

SEMILLAS ORTODOXAS Y RECALCITRANTES

PATRICIA BERJAK Y N. W. PAMMENTER
Unidad de Investigación de Biología Celular de Plantas
Facultad de Ciencias de la Vida
Universidad de Natal, Durban
4041 Sudáfrica

Las semillas de muchas especies no pueden clasificarse como ortodoxas, particularmente en el caso de semillas de árboles tropicales. Las opiniones presentadas aquí favorecen la concepción de que el comportamiento de las semillas se basa en una diversidad de características. El conjunto de mecanismos o procesos es analizado, como la incorporación de las propiedades consideradas actualmente y que promueven la adquisición de la tolerancia a la deshidratación, y aseguran la supervivencia de la condición de deshidratación en las semillas ortodoxas. Estos mecanismos incluyen: características físicas celulares e intracelulares; nula diferenciación celular; la “desactivación” del metabolismo; presencia y operación eficiente de los sistemas antioxidantes; acumulación y desemeño de moléculas protectoras, incluyendo proteínas embriogénicas tardías acumulantes y abundantes (LEA's), sacarosa y ciertos oligosacáridos; despliegue de moléculas anfipáticas; una capa efectiva periférica de oleosina alrededor de los cuerpos lipídicos; la ocurrencia y operación de mecanismos reconstructivos durante la rehidratación; y otros mecanismos por identificarse. La presencia de algunos de los procesos o mecanismos, su ausencia o manifestación parcial, es considerada en el contexto de las diversas respuestas a la deshidratación, mostradas por semillas no ortodoxas. Se considera especial

atención a los factores que determinan distintas variaciones en el comportamiento de semillas recalitrantes, de ciertas especies, bajo las mismas condiciones, con los efectos de la tasa de secado (velocidad de pérdida de agua de los tejidos de semillas sensibles a la deshidratación). Se distinguen dos diferentes factores a este respecto: (1) el daño que ocurre a bajos contenidos de humedad, cuando es removida el agua no congelable, que permite la estabilización de las estructuras intracelulares y macromoleculares, el cual, en sentido estricto, es un daño por deshidratación; y (2) el daño que ocurre durante una deshidratación lenta, cuando los desbalances metabólicos promueven la generación de daños químicos, es decir, radicales libres, lo cual es denominado daño metabólico. En estricto sentido, el daño por deshidratación se atribuye a la carencia o a la inadecuada operación de los procesos y/o mecanismos, que protegen las semillas tolerantes a la deshidratación en estado seco, mientras que el daño metabólico se considera en el contexto de las semillas no ortodoxas (especialmente aquellas que son verdaderamente recalitrantes), que no poseen la serie (o el conjunto de series) de mecanismos y/o procesos, que facilitan la obtención y el mantenimiento de la tolerancia a la deshidratación, que exhiben los tipos de semillas ortodoxas maduras y en proceso de maduración.

INTRODUCCIÓN

Las semillas ortodoxas (Roberts, 1973) adquieren tolerancia a la deshidratación durante su desarrollo y pueden almacenarse en estado seco, por períodos predecibles y bajo condiciones específicas. A no ser que estén debilitadas por hongos con tolerancia cero en almacenamiento, las semillas ortodoxas deben mantener un alto vigor y viabilidad, por lo menos desde la cosecha hasta la siguiente temporada de cultivo (Berjak *et al.*, 1989), o por varias décadas a una temperatura de -18°C (IBPGR, 1976). Por lo general, estas semillas pasan por un período de secado durante su maduración y se desprenden a un bajo contenido de humedad, el cual está en equilibrio con la humedad relativa (HR) prevaleciente. El equilibrio del contenido de agua a cualquier HR en particular, se determina por la composición de la semilla, pero todas las semillas ortodoxas pueden resistir la deshidratación a aproximadamente 5% ($0.053\text{g H}_2\text{Og}^{-1}$ material seco [g g^{-1}]), aun cuando el secado de maduración no se haya completado antes del desprendimiento. *Cualquier semilla que no se comporte de esta manera no es ortodoxa*, y, de hecho, las semillas de un gran número de especies tropicales pueden ser, por consiguiente, *no ortodoxas*. Desde hace mucho tiempo se han descrito a las semillas no ortodoxas, ya sea como *recalcitrantes* (Roberts, 1973) o *intermedias* (Ellis *et al.*, 1990a), acorde a su comportamiento de almacenamiento.

Las semillas recalcitrantes son aquéllas que pasan por un corto o ningún secado de maduración, y *permanecen sensibles a la deshidratación*, tanto en su desarrollo como después de su desprendimiento. Sin embargo, esta situación es mucho más compleja debido a la amplia gama de variabilidad entre las semillas recalcitrantes de diferentes especies y, ciertamente, de especies individuales bajo diferentes condiciones (Berjak y Pammenter, 1997). Tales semillas se desprenden hidratadas, aunque el contenido de agua puede estar, generalmente, en cualquier parte del rango de 0.43 a 4.0 g g^{-1} , que es de 30 a 80% en base de masa húmeda. El contenido de agua al momento del desprendimiento es una característica parcial de la especie, que depende del grado de deshidratación que ocurre de manera tardía durante el desarrollo de la semilla; esto ha sido sugerido como una correlación con el *grado de tolerancia a la deshidratación*, desarrollado por especies individuales (Finch-Savage, 1996).

