación. Por ejemplo, el pre-enfriamiento, almacenamiento húmedo, pre-remojo, tratamiento de fermentación para la extracción de semillas y preparación de las semillas pueden reducir la tolerancia a la deshidratación, y por lo tanto, cambian el comportamiento en almacenamiento de las semillas (ver Hong *et al.*, 1996). De manera similar, las semillas que se producen en ambientes desfavorables pueden mostrar una tolerancia reducida a deshidratación a contenidos de humedad

bajos. Por ejemplo, las semillas de arroz japónica (*Oryza sativa* subsp. *japonica*) producidas en un ambiente cálido de 32/24°C (día/noche) mostraron de una manera consistente tolerancia más pobre a la deshidratación en cada etapa del secado en la maduración que aquéllas producidas en un ambiente más fresco de 28/20°C (Ellis y Hong, 1994).

Lo anterior indica que se debe tener mucho cuidado al recolectar, extraer y posteriormente manejar las semillas de árboles. También indica que se puede esperar mejoras adicionales en el éxito del almacenamiento de semillas de árboles, especialmente en los trópicos, si se presta más atención al momento oportuno para recolectar las semillas y a las prácticas de post-recolección.

PREDICCIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE SEMILLAS EN ALMACENAMIENTO

Los métodos así como su viabilidad, para el almacenamiento de las semillas, dependen del comportamiento que presentan ciertas especies en particular. Se ha sugerido en otra parte un protocolo simple, de dos etapas para determinar el comportamiento de semillas en almacenamiento (Hong y Ellis, 1996). Esta tarea es, sin embargo, considerable dado que hay aproximadamente 250,000 especies de plantas florales. Por lo tanto, estimar el comportamiento probable de semillas en almacenamiento sería útil y se han desarrollado varios métodos para hacer esto (Hong y Ellis, 1996, 1997b, 1998; Hong *et al.*, 1996). Ningún criterio por sí mismo puede proporcionar una estimación satisfactoria del comportamiento probable de semillas en almacenamiento, pero puede valer la pena combinar la información para por lo menos cuatro de los seis factores descritos más abajo (Hong y Ellis, 1996).

ECOLOGÍA DE LA PLANTA

Parece haber una asociación entre la ecología de la plantas y el comportamiento de semillas en almacenamiento (Roberts y King, 1980; Tompsett, 1987, 1992). A partir de la información del comportamiento de las semillas en almacenamiento obtenida de al menos 7,000 especies de 251 familias (Hong *et al.*, 1996), es evidente que las especies que muestran comportamiento de semillas recalcitrantes en almacenamiento no ocurren naturalmente en (se originan de) hábitats áridos, que son el desierto y la sabana. En tales ambientes, la mayoría de las especies de plantas muestran un comportamiento de semillas ortodoxas en almacenamiento, mientras que unas cuantas pueden mostrar un comportamiento de

semillas intermedias en almacenamiento. Sin embargo, es claro que no son posibles más generalizaciones. Especialmente, por ejemplo, al otro extremo ecológico, es bastante claro que no todas las especies nativas de hábitats húmedos, bosques lluviosos, bosques inundados o ambientes acuáticos, muestran comportamiento de semillas recalcitrantes en almacenamiento; las tres categorías de comportamiento de semillas en almacenamiento pueden encontrarse entre las especies nativas de tales ambientes húmedos.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El comportamiento de semillas ortodoxas en almacenamiento puede encontrarse en todas las especies dentro de unas cuantas familias (Chenopodiaceae, Combretaceae, Compositae, Labiatae, Solanaceae, Pinaceae), o en casi todas las especies en otras familias con sólo unas cuantas especies excepcionales (Leguminosae, Graminae, Cucurbitaceae, Cruciferae y Rosaceae). Sin embargo, la mayoría de las familias de plantas florales incluyendo especies de árboles tienen especies con dos (Anacardiaceae, Dipterocarpaceae, Euphorbiaceae, etc.) o tres diferentes categorías de comportamiento de semillas en almacenamiento (Meliaceae). Más aún, el comportamiento de semillas en almacenamiento puede diferir entre especies dentro de un mismo género (Hong y Ellis, 1995; Tompsett, 1983), o aún entre secciones (Hong y Ellis, 1997b).

