

COMUNICACIÓN

CONSIDERACIONES SOBRE SEMILLAS RECALCITRANTES

*Jorge A. Morera M.**

INTRODUCCION

El objetivo de esta breve reseña es discutir, de acuerdo a la literatura, algunos de los problemas concernientes a semillas recalcitrantes.

Probablemente la forma más económica y menos laboriosa de mantener germoplasma sea a través del almacenamiento de semillas. Roberts y Roberts (1972), señalan que bajo condiciones adecuadas, las semillas de muchas especies puede permanecer viables por más de cien años, pero condiciones adecuadas incluye, tanto técnicas óptimas de preparación de semillas así como un ambiente óptimo de almacenamiento. Aún así, las semillas de algunas especies no sobreviven por largos periodos bajo ningún régimen de almacenamiento conocido.

Hace 14 años Roberts (1973a) reconoció y separó dos clases de semillas de acuerdo a su comportamiento de almacenamiento. La gran mayoría de especies poseen semillas que pueden ser secadas a un contenido de humedad del 5% sin daño alguno y luego almacenadas a bajas temperaturas por largos periodos. Tales semillas han sido llamadas "ortodoxas"; es decir, la longevidad puede ser prolongada bajando el contenido de humedad y la temperatura (Roberts, 1981). En contraste, hay muchas otras semillas, especialmente semillas de mayor tamaño de especies tropicales, que no pueden ser secadas a un contenido de humedad entre 12% y 31% sin causar un daño inmediato. Esas semillas fueron llamadas "recalcitrantes"; las cuales deben almacenarse húmedas y en la actualidad no pueden conservarse por largos periodos (King y Roberts. 1979; Roberts 1981; Roberts-1983).

Tipos de semillas recalcitrantes

Las especies que producen semillas recalcitrantes parecen ser de dos tipos:

* Ph.D. Encargado del Programa de Mejoramiento Genético en Frutales Tropicales, Estación Experimental Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica.

- a) Especies de hábitos acuáticas Harrington 1972;
- b) Especies perennes Roberts 1973a.

En la segunda categoría existe un número considerable de cultivos tropicales tales como: *Hevea brasiliensis* (hule), *Theobroma cacao* (cacao), *Coccus nucifera* (coco), *Coffea* spp. (café), *Elaeis quinensis* (palma aceite), *Bixa orellana* (achice) Goldbach 1979a y probablemente muchas frutas tropicales: *Persea americana* (aguacate), *Mangifera indica* (mango), *Garcinia mangostana* (mangostán), *Durio zibethinus* (durián), *Nephelium lappaceum* (rambután), *Lansium domesticum* (langsát), *Citrus* spp., *Arthocarpus integrifolia* (fruta de pan), y *Melicoccus bijugatus* (mamón) Goldbach 1979b. Además, pueden ser incluidas varias especies maderables tropicales Roberts 1975. Generalmente, los métodos de propagación de estas especies se realizan vegetativamente, dado que la mayoría son de polinización cruzada y sólo así se puede conservar su "identidad genética"; excepto, en algunos casos se usan las semillas directamente para la producción de patrones.

Con las limitantes que presentan el almacenamiento de semillas recalcitrantes, se hace indispensable continuar estudios para formular alternativas que promuevan la conservación de éstos recursos genéticos en forma más eficiente y económica. Al respecto, la literatura indica que debido a la sensibilidad de las semillas recalcitrantes a la desecación, el almacenamiento a largo plazo no muestra posibilidad alguna.

Viabilidad de semillas versus contenido de humedad

González 1973 y Valio 1976, informaron que la viabilidad de las semillas de café (*Coffea arabica*), fue afectada por secamiento acelerado. Benda 1962 indicó que el secamiento severo de *Coffea arabica*, bajo el 8 o 9% de humedad fue detrimental. Sin embargo, un estudio reciente de Vossen 1979, indicó que la mayor parte de la pérdida en la viabilidad de las semillas fue asociado con un contenido de humedad entre 20 y 30%. Villers 1975 comparó la viabilidad de café después de cinco meses a 30 °C con semillas de lechuga (especie ortodoxa) a un 40% de humedad y concluyó que el patrón fue aproximadamente similar. Así, el porcentaje de viabilidad decreció conforme se aumentó el contenido de humedad. Además, la comparación con lechuga sugirió que *Coffea arabica* no es realmente recalcitrante.