Las semillas recalcitrantes no son igualmente sensibles a la deshidratación, de modo que los grados variables de deshidratación se toleran dependiendo de la especie. Esto implica que los

procesos o mecanismos (ver abajo) que confieren tolerancia a la deshidratación, son variables desarrolladas o expresadas en una condición no ortodoxa. Se ha sugerido la existencia de diversos mecanismos involucrados en la adquisición de la tolerancia a la deshidratación, y el mantenimiento de la integridad de las semillas ortodoxas deshidratadas, debiéndose reconocer que cualquiera de éstos puede estar ausente o presente, pero ineficaces en las semillas recalcitrantes. Otra consideración importante es que la tolerancia a la deshidratación es probablemente controlada por la *interacción* de mecanismos o procesos, y *no por alguno, actuando por separado*. Por lo tanto, la ausencia o expresión incompleta de cualquier factor que se considera que confiere tolerancia a la deshidratación, podría tener profundas consecuencias en la capacidad de las semillas de una determinada especie, de soportar un grado de deshidratación por debajo de un nivel particular de hidratación.

La sensibilidad diferencial a la deshidratación entre semillas recalcitrantes de diversas especies es claramente mostrada por sus diferentes respuestas cuando se les somete al mismo régimen de secado – aquéllas de algunas especies toleran solamente un ligero grado de deshidratación, aunque otras sobreviven a contenidos de agua mucho más bajos. También hay diferencias marcadas en las tasas con las que se perderá el agua de las semillas de diversas especies bajo las mismas condiciones de deshidratación (Farrant *et al.*, 1989). Además, otros factores influyen en las respuestas de post-cosecha de semillas recalcitrantes, es decir, el estado de desarrollo (Berjak y Pammenter, 1997; Berjak *et al.*, 1992; Berjak *et al.*, 1993; Finch-Savage, 1996; Finch-Savage y Blake, 1994) y la sensibilidad al enfriamiento (Berjak y Pammenter, 1997).

Por lo tanto, considerando solo la sensibilidad a la deshidratación, no implica que esta especie sea recalcitrante, sino más bien, *qué tan recalcitrante* es. Este hecho llevó a la propuesta de un comportamiento continuo de semillas recalcitrantes, de especies que son sumamente sensibles a la deshidratación – y probablemente también al enfriamiento - hasta aquéllas que toleran la desecación, a bajos contenidos de humedad, en proporción con el comportamiento de semillas recalcitrantes y que también tolerarán temperaturas relativamente bajas (Farrant *et al.*, 1988).

El concepto de continuidad del comportamiento de semillas post-cosecha (es decir, que depende de eventos de desarrollo antes del desprendimiento), se extiende más allá de la categoría de semillas recalcitrantes. Los grados de continuidad desde los tipos extremos sensibles a la deshidratación, hasta

aquellos tipos mínimamente recalcitrantes, a las especies de semillas intermedias que no responden adversamente a bajas temperaturas, hasta aquéllas que son sensibles al enfriamiento cuando son deshidratadas (Hong y Ellis, 1996), y finalmente a las semillas ortodoxas que tolerarán menos o más deshidratación extrema (Vertucci y Roos, 1990). También es posible que haya especies de semillas que se comporten de una manera que las caracteriza como las categorías definidas hasta aquí: recalcitrantes, intermedias y ortodoxas. La idea de una continuidad extendida de comportamiento de semillas desde la más tolerante a la deshidratación de las especies ortodoxas, hasta las especies recalcitrantes que son muy sensibles incluso a una ligera pérdida de agua, involucra muchas propiedades de semillas y sus respuestas (Berjak y Pammenter, 1994, 1997). Esto tiene su fundamento en una apreciación del estado fisiológico de semillas a diversos potenciales hídricos (Vertucci, 1993; Vertucci y Farrant, 1995; Vertucci y Roos, 1990), y las propiedades de agua a diversos niveles de hidratación correspondientes a rangos específicos de potencial hídrico (Vertucci, 1993; Vertucci y Farrant, 1995). Es más significativo de considerar las respuestas de la semilla a la deshidratación en términos de potencial hídrico que al contenido de humedad, aunque estas dos medidas pueden estar ligeramente correlacionadas (Vertucci y Farrant, 1995), utilizando para ello la terminología más familiar en cuanto al contenido de agua.

Según Vertucci y Farrant (1995): "Cambios discretos en la actividad metabólica con contenido de humedad, hipotéticamente están asociados con cambios discretos en las propiedades físicas del agua...Por lo tanto, hasta la pérdida de agua con ciertas propiedades, como función esencial proporcionada por esa agua ya no es posible. Un tejido que no es dañado al retirar cierto tipo de agua ha desarrollado mecanismos para tolerar o evitar ese estrés en particular". Mientras que la discusión posterior no depende de la apreciación del lector en cuanto a las diferencias en los tipos de agua intracelular, la base de los argumentos presentados es que la remoción secuencial de agua con propiedades específicas, podrá tener efectos dañinos particulares en los tejidos de las semillas que no poseen los mecanismos o procesos apropiados para contrarrestar ese daño. Sin embargo, nos concentraremos en los mecanismos o procesos en sí.

MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A LA DESHIDRATACIÓN

Es más conveniente considerar los procesos o mecanismos indicados en líneas posteriores, que podrían otorgar protección contra la deshidratación, y su deficiencia o ausencia, lo cual podría contribuir a los *grados relativos de sensibilidad a la deshidratación*.

- Características físicas intracelulares tales como
 - reducción del grado de vacuolización,
 - cantidad y naturaleza de reservas insolubles acumuladas,
 - integridad del citoesqueleto,
 - conformación del ADN, cromatina y arquitectura nuclear
- Desdiferenciación intracelular, que resulta efectivamente en la minimización de las áreas superficiales de membranas y probablemente también del citoesqueleto.
- "Apagado" del metabolismo.
- Presencia y operación eficiente de sistemas antioxidantes.
- Acumulación y función de las moléculas protectoras, incluyendo proteínas embriogénicas tardías acumulantes/abundantes (LEA's), sacarosa y ciertos oligosacáridos o ciclitoles de galactosil.
- Despliegue de ciertas moléculas anfipáticas.
- Una capa efectiva periférica de oleosina alrededor de los cuerpos lipídicos.
- La presencia y operación de mecanismos de reparación durante la rehidratación.