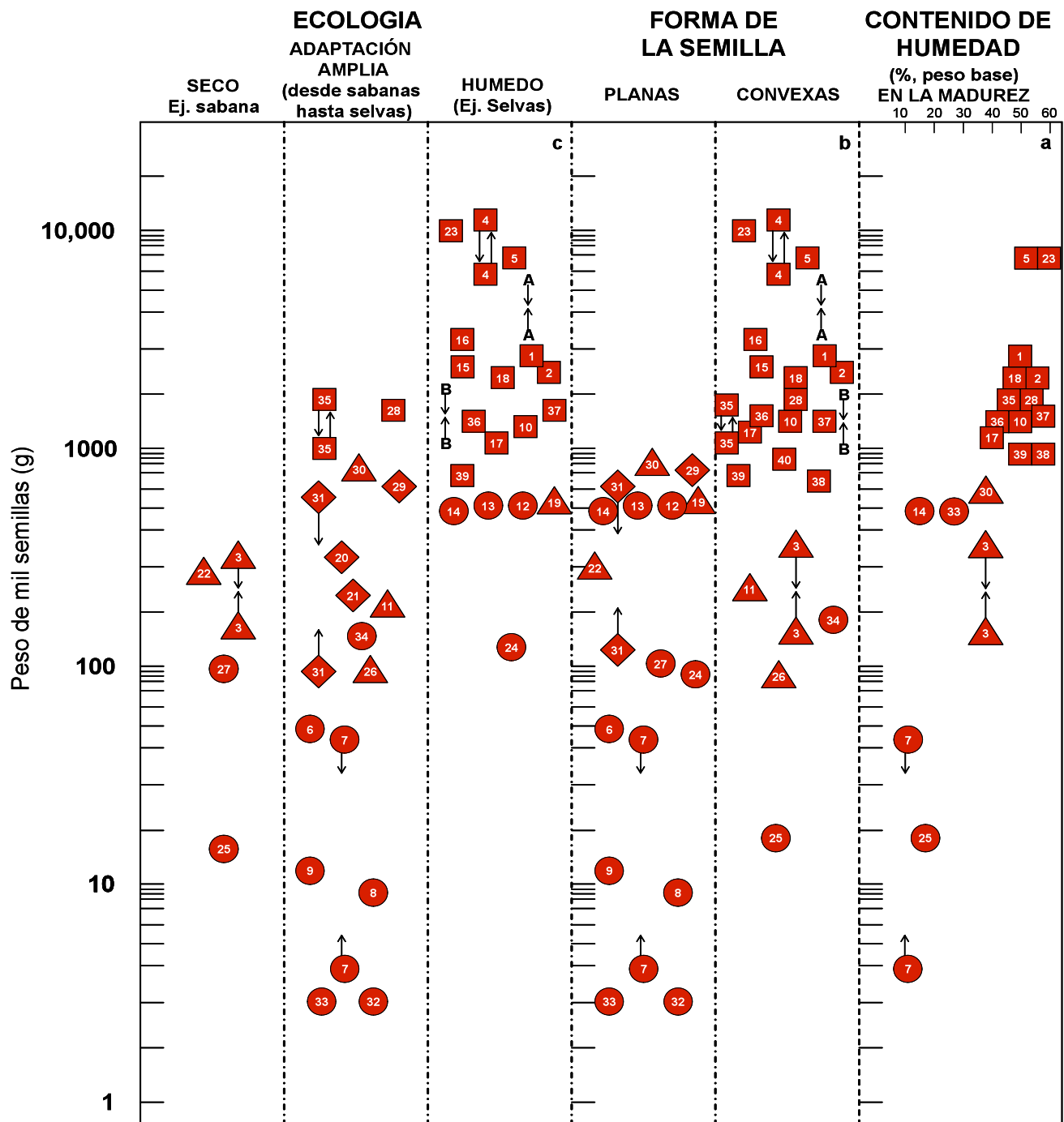


Fig. 1. Variación en el peso de mil semillas (escala logarítmica) con variación para el contenido de humedad de semilla en el momento de madurez o desprendimiento (a), o forma de la semilla (b), o ecología (c) y comportamiento de semillas en almacenamiento entre 40 especies de Meliaceae. El comportamiento de semillas en almacenamiento está clasificado como ortodoxo (○), intermedio o probablemente intermedio (△), recalcitrante o probablemente recalcitrante (◻), o indeterminado pero no recalcitrante (▽). Las posiciones A y B para *Amoora wallichii* y *Turraeanthus africanus*, respectivamente, en ambas especies cuyo comportamiento de semillas en almacenamiento es desconocido, han sido incluidas para probar la predicción del comportamiento de semillas en almacenamiento (ver texto). Clave para las especies: 1. *Aglaiia clarkii*; 2. *Azadirachta excelsa*; 3. *A. indica*; 4. *Carapa guianensis*; 5. *C. procera*; 6. *Cedrela mexicana*; 7. *C. odorata*; 8. *C. toona*; 9. *Chukrasia tabularis*; 10. *Dysoxylum cauliflorum*; 11. *Ekebergia senegalensis*; 12. *Entandrophragma angolense*; 13. *E. candollei*; 14. *E. utile*; 15. *Guarea cedrata*; 16. *G. sp.*; 17. *G. sp. nov. (G. glabra)*; 18. *G. thompsonii*; 19. *Khaya anothoteca*; 20. *K. grandifoliola*; 21. *K. ivorensis*; 22. *K. senegalensis*; 23. *Lansium domesticum*; 24. *Lovoa trichiloides*; 25. *Melia azedarach*; 26. *Pseudobersama mossambicensis*; 27. *Pseudocedrela kotschy*; 28. *Sandoricum koetjape*; 29. *Swietenia humilis*; 30. *S. macrophylla*; 31. *S. mahagoni*; 32. *Toona australis*; 33. *T. ciliata*; 34. *Trichilia americana*; 35. *T. emetica*; 36. *T. martineau*; 37. *T. megalantha*; 38. *T. monadelpha*; 39. *T. prieuriana*; 40. *T. tessmannii*. Tomado de Hong y Ellis, 1998.

CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA, FRUTO O SEMILLA

Ciertas generalizaciones parecen posibles acerca de las asociaciones entre las características de los frutos y semillas y el comportamiento de las semillas en almacenamiento (Hong *et al.*, 1996). Por ejemplo, el comportamiento de semillas ortodoxas en almacenamiento es mostrado por especies que producen aquenios, bayas con muchas semillas, cápsulas dehiscentes con muchas semillas, muchas vainas de semillas secas (pero no ariladas), muchos folículos con semillas secas, esquizocarpos y utrículos (Hong *et al.*, 1996). La mayoría de las especies que producen silicuas (una excepción) y cariópsides (tres excepciones conocidas) también producen semillas ortodoxas. Por otra parte, sin embargo, las tres categorías de comportamiento de semillas en almacenamiento pueden encontrarse entre las especies que producen una semilla o unas cuantas semillas grandes (de 1 a 10 semillas) por fruto, o muchas semillas ariladas por fruto, entre drupas, vainas, cápsulas, bayas y nueces.

TAMAÑO DE LA SEMILLA

Con frecuencia, las semillas recalcitrantes tienden a ser más grandes que las semillas intermedias, las cuales, a su vez, tienden (en promedio) a ser más grandes que las semillas ortodoxas. Sin embargo, hay una gama muy amplia de pesos o tamaños de semillas a través de la cual las semillas de diferentes especies muestran los tres tipos de comportamiento de semillas en almacenamiento (Hong y Ellis, 1996).