Swarbrick 1965 indicó que las semillas de cacao perdieron rápidamente la viabilidad cuando se sometieron a un contenido de 38% de humedad. Hunter 1959 recomendó, que para una mayor seguridad en el almacenamiento, un contenido de 50% de humedad, y una temperatura moderada entre 18 y 30 °C como óptimo. Así, temperaturas bajo 15 °C se han informado como perjudiciales Boroughs; Hunter 1963. En otro estudio King y Roberts 1982 obtuvieron en semillas de cacao almacenadas a 40,6% de humedad y 98 % de humedad relativa controlada, sólo un 24% de sobrevivencia, después de ocho meses. Hor *et al.* 1984 mostraron que las semillas de cacao pierden su viabilidad rápidamente a un contenido de humedad

de 27% y temperatura de 17 °C. El ámbito para un mejor almacenamiento debe estar entre 33 y 35% de humedad y entre 17 y 30 °C de temperatura. Bajo esas condiciones se obtuvo un 67% de germinación a los setenta días.

Sonwalkar 1951 indica que las semillas más pesadas de fruta de pan, colocadas en bolsas de papel humedecida, presentaron mejor condición de almacenamiento que las semillas más livianas, y se mantuvo una alta viabilidad durante un mes

Las semillas de aguacate sobreviven muy pocos días después de que la semilla ha sido removida del fruto, aunque, ellas, pueden sobrevivir por varios meses, en turba húmeda o bolsas plásticas a baja temperatura Bergh 1975. Resultados similares fueron obtenidos por Spalding *et al.* 1976 quienes observaron que semillas almacenadas a 4 °C en bolsas plásticas selladas durante cinco meses conservaron el 100% de germinación.

Semillas de mangostán mostraron una prolongada longevidad cuando fueron almacenadas entre 2,1 y 29 °C en carbón vegetal humedecido. Y su viabilidad se mantuvo alta por aproximadamente dos meses.

Finalmente, cabe destacar que un buen número de semillas recalcitrantes tropicales también son susceptibles al frío. Según lo indica King y Roberts 1979 a todas las semillas de cacao, rambután y alcanfor expuestas a 10 °C se les afectó la germinación.

Germinación versus Secamiento

Las semillas de cítricos han sido temporalmente clasificadas como recalcitrantes, debido a que algunos informes indican que ellas son severamente afectadas por secamiento Button; Borman; Hackland 1971; Mumford; Panggabean 1982; Mungomery; Agnew; Prodonoff 1967; Soost; Cameron 1975. No obstante Soetisma; King; Roberts 1985, mencionaron que semillas de limón (*Citrus limon*), lima (*Citrus aurantifolia*), naranja dulce (*Citrus aurantium*) y otros cítricos presentan comportamiento ortodoxo. Esas contradictorias conclusiones, ocurren debido a que las semillas de cítricos cuando son sometidas a secamiento, necesitan más tiempo para su rehidratación y germinación, comparado con la mayoría de las semillas, y el decrecimiento en la germinación es provocado por la testa Mumford; Panggabean 1982. En limón y lima, por ejemplo, es probable incrementar el porcentaje de germinación realizando las pruebas a 30 °C, sin embargo, la prueba al menos necesita seis semanas para permitir a todas las semillas viables un tiempo suficiente para germinar Soetisma *et al.* 1985.

Actualmente, las evidencias indican que semillas de otras especies que inicialmente fueron afectadas por secamiento reaccionan en forma similar a las especies de cítricos. Tompsett 1984 informó que la longevidad de *Araucaria columnaris* se incrementó conforme la temperatura y humedad de almacenamiento fueron reducidas de 36 a 21°C y de 22 a 7%, respectivamente. Esto indica que las semillas de *Araucaria* son básicamente ortodoxas en su fisiología de almacenamiento, a pesar de la pérdida parcial en su capacidad de germinación, factor que puede ser ocasionado por desecación. Las semillas de hule también han sido clasificadas como recalcitrantes Roberts 1973a. Estas semillas presentan varios problemas en producción y almacenamiento Chin 1978. Así, Chin y Aziz 1981 informaron que semillas de hule, recién cosechadas a 36 % de humedad fueron secadas por diferentes métodos y algunas mantenidas húmedas por un periodo de noventa y seis horas. El ámbito crítica usado en contenido de humedad fue entre 15 y 20 % y en temperatura entre 22 y 23 °C. Además, les semillas se almacenaron a 45 °C, resultando en todos los casos un pérdida total de la viabilidad.