En la siguiente discusión se hacen comparaciones, hasta donde es posible, entre las semillas sensibles a la deshidratación y las ortodoxas, así como el estado de los procesos o mecanismos sugeridos que contribuyen a la tolerancia a la deshidratación. Aunque las interrelaciones entre ellos están lejos de ser resueltas, estos procesos o mecanismos son aquéllos que hasta la fecha, han sido implicados en la adquisición y mantenimiento de la tolerancia a la deshidratación. Sin embargo, es importante entender que las propiedades adicionales que contribuyen a la capacidad de las semillas de resistir una extrema deshidratación, probablemente pueda ser aclarada.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS INTRACELULARES

VACUOLIZACIÓN Y DEPÓSITO DE RESERVAS

En 1957, Iljin ya había identificado uno de los principales requerimientos de las células, del material de la planta tolerante a la deshidratación: la capacidad de resistir una tensión mecánica. La reducción del volumen de la vacuola, ya sea por la reducción del espacio ocupado por los organelos (generalmente llenos de líquido), o por llenarse de material de reserva insoluble, es uno de los mecanismos que pueden contribuir a una resistencia mecánica de las células a la deshidratación. Este aspecto fue examinado por Farrant *et al.* (1997) para (1) *Avicennia marina*, cuyas semillas altamente recalcitrantes pueden soportar muy poca deshidratación, ya sea antes o después de su desprendimiento; (2) *Aesculus hippocastanum*, una especie templada recalcitrante, cuyas semillas sobreviven al invierno en condición hidratada, durante el cual, se da una estratificación, necesaria para facilitar la germinación en la siguiente primavera; y (3) *Phaseolus vulgaris*, una típica semilla ortodoxa que alcanza un bajo contenido de agua antes del desprendimiento y es de larga vida en esta condición.

Las semillas de *Avicennia marina* no pierden agua durante su desarrollo, y son tan sensibles a la deshidratación antes del desprendimiento como después de la abscisión (Farrant *et al.*, 1992b). Estas semillas, en el mejor de los casos, son incapaces de sobrevivir a bajos contenidos de agua como de 0.5 g g⁻¹ (33% en base húmeda). Al final, las vacuolas ocupan en promedio casi 60% del volumen a través de las células de todos los tejidos del eje, y 90% de las células cotiledonares cuando están maduras. En ninguna etapa las vacuolas axiales o cotiledonares contienen reservas insolubles, y el poco material de reserva insoluble se presenta como almidón plástico. Las semillas de *A. hippocastanum* pasan de forma natural por un grado de deshidratación durante su desarrollo, acompañado de un incremento relativo de la tolerancia a la deshidratación (Tompsett y Pritchard, 1993). Las semillas maduras son más tolerantes a la deshidratación que aquéllas de *A. marina*, siendo capaces de soportar la deshidratación a contenidos de agua en el rango de 0.42 a 0.25 g g⁻¹ (30 a 20% en base húmeda). Finalmente, las vacuolas constituyen sólo una pequeña fracción del volumen intracelular, particularmente en las células del eje en la madurez. Las células cotiledonares contienen muchas plástidas grandes llenas de almidón y cuerpos proteícos y son

considerablemente menos vacuoladas que aquéllas de *A. marina*. En las semillas de *Phaseolus vulgaris*, que son ortodoxas y capaces de tolerar bajos contenidos de agua, el volumen vacuolar se reduce a una proporción insignificante en las células del eje, y las vacuolas en las células cotiledonares acumulan un material amorfo, presuntamente insoluble. El grado diferencial de vacuolización y el depósito de reservas insolubles entre las tres especies, tanto en semillas en desarrollo como maduras, es correlativo con el grado de sensibilidad a la deshidratación. Esto está de acuerdo con el concepto de que un alto grado de vacuolización puede conducir a un daño mecánico letal al momento de deshidratación (Farrant *et al.*, 1997).

REACCIÓN DEL CITOESQUELETO

El citoesqueleto, cuyos componentes principales son microtúbulos y microfilamentos, no es solamente un sistema integrado intracelular de soporte, sino que también juega un papel importante en imponer organización tanto en el citoplasma como el núcleo. Los microtúbulos consisten de α -tubulina polimerizada y los microfilamentos están compuestos de F-actina que es un polímero de G-actina. Se está investigando actualmente el estado de los microfilamentos de actina en ejes embrionarios hidratados y diversamente deshidratados de semillas de *Quercus robur*, una especie recalcitrante templada. En el estado hidratado, hay una red extensiva microfilamentosa en las células de la punta de la raíz, que se dismantela conforme las semillas son cada vez más deshidratadas – una característica que se espera también de las semillas ortodoxas. En tales semillas tolerantes a la deshidratación, la reorganización ordenada de los elementos del citoesqueleto acompaña la imbibición, pero una vez que el contenido de agua cae a bajos niveles dañinos en *Q. robur*, los microfilamentos no se reorganizan cuando las semillas son rehidratadas posteriormente (Mycock *et al.*, 2000). La carencia resultante del soporte intracelular y de organización estructural proporcionada por el citoesqueleto sería obviamente un fuerte factor dañino en la rehidratación de semillas recalcitrantes. Adicionalmente, ciertos sistemas de enzimas citomatricales (citoplasmáticas) existen como partículas de multienzimas en células de plantas (Hrazdina y Jensen, 1992), cuya formación podría ocurrir debido a la unión de enzimas claves o anclas a los microfilamentos del citoesqueleto, como es ilustrado por Masters (1984), para la glicólisis. Por lo tanto, una falla en la reorganización del citoesqueleto seguido de bajos niveles de deshidratación, tendría consecuencias tanto fisiológicas como estructurales en las células de tejidos de semillas sensibles a la deshidratación.