CONTENIDO DE HUMEDAD DE LA SEMILLA AL MOMENTO DE SU DESPRENDIMIENTO

Un estudio reciente muestra que los contenidos de humedad de las semillas al momento de madurez o desprendimiento para especies con comportamientos de semillas recalcitrantes, intermedias y ortodoxas en almacenamiento se traslapan considerablemente. No es posible ninguna generalización sobre el comportamiento de semillas en almacenamiento para las especies en las cuales las semillas al momento de madurez o desprendimiento tienen aproximadamente un contenido de humedad entre 25% y 55% (Hong y Ellis, 1996).

FORMA DE LA SEMILLA

Parece haber una leve asociación entre la forma de las semillas y el comportamiento de las semillas en almacenamiento. Por ejemplo, las semillas

recalcitrantes son con frecuencia esféricas u ovaladas (Chin, 1988). Las semillas que son delgadas y planas, formas que ayudan a la sequedad en la maduración natural, tienden a mostrar comportamiento de semillas ortodoxas en almacenamiento (Tompsett, 1994). Las semillas planas tienden a mostrar comportamiento de semillas ortodoxas en almacenamiento como en *Acer* spp. (Hong y Ellis, 1997b), aunque en las Meliaceae se muestran tanto un comportamiento ortodoxo e intermedio de las semillas en almacenamiento (Hong y Ellis, 1998). La forma esférica está presente en las tres categorías de comportamiento de semillas en almacenamiento (Hong y Ellis, 1997b, 1998).

Cada uno de los criterios individuales indicados arriba no son lo suficientemente confiables para ser muy útiles como indicadores de comportamiento probable de semillas en almacenamiento. Sin embargo, puede ser posible desarrollar un sistema de predicción con criterios múltiples para indicar el comportamiento probable de semillas en almacenamiento (Hong y Ellis, 1996). Por ejemplo, combinando la información sobre los cuatro criterios –peso de la semilla, contenido de humedad de la semilla al momento de desprendimiento, forma de la semilla y taxonomía (sección)- se puede formar la base de una guía para el comportamiento probable de semillas en almacenamiento entre *Acer* spp. (Hong y Ellis, 1997b). Asimismo, los cuatro criterios de peso de la semilla, contenido de humedad de la semilla en el momento de madurez, forma de la semilla y ecología de la planta pueden proporcionar una guía para calcular el comportamiento de semillas en almacenamiento en Meliaceae (Fig. 1). Por ejemplo, de las dos posiciones denominadas A en la figura 1 para un peso de semilla (Peso de Mil Semillas = 4,300 a 7,700g), ecología (bosque húmedo perennifolio de la India), forma de la semilla (convexa, arilo carnoso) de *Amoora wallichii* – información de Luna (1996) – se indica que esta especie probablemente mostrará un comportamiento de semilla recalcitrante en almacenamiento. Asimismo, de las dos posiciones denominadas B para el peso de semilla (Peso de Mil Semillas = 1,000 a 1,400g [FAO 1975]), forma de la semilla (convexa, arilo carnoso), y ecología (bosque lluvioso del Este de África) (Styles y White, 1991) de *Turraeanthus africanus*, indica que un comportamiento de semillas recalcitrantes en almacenamiento también es probable en esta especie. Además, la información disponible sobre el hábitat natural de las dos especies también puede usarse para indicar probables condiciones apropiadas de almacenamiento húmedo de semillas. Dado que el árbol *Amoora wallichii* se describe como “resistente a la helada” (Luna, 1996), y que *Turraeanthus africanus* crece a una altitud de 1,525 m (Styles y White, 1991), se indica que el daño ocasionado por

frío es improbable si las semillas de ambas especies se almacenan húmedas a aproximadamente 10°C.

Se propone que una investigación de semillas en colaboración con los científicos de todo el mundo puede producir claves más grandes, más precisas y de criterios múltiples para calcular el comportamiento de semillas en almacenamiento así como, ambientes apropiados para el almacenamiento de semillas. Se cree que el método resumido aquí es especialmente útil para el almacenamiento de semillas de árboles, y que tal colaboración es requerida urgentemente.