Cambios Genéticos

Adicionalmente a los cambios fisiológicos, también existen evidencias de daños en los cromosomas y mutaciones genéticas durante el almacenamiento Roberts 1978. Desde que la mayoría de las mutaciones son recesivas, la mayor parte de las anomalías genéticas no son manifestadas sino hasta en las siguientes generaciones, cuando las mutaciones han tenido la oportunidad de segregarse Roberts 1981. De esta manera, ha sido concluido, que en cualquier lote de semillas, los daños visibles en los cromosomas empiezan a ocurrir tan pronto como el porcentaje de viabilidad empieza a decrecer Abdalla; Roberts 1968. Esto tiene apreciables implicaciones para la conservación de recursos genéticos a largo plazo IBPGR 1976; Roberts 1975.

En la mayoría de los sistemas biológicos existe una alta correlación entre aberración cromosómica y mutaciones Roberts 1973b. También se ha informado Ellis; Roberts 1981 que existe una fase durante la cual hay muy poca pérdida en la viabilidad y aberración cromosómica. Ciertamente el fenómeno de acumulación de daños cromosómicos en el tiempo, no es característica de semillas, más bien, parece ser una característica de aquellos tejidos animales en los cuales las aberraciones no pueden ser removidas mediante selección diplóntica Curtis 1963.

Semillas recalcitrantes versus Comportamiento de almacenamiento

Las características de almacenamiento de semillas recalcitrantes son muy poco conocidas. Así, para que almacenamiento de semillas, sirva como una técnica apropiada para conservar germoplasma (especialmente semillas recalcitrantes) se requiere que este método conserve la viabilidad de las semillas por la menos durante el ciclo normal de la planta Roberts; King 1980. Todas las especies con semillas recalcitrantes son perennes, a menudo con fases de juvenilidad de considerable duración.

Las técnicas disponibles hoy día para el almacenamiento de semillas recalcitrantes, no presentan promesa alguna como un medio de conservación genética, desde que ninguna de los métodos asegura una viabilidad por más de seis meses King; Roberts 1980b. De esta manera, si el almacenamiento de semillas se intenta como un medio para conservar especies recalcitrantes, nuevos estudios deberán realizarse con el objeto de incrementar, los periodos de viabilidad. Sobre este aspecto, King y Roberts 1980a indicaran que entre los alcances más promisorios porían ser la adaptación de algunos métodos criogénicos' existentes, los cuales han sido utilizados exitosamente para la conservación de algunas células y tejidos.

Las semillas de tomate, de acuerdo a la clasificación son ortodoxas, pero cuando son sometidas a una condición de humedad ellas pueden, ser consideradas como un magnífico modelo de semillas recalcitrantes Growth 1980. Este autor estudió los efectos de grados de enfriamiento y el uso de varias concentraciones del crioprotector DMSO (dimetilsulfóxido); en semillas con diferentes contenidos de plántulas y humedad, las cuales fueron enfriadas a temperaturas del nitrógeno líquido. Con DMSO en una concentración del 15% encontró, que después de un rápido enfriamiento de -196°C y 33,4% de humedad, el 86% de las semillas fueron capaces de germinar. Con el experimento citado, no cabe duda que es posible hacer futuros progresos con las técnicas criogénicas, porque ellas en una u otra forma podrían facilitar la labor de conservación de recursos genéticos.

King y Roberts 1980b organizaron una lista detallada de los métodos de almacenamiento que han mostrado buenos resultados para varias semillas recalcitrantes. En general, los métodos más exitosos involucran tratamientos con semillas recién cosechadas son una breve exposición al agua caliente, fungicida, o ambos, con el objeto de inhibir la actividad de los microorganismos; luego las semillas deben mantenerse en un ambiente húmedo, creado en bolsas plásticas de polietileno, las cuales deben estar cerradas pero no selladas; con el propósito de permitir un buen intercambio de gases, lo cual es esencial para el mantenimiento de la viabilidad. En el banco de recursos genéticos (CATIE/GTZ) de Costa Rica, Goldbach (comunicación personal) recomienda, cuando se usan bolsas plásticas, incluir material inerte (carbón, aserrín, musgo) humedecido para ayudar a mantener las semillas con un alto contenido de humedad. Las, semillas también deben mantenerse en un ambiente frío, pero no demasiado como para causar daños perjudiciales en especies que son susceptibles.