ADN, CROMATINA Y CONFORMACIÓN DE LA ARQUITECTURA NUCLEAR

El mantenimiento de la integridad del material genético ADN en la condición deshidratada en las semillas ortodoxas, y/o su rápida reparación cuando las semillas se rehidratan, es considerado como un requisito fundamental para la tolerancia a la deshidratación. Sin embargo, hay poca información donde basarse. El ADN asume diferentes estados conformacionales dependiendo de la actividad del agua y, aunque esto todavía no se ha demostrado para semillas, se considera que conforme se pierde agua (esto es, la actividad del agua disminuye) tales cambios conformacionales ocurrirán (Osborne y Boubriak, 1994). Acorde a la información analizada por estos autores, hay un aumento en el número de los pares de base por cada giro de la hélice del ADN conforme se pierde agua de los grupos fosfatos hidratados individualmente, y formándose más bien puentes de agua conforme cambia la conformación de forma B a la Z. Osborne y Boubriak (1994) han sugerido que la glicación de proteínas (esto es, la adición no-enzimática de azúcares reductores a proteínas histonas) probablemente ocurra, lo cual podría aumentar la incidencia de conformaciones del ADN apropiadas para el estado deshidratado. Estos autores también discuten la posibilidad de que ocurra la metilación no-enzimática de citosina, lo cual favorecería la forma Z del ADN.

Sin embargo, además de la necesidad postulada de cambios conformacionales en el ADN que ocurren conforme el material tolerante a la deshidratación se deshidrata, la estructura de la cromatina por sí misma también puede ser estabilizada. El estado altamente condensado de la cromatina en semillas secas ortodoxas (Crévecoeur *et al.*, 1976; Sargent *et al.*, 1981), que es invertido en la etapa de la germinación cuando sobreviene la sensibilidad a la deshidratación (Deltour, 1985) es una manifestación visible de su condición estabilizada. Un factor principal en la estabilización de cromatina en el estado seco de semillas ortodoxas podría ser el cambio en la proporción de histona H1: nucleosoma a 2:1 a partir de la proporción 1:1 que representa la condición hidratada (Ivanov y Zlatanova, 1989).

La arquitectura nuclear es otro factor que está probablemente involucrado en la estabilidad de la cromatina. Se ha demostrado convincentemente que el marco estructural del núcleo para células de plantas se basa en filamentos de tipo intermedio llamados "láminas" (Moreno Díaz de la Espina, 1995). Se sugiere que el nucleoesqueleto, organizado en la lámina (sosteniendo y conectada a la superficie interna de la envoltura nuclear) y la matriz (ramificándose por todo el núcleo) apoya y

localiza la cromatina en dominios discretos, imponiendo la organización topológica y la coordinación de procesos intranucleares (Moreno Díaz de la Espina, 1995). Está implícito que durante la deshidratación y en el estado de deshidratación de las semillas ortodoxas debería ocurrir la reorganización ordenada del nucleoesqueleto con su restitución como un marco funcional al momento de la rehidratación.

Dado que se sabe poco sobre los efectos de la deshidratación en el ADN, la cromatina y la arquitectura nuclear en semillas sensibles a la deshidratación, su estabilidad en el estado deshidratado debe ser claramente un requisito previo para la tolerancia a la deshidratación. El mantenimiento de la integridad del núcleo como un todo, y el genoma en particular, puede expresarse imperfectamente, o la capacidad para esto puede estar totalmente ausente, en semillas recalcitrantes (para una descripción más completa de algunos de estos aspectos, ver Leprince *et al.*, (1995) y Pammenter y Berjak (1999)). Lo que es igualmente probable es que los propios mecanismos de reparación del ADN son inadecuados para restituir el daño causado por deshidratación de semillas sensibles (ver a continuación).

DESDIFERENCIACIÓN INTRACELULAR

La desdiferenciación, es una característica de las semillas maduras tolerantes a la deshidratación, siendo esencialmente un medio por el cual las estructuras intracelulares se simplifican y minimizan (revisado por Vertucci y Farrant, 1995), lo cual indica enfáticamente que las membranas y los elementos citoesqueléticos son vulnerables a la deshidratación. Este fenómeno se invierte en las semillas ortodoxas cuando se absorbe el agua al principio de la germinación (Bewley, 1979; Dasgupta *et al.*, 1982; Galau *et al.*, 1991; Klein y Pollock, 1968; Long *et al.*, 1981).

Un análisis del estado cuantitativo y cualitativo de mitocondrias en las semillas de *Avicennia marina*, *Aesculus hippocastanum* y *Phaseolus vulgaris* mostró que la proporción del volumen de la célula ocupado por estos organelos fue mayor en *Avicennia marina*, que es muy sensible a la deshidratación, y substancialmente menor en *Aesculus hippocastanum*, lo cual es acorde con su característica natural de ser menos recalcitrante. En *Phaseolus vulgaris*, las mitocondrias ocuparon una proporción significativamente menor del volumen de la célula, aun antes del secado de maduración (Farrant *et al.*, 1997). Igualmente, las mitocondrias

ocuparon una proporción mucho mayor del volumen de la célula en los meristemas del eje de las dos especies recalcitrantes que en las especies ortodoxas, como en *P. vulgaris*. También hubieron marcadas diferencias en la complejidad estructural de las mitocondrias entre estas tres especies: *Avicennia marina* y *Aesculus hippocastanum* tenían cristas bien desarrolladas y una estructura que era típica por lo general de un tejido activo de planta hidratado; mientras que en *Phaseolus vulgaris*, las mitocondrias estaban casi completamente desdiferenciados aun a contenidos de agua en el tejido comparables a aquéllos de las especies recalcitrantes al momento del desprendimiento (Farrant *et al.*, 1997). Así parece que la retención de organelos en el estado altamente diferenciado es un factor principal en la sensibilidad a la deshidratación de especies recalcitrantes, mientras que la capacidad para una desdiferenciación ordenada es, de hecho, un requisito previo para la supervivencia de la semilla en estado deshidratado.