Finalmente, uno de los problemas de almacenamiento de semillas en una condición húmeda es que ellas son propensas a germinar. Una forma práctica de controlar el potencial de agua para prevenir la ger-

minación podría ser el uso de los polietilenos. Sin embargo, usando ésta técnica no se mantiene la viabilidad por mucho tiempo King; Roberts 1982.

CONCLUSIONES

Hoy día, es claro que la conservación de semillas recalcitrantes con base en los métodos tradicionales de almacenamiento, no se vislumbra como una posibilidad práctica. El procedimiento tradicional de conservación ha sido el mantenimiento de germoplasma en colecciones vivas.

Esto no cabe duda, presenta facilidades para la propagación vegetativa, hibridización artificial, descripción, evaluación e intercambio ágil. Sin embargo, este método en términos económicos (tierra, mantenimiento, diseminación de pestes, etc.) representa un riesgo y un alto costo. Actualmente, muchas instituciones dedicadas a la conservación de recursos fitogenéticos están estudiando alternativas para reducir los costos de mantenimiento de colecciones. Así, un método efectivo de conservación sería de gran impacto y valor, aunque nunca deberá olvidarse que siempre serán necesarios árboles adultos de alta variabilidad genética para fines de mejoramiento.

Vale la pena aprovechar los métodos convencionales de corta plazo desarrollados, con semillas, recalcitrantes, para facilitar los problemas en colecciones de campo. Sin embargo, no son de uso práctico como método de conservación de germoplasma a largo plazo. Mucho más investigación sobre almacenamiento de semillas recalcitrantes será necesaria en el futuro. Esta con el objeto de aumentar la eficiencia en conservación de muchas especies perennes tropicales que hoy día se encuentran en vías de erosión genética.

LITERATURA CITADA

ABDALLA, F.H.; ROBERTS, E.H. 196B. Effects of temperature, moisture, and oxygen on the induction of chromosome damage in seeds of barley, broad beans and peas during storage. *Annals of botany* 32: 119-136.

BENDANA, F.E., 1962. The physiology of coffee seeds. 1 problems related to storage. *Coffee* 4: 73-75.

BERGH, B.O. 1975. Avocados. *In* advances in fruit breeding. Ed. by Janick, J. and Moore, J.N. West Lafayette, Purdue University. p. 541-567.

-
- BOROUGHES, H.; HUNTER, J.R. 1963. The effect of temperature on the germination of cocoa seeds. Proc. Amer. Soc. Hort. Sc. 82: 222-224.
- BUTTON, J.C.; BORNMAN, C.A.; HACKLAND, B.A. 1971. Effect of some pre-sowing treatments on the germination of *Poncirus trifoliata* and Troyer citrange seeds. Citrus Subtrop. Fruit J. 45: 9-11.
- CHIN, H.F. 1978. Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics: Seed problems. Acta Horticulturae 83: 17-21.
- CHIN, H. F.; HOR, H.L.; MOHD LASSIM, M.B. 1984. Identification of recalcitrant seeds. Seed. Sci. and Technol. 12: 429-436.
- CURTIS, H.J. 1963. Biological mechanisms underlying the ageing process., Science 14: 686-694.
- ELLIS, R.H.; ROBERTS, R.H. 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. Seed Sci. and Technol. 9: 373-409.
- GOLDBACH, H. 1979a. Germination and storage of *Bixa orellana* seeds. Seed Sci. and Technol. 7: 399-402.
- GOLDBACH, H. 1979b. Imbibed storage of *Melicocus bijugatus* and *Eugenia brasiliensis* (*E. dombevi*) seeds using abscissic acid as germination inhibitor. Seed. Sci. and Technol. 7: 403-406.
- GONZALEZ, J.A. .1973. Germinación de la semilla de *Coffea arabica* variedades Bourbon y Pacas almacenada en polietileno a distintas humedades. Boletín informativo, suppl. 28. Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café. Santa Tecla, El Salvador.
- GROUT, B.W. 1980. Low temperature storage of imbibed tomato seeds: a model for recalcitrant seed storage. Cryoletters 1(2): 71-76.
- HARRINGTON, J..F. 1972. Seed storage and longevity. In seed biology. Ed. by Kozlowski, T.T. Academic Press, New York and London. V. III.; p. 145-245.
- HOR, Y.L.; CHIN, H.F.; MOHD, Z..K. 1984. The effect of seed moisture and storage temperature on the storability of cocoa (*Theobroma cacao*) seeds. Seed Sci. and Technol. 12: 415-420.
- HUNTER, J.R. 1959. Germination in Theobromacacao. Turrialba, 3: 1-8.
- IBPGR. 1976. Report of IBPGR workinggroup on engineering, design and cost aspects of long-term seed storage facilities. Rome. IBPGR.
-

- KING, M.W.; ROBERTS, E.H. 1979. The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches. Rome. IBPGR.
- KING, M.W.; ROBERTS, E.H. 1980a. A strategy for future research into the storage of recalcitrant seeds. *In* recalcitrant crop seeds. Ed. by Chin, H.F. and Roberts, E.H. Kuala Lumpur: Tropical Press. p. 90-110.
- KING, M.W.; ROBERTS, E.H. 1980b. Maintenance of recalcitrant seeds in storage. *In* recalcitrant crop seeds. Ed. by Ching, H.F. and Roberts, E.H. Kuala Lumpur: Tropical Press. p. 53-89.
- KING, M.W.; ROBERTS, E.H. 1982. The inhibited storage of cocoa (*Theobroma cacao*) seeds. *Seed Sci. and Technol.* 10: 535-540.
- MUMFORD, P.M.; PANGGABEAN, G. 1982. A comparison of the effects of dry storage on seeds of *Citrus* species. *Seed Sci. and Technol.* 10: 257-266.
- MUNGOMERY, G.W.; AGNEW, J.I., PRODONORF, E.T. 1967. Maintenance of *Citrus* seed viability. *Qd. J. Agric. Animal Sci.* 23: 103-120.
- ROBERTS, E.H.; ROBERTS, D.L. 1972. Viability nomographs. *In* viability of seeds. Ed. by Roberts, E.H. London: Chapman and Hall. p. 417-423.
- ROBERTS, E.H. 1973a. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. and Technol.* 1: 499-514.
- ROBERTS, E.H. 1973b. Loss of seed viability chromosomal and genetic aspects. *Seed Sci. and Technol.* 1: 515-527.
- ROBERTS, E.H. 1975. Problems of long-term storage of seed and pollen for genetic resources conservation. *In* Crop genetic resources for today and tomorrow. Ed. by Frankel, O.H. and Hawkes, J.G. Cambridge: Cambridge University Press. p. 269-296.
- ROBERTS, E.H. 1976. Mutations during seed storage. *Acta Horticulturae* 83: 279-282.
- ROBERTS, E.H.; KING, M.W. 1980. The characteristics of recalcitrant seeds. *In* Recalcitrant crop seeds. Ed. by Chin, H.F. and Roberts, E.H. Kuala Lumpur: Tropical Press. p. 1-5.
- ROBERTS, E.H. 1981. Physiology of ageing and its application to drying and storage. *Seed Sci. and Technol.* 9: 359-372.
- ROBERTS, E.H. 1983. Loss of seed viability during storage. *In* advances in research and technology of seeds. Ed. by Thompson, J.R. Pudoc-Wageningen. v.8; pp. 9-34.
-

-
- SOETISMA, U.; KING, M.W.; ROBERTS, E.H. 1985. Germination test recommendations for estimating the viability of moist or dry seed of lemon (*Citrus limon*) and lime (*Citrus aurantifolia*). Seed. sci. and technol. 13: 67-110.
- SONWALKAR, M.S. 1951. A study of jackfruit seeds. Ind. J. Hort. Sci. 8: 27-30.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. 1975. Citrus. In advances in fruit breeding. Ed. by Janick, J. and Moore, J.N. West Lafayette, Purdue University. p. 507-540.
- SPALDING, D.H.; KNIGHT, R.J.; REEDER, W.F. 1976. Storage of avocado seeds. Proc. Fla. State Hort. Soc. 89: 257-258.
- SWARBRICK, J.T. 1965. Storage of cocoa seeds. Experimental Agriculture 1: 201-207.
- TOMPSETT, P.B. 1984. The effect of moisture content and temperature on the seed storage life of *Araucaria columnaris*. Seed Sci. and Technol. 12: 801-816.
- VALIO, I.F.M. 1976. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo). J. Exp. Bot. 27: 983-991.
- VILLERS, T.A. 1975. Genetic maintenance of seeds in imbibed storage. In Crop genetic resources for today and tomorrow. Ed. by Frankel, O.H. and Hawkes, J.G. Cambridge: Cambridge University Press. p. 297-316.
- VOSSSEN, VAN DER, H.A.M. 1979. Methods of preserving the viability of coffee seeds in storage. Seed Sci. and Technol. 7: 65-74.
-