Ha habido por mucho tiempo incertidumbre en cuanto a si la deshidratación intracelular *causa* la desdiferenciación, o si esta minimización intracelular en efecto *precede* el comienzo de la sequedad en la maduración (Vertucci y Farrant, 1995). Sin embargo, las observaciones en *P. vulgaris* referidas por Farrant *et al.*, (1997), indicaron que la desdiferenciación mitocondrial ocurre, y que la velocidad respiratoria disminuye notablemente (ver también abajo) antes de la sequedad en la maduración, apoyan la idea que un cambio considerable cualitativo y cuantitativo en efecto ocurre antes de la pérdida de agua.

“APAGADO” DEL METABOLISMO

El transporte de electrones, aunque a un nivel bajo, ha sido registrado para los tejidos de plantas deshidratadas, y la respiración es medible aun a bajos contenidos de agua en la semilla como de 0.25 g g⁻¹ [20%, en base húmeda] (Vertucci, 1989; Vertucci y Farrant, 1995). Sin embargo, en la escala de contenido de agua de 0.45 a 0.25 g g⁻¹ (30 a 20 % [en base húmeda]), un metabolismo desbalanceado puede conducir a la generación, y esencialmente a una actividad descontrolada de radicales libres (Finch-Savage *et al.*, 1994a; Hendry, 1993; Hendry *et al.*, 1992; LePrince *et al.*, 1990b; Vertucci y Farrant, 1995). Por lo tanto, es imperativo que durante el secado de maduración, las semillas tolerantes a la deshidratación puedan pasar por esta escala de contenido de agua con un daño mínimo. La operación eficiente de sistemas antioxidantes (LePrince *et al.*, 1993; Puntarulo *et al.*, 1991), al igual que el “apagado” del metabolismo, reduciría tal daño. Rogerson y Matthews (1977) establecieron que una disminución aguda en sustratos respiratorios

precede, y probablemente provoca la caída en la tasa respiratoria, lo cual, indicaron, es un evento esencial que permite a la semilla ortodoxa resistir la pérdida rápida de agua. Las observaciones de Farrant *et al.*, (1997), indicaron que una baja en la tasa respiratoria ocurre mientras las mitocondrias se vuelven sustancialmente des-diferenciadas *antes* del secado de maduración, en las semillas ortodoxas de *P. vulgaris*, lo cual es apoyado con la información e indicaciones de Rogerson y Matthews (1977).

En semillas sensibles a la deshidratación, ocurre un daño letal en la escala del contenido de agua de 0.45 a 0.25 g g⁻¹ (Vertucci y Farrant, 1995) y, en algunas especies a niveles considerablemente más altos (Pammenter *et al.*, 1993). La muerte de semillas recalcitrantes relativamente hidratadas (a contenidos de 0.7 g g⁻¹, o mayores [40%, en base húmeda]) ocurre cuando el agua se pierde lentamente. Sin embargo, las tasas rápidas de deshidratación permiten la supervivencia a contenidos de agua más bajos (Farrant *et al.*, 1985). Esta observación conduce inicialmente al uso de secado al aire relativamente rápido, de ejes embrionarios extirpados para facilitar el criomacernamiento (Normah *et al.*, 1986; Pritchard y Prendergast, 1986) y después al desarrollo de una técnica de secado muy rápido (Berjak *et al.*, 1990), por el cual los ejes son deshidratados mucho más rápido.

Los ejes secados rápidamente no son tolerantes a la deshidratación; por el contrario, éstos no sobrevivirán más allá de uno a dos, bajo condiciones ambientales (Walters *et al.*, 2001), aunque puedan ser criomacernados de manera exitosa (Wesley-Smith *et al.*, 1992). La sensibilidad a la deshidratación del material recalcitrante es el resultado del hecho de que los ejes (semillas), son activamente metabólicos, y el éxito de una deshidratación muy rápida es que esto minimiza los efectos de este metabolismo. Este punto importante sobre la tasa de secado se discute a detalle más adelante.

El daño que ocurre junto con un metabolismo desequilibrado a estos contenidos de agua relativamente altos, no deben confundirse con el daño por deshidratación en un sentido estricto. Este último describe el daño que ocurre cuando el agua que se requiere para mantener la integridad de estructuras intracelulares es removida (Walters *et al.*, 2001). El daño por deshidratación en *sentido estricto* es la consecuencia de la remoción (algo, o un poco, dependiendo de la especie) de agua no congelable ligada a la estructura (Pammenter *et al.*, 1991; Walters *et al.*, 2001). El daño letal ocurre al perder esta agua, aun si el secado muy rápido ha mantenido viabilidad del eje a, o cerca de, este nivel de hidratación (Pammenter *et al.*, 1991).

Otro aspecto crítico del metabolismo actual es el ciclo celular. Este ciclo de la célula describe el contenido nuclear del ADN como 2C en células que no se están preparando para la división nuclear, y como 4C en células en las cuales ha ocurrido la replicación del ADN, donde la constante C, indica el contenido de ADN de la condición haploide. Durante el ciclo celular se pueden identificar cuatro fases distintas, a saber, la fase G₁ (2C), que es seguida por la fase S durante la cual ocurre la replicación del ADN; después de esto, las células entran en la fase G₂, durante la cual la cantidad de ADN permanece duplicada (esto es, 4C), como resultado de acontecimientos en la fase S, y a ésta le sigue la fase conocida como G₂M, cuando la mitosis reduce el contenido de ADN al nivel 2C, típico de células somáticas en la siguiente fase G₁. Brunori (1967) encontró que en las semillas ortodoxas de *Vicia faba*, la mayoría de las células se detuvieron en G₁ y que la replicación del ADN fue uno de los primeros acontecimientos que se acotaron al momento de perder agua las células del embrión. La replicación de la fase S sólo se reanuda después de varias horas de imbibición, cuando el agua nuevamente se vuelve disponible para las semillas ortodoxas de post-cosecha, como lo demuestran Sen y Osborne (1974) para *Secale cereale* (centeno): tan pronto como la replicación a valores de 4C ocurre y las células entran en G₂M, se pierde la tolerancia a la deshidratación.

En las semillas altamente recalcitrantes de *Avicennia marina*, se presenta una suspensión momentánea en la reproducción del ADN en los primordios radicales (meristemos) que dura no más de 24 horas cercano a su desprendimiento. Este es el momento cuando las semillas (aunque sumamente sensibles a la deshidratación) son *relativamente* más tolerantes a la pérdida de agua y lo menos activas. El ciclo celular en proceso está asociado a una pronunciada sensibilidad del ADN a la deshidratación. Cuando solo de un 16 a 18% del agua total se pierde, del material de *A. marina*, existe una reducción de 70 a 80% en el núcleo lo cual incorporará timidina, y después de una pérdida de agua del 22%, el daño al ADN no podrá ser reparado aun y cuando exista disponibilidad de agua. Por lo tanto, los ciclos celulares en proceso es otra manifestación del hecho que el metabolismo no está "apagado", al menos en estas semillas altamente recalcitrantes, lo cual se considera ser un factor principal que explica su sensibilidad a la deshidratación. Sin embargo, en trabajos relacionados en *Acer pseudoplatanus* como especie recalcitrante de clima templado, se descubrió que el ciclo celular se suspendió, con más de 60% de las células en el estado 2C (Finch-Savage *et al.*, 1998). Sin embargo, las semillas de *Avicennia marina* están balanceadas para germinación inmediata, mientras que aquéllas de *Acer pseudoplatanus* están

en estado latente, necesitando estratificación en frío antes de germinar. Para las semillas de *Azadirachta indica*, cuyos registros muestran un comportamiento intermedio, el nivel 2C del ADN ha sido reportado que ocurre una exclusión virtual de 4C (Sacandé *et al.*, 1997). Estos resultados distintos sobre el estado del ciclo de las células en tres especies de semillas no ortodoxas sirven para realzar el hecho que diferentes factores pueden contribuir a la naturaleza, y diferentes grados, de la sensibilidad a deshidratación.

PRESENCIA Y OPERACIÓN EFICIENTE DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Una gama de procesos antioxidantes operan en semillas ortodoxas (Hendry, 1993; Leprince *et al.*, 1993), y el papel de tales procesos bajo condiciones de déficit de agua y tensión por la deshidratación en plantas ha sido analizado por McKersie (1991) y Smirnoff (1993). Como se discutió anteriormente, es especialmente en la escala de contenido de agua de 0.45 a 0.25 g g⁻¹ (30 a 20%, en base húmeda), que probablemente ocurren eventos metabólicos no regularizados que resultan en la primera ola de generación de radicales libres (Vertucci y Farrant, 1995). Esto implica que los sistemas antioxidantes (esto es, sistemas que capturan radicales libres) deben ser fuertemente efectivos durante el secado de maduración de semillas ortodoxas y nuevamente cuando las semillas absorben agua durante imbibición.

Reseñas del daño metabólico asociado con la deshidratación de semillas recalcitrantes realzan la idea que la generación de radicales libres puede bien ser un importante factor de daño (Berjak y Pammenter, 1997; Côme y Corbineau, 1996a, 1996b; Smith y Berjak, 1995), particularmente debido a que los mecanismos protectores parecen deteriorarse bajo condiciones de estrés hídrico (Senaratna y McKersie, 1986; Smith y Berjak, 1995). Se ha documentado que una rápida formación de radicales libres y disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes se presentan durante la deshidratación de las semillas de *Quercus robur* como especie recalcitrante de clima templado (Finch-Savage *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la peroxidación lipídica, que es una consecuencia principal de la generación no controlada de radicales libres, con la acumulación final de un radical libre estable en los ejes embrionarios acompaña la deshidratación de las semillas de tres especies recalcitrantes templadas – *Q. robur*, *Castanea sativa* y *Aesculus hippocastanum* (Finch-Savage *et al.*, 1994a) - y se ha indicado que la formación de radicales libres acompaña la pérdida de

viabilidad en las semillas de la especie tropical altamente recalcitrante *Shorea robusta* (Chaitanya y Naithani, 1994). Mientras que se ha demostrado que la formación de hidroperóxidos acompaña la deshidratación a una escala de temperaturas de las semillas recalcitrantes de *Zizania palustris*, se produjo significativamente más a 37°C que a 25°C, y pruebas de Tetrazolium revelaron que la viabilidad fue severamente afectada por la pérdida de agua a la temperatura más alta (Ntuli *et al.*, 1997)

De la evidencia analizada anteriormente, no hay duda que el daño atribuible a la generación no controlada de radicales libres ocurre durante la deshidratación en las semillas recalcitrantes de una gama de especies que muestra diferentes grados y manifestaciones de comportamiento no ortodoxo. Esto implica no solamente que los radicales libres se producen como consecuencia del estrés hídrico en estas semillas sensibles a la deshidratación, sino también que los sistemas antioxidantes son incapaces de controlarlos. Por lo tanto, estos factores juntos deben ser seriamente considerados como una de las causas principales de la sensibilidad a la deshidratación.

ACUMULACIÓN Y DESEMPEÑO DE MOLÉCULAS PUTATIVAMENTE PROTECTORAS

PROTEÍNAS EMBRIOGÉNICAS TARDÍAS ACUMULANTES/ABUNDANTES (PETA's)

PETA's (Galau *et al.*, 1986) incluyen una serie de proteínas hidrofílicas resistentes al calor asociadas con la adquisición de tolerancia a la deshidratación en semillas ortodoxas en desarrollo (Galau *et al.*, 1991, reseñado por Bewley y Oliver 1992; Kermodé, 1990; Ried y Walker-Simmons, 1993). Su síntesis parece estar asociada con niveles altos de ABA que alcanzan su máximo nivel durante las etapas más tardías del desarrollo de la semilla (Kermodé, 1990). Las características de PETA's y las condiciones bajo las cuales aparecen, han llevado a sugerir que funcionan como protectoras quizás estabilizando las estructuras subcelulares en la condición de deshidratación (Close *et al.*, 1989; Dure, 1993; Lane, 1991).

La posición de PETA's (o proteínas deshidrinas, como se les puede llamar) en las semillas no ortodoxas, parecen a primera vista ser anómalas, ya que algunas especies no expresan estas proteínas mientras que otras las expresan en extensiones variables. Las semillas de *Avicennia marina*, que son extremadamente sensibles a la deshidratación, parecen no expresar PETA's en lo absoluto (Farrant *et al.*,

1992a). En contraste, las semillas de *Zizania palustris* (arroz silvestre de Norteamérica) que son recalcitrantes (Vertucci *et al.*, 1994) pero muestran respuestas diferenciales a la deshidratación dependiendo de la temperatura (Kovach y Bradford, 1992a; Ntuli *et al.*, 1997), sí expresan este tipo de proteína (Bradford y Chandler, 1992; Still *et al.*, 1994). Se encontró que las proteínas deshidrinas se expresan en un rango de especies recalcitrantes de clima templado (Finch-Savage *et al.*, 1994b; Gee *et al.*, 1994), pero la ausencia de tales proteínas correlacionadas con niveles bajos de ABA caracterizan las semillas maduras recalcitrantes de 10 especies tropicales y zonas húmedas (Farrant *et al.*, 1996). Esos autores demostraron la presencia de proteínas deshidrinas en otras especies recalcitrantes templadas y tropicales (no de zonas húmedas), e indicaron que su ocurrencia puede estar relacionada con el hábitat, quizás también proporcionando protección contra el estrés por bajas temperaturas. En un estudio comparativo sobre semillas maduras de dos especies de árboles tropicales, ninguno de los cuales se presenta en zonas húmedas, se encontró que las proteínas del tipo deshidrinas estaban ausentes en *Trichilia dregeana*, mientras que se acumulaban en *Castanospermum australe* (Han *et al.*, 1997). Se encontró que las semillas inmaduras y las plántulas de estas dos especies difieren en términos de producción de tales proteínas como respuesta al estrés producido por deshidratación, aplicación de ABA, o exposición al frío, con *T. dregeana* no respondiendo por medio de la producción de estas proteínas putativamente protectoras (Han *et al.*, 1997).

Así, parece que la capacidad de expresar PETA's o proteínas del tipo deshidrinas no puede tomarse como una indicación que las semillas de una especie particular soportarán o no la deshidratación. Esto indica claramente que la tolerancia a la deshidratación debe ser el resultado de una interacción de más de uno (y probablemente muchos) mecanismos o procesos. Los detalles de esto, particularmente en lo concerniente a PETA's/deshidrinas, azúcares y varios tipos de estrés han sido analizados por Kermodé (1997). Sin embargo, la expresión variable de PETA's/deshidrinas en semillas recalcitrantes por especie puede, en asociación con la presencia o ausencia de otros factores, explicar el *grado* de comportamiento no ortodoxo demostrado bajo un conjunto particular de circunstancias.

SACAROSA, OLIGOSACÁRIDOS O CICLITOLES DE GALACTOSIL

Los posibles papeles de azúcares que no se reducen con relación a la tolerancia a deshidratación en semillas, han sido analizados extensamente (Berjak y Pammenter, 1997; Horbowicz y Obendorf, 1994; Obendorf, 1997; Vertucci y Farrant, 1995). La acumulación de azúcares no reductores particularmente de la serie rafinosa (Blackman *et al.*, 1992; Koster y Leopold, 1988; Leprince *et al.*, 1990a) y/o de ciclitoles de galactosil (Horbowicz y Obendorf, 1994; Obendorf, 1997) ha sido implicada en la adquisición y el mantenimiento del estado de deshidratación en las semillas ortodoxas, por lo general en dos principales formas. Estas son, en términos de la "Hipótesis de reemplazo del Agua" (Clegg, 1986; Crowe *et al.*, 1992) y vitrificación, también llamada formación del estado vítreo (Koster y Leopold, 1988; Leopold *et al.*, 1994; Williams y Leopold, 1989).

La maduración de semillas ortodoxas invariablemente parece estar acompañada por la acumulación de oligosacáridos no reductores que coincide con la reducción de monosacáridos, y el mantenimiento del estado de deshidratación se asocia con niveles altos de sacarosa y otros oligosacáridos. La evidencia para el reemplazo del agua asociada con la membrana (la Hipótesis de Reemplazo del Agua, esto es, el reemplazo del agua por sacarosa para mantener el espaciado del grupo principal de lípidos, previniendo con ello, la transformación al estado de gel) es ambigua, y un reciente estudio crítico cuestiona esta relevancia en el estado de deshidratación de semillas ortodoxas (Hoekstra *et al.*, 1997). Sin embargo, el papel de la sacarosa en la formación de cristales intracelulares (vitrificación) es más convincente. El estado metastable vítreo ocurre a *bajos contenidos de agua* en las semillas cuando la sacarosa y ciertos oligosacáridos, o ciclitoles de galactosil forman soluciones de alta viscosidad, amorfas y super saturadas (Obendorf, 1997). Se considera que la ocurrencia de cristales impone una estasis en la reactividad intracelular, protegiendo las macromoléculas contra la desnaturalización y posiblemente evitando o minimizando las transformaciones de la fase de gel líquido cristalino de la bicapa lipídica de las membranas (Leopold *et al.*, 1994).

Walters *et al.* (1997) han sugerido que una proporción importante de los azúcares puede estar estrechamente asociada con PETA's – estos complejos actúan para controlar y optimizar la velocidad de la pérdida de agua durante la deshidratación de semillas ortodoxas. Sin embargo,

puede denotarse que esto no debe obviar la participación de las PETA's o de los azúcares en el mantenimiento de la viabilidad de las semillas ortodoxas en un estado de deshidratación.

La formación de oligosacáridos intracelulares ocurren a expensas de los monosacáridos, y confiere la ventaja de la disponibilidad inmediata de los substratos respiratorios al ser removidos (Koster y Leopold, 1988; Leprince *et al.*, 1992; Rogerson y Matthews, 1977). Esto serviría para reducir el espectro de reacciones dañinas que pueden ocurrir cuando las semillas ortodoxas pasan a través de rangos críticos de contenidos de agua, favoreciendo un metabolismo desequilibrado, durante el secado de la maduración (ver el "Apagado" del metabolismo, mencionado anteriormente).

Cualquiera de las funciones de la sacarosa y oligosacáridos, o ciclitoles de galactosil puede ser, en las semillas ortodoxas, *buscando semejanzas para semillas sensibles a la deshidratación es completamente inadecuado*. Mientras que la sacarosa y otros oligosacáridos se producen en algunas de las pocas especies de semillas recalcitrantes que han sido ensayadas (Farrant *et al.*, 1993; Finch-Savage y Blake, 1994), la formación de cristales ocurrirá solamente a contenidos de agua *muy por debajo* del límite letal. Cuando las semillas recalcitrantes se deshidratan bajo condiciones ambientales (que es lo que ocurriría en el habitat natural), pierden viabilidad a contenidos de agua relativamente altos – alrededor de 0.7 g (o más) de agua por g de masa seca [40%, en base húmeda] (Pammenter *et al.*, 1991), que son *mucho más* altos que aquéllos que se requieren para que la formación de cristales ocurra (Bruni y Leopold, 1992; Leopold *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1994; Williams y Leopold, 1989). El mismo razonamiento es válido si el reemplazo del agua por azúcares es un fenómeno operativo en las semillas ortodoxas; esto también ocurriría solamente a contenidos de agua de 0.3 g por g de material seco (Hoekstra y Van Roekel, 1988), que está muy por debajo del límite letal para semillas recalcitrantes secándose lentamente.

El único papel de los azúcares en la sensibilidad variable de semillas recalcitrantes a la deshidratación puede ser por el mecanismo indicado por Walters *et al.* (1997) para semillas ortodoxas madurando, es decir, el efecto regulador del azúcar/ complejos PETA's en la tasa de deshidratación. Una variabilidad muy marcada ocurre en la velocidad a la que las semillas recalcitrantes de diferentes especies pierden agua bajo las mismas condiciones (Berjak y Pammenter, 1997; Farrant *et al.*, 1989) y es posible que la importancia de los azúcares y PETA's en embriones de semillas recalcitrantes de algunas

especies se encuentre en la modulación de la velocidad del secado por formación compleja. Walters *et al.* (1997) también han indicado que las proteínas PETA's en semillas templadas recalitrantes pueden jugar un papel importante en su supervivencia durante el invierno.

DESPLIEGUE DE CIERTAS MOLÉCULAS ANFIPÁTICAS

Se ha indicado que la división de moléculas anfipáticas endógenas en membranas al perder agua, puede ser un requisito previo para la tolerancia a la deshidratación (Golovina *et al.*, 1998). Esos autores han presentado evidencia del movimiento durante la deshidratación de ambas introducciones, giros de sondas apolares y moléculas anfipáticas endógenas introducidos en la bicapa de polen tolerante a la deshidratación. Este proceso, que se completó después de la deshidratación al contenido de agua relativamente alto de 0.6 g por g de masa seca (37% en base húmeda), se invirtió durante la rehidratación, cuando las moléculas anfipáticas se dividieron nuevamente a la citomatrix (citoplasma acuoso). Se ha sugerido que este movimiento inverso explica la pérdida momentánea que se observa invariablemente cuando el material tolerante a la deshidratación (polen y semillas) se empapa a partir del estado seco (Golovina *et al.*, 1998).

Esos autores han indicado que la división de moléculas anfipáticas en una bicapa sirve para mantener la integridad de membranas en el estado seco en organismos tolerantes a la deshidratación, bajando substancialmente el contenido de agua en el cual ocurre el cambio de fase de los lípidos de la membrana. Los cambios en membranas de la fase líquida cristalina a gel están bien documentados en respuesta a la deshidratación, pero la propiedad esencial para la tolerancia a la deshidratación es que éstos deben ser reversibles, restableciendo las membranas en una condición funcional al rehidratarse (Hoekstra *et al.*, 1992). Esto requiere que las proteínas integrales de la membrana retengan su posición en el estado de deshidratación, un papel que también puede atribuirse a las moléculas anfipáticas.

Si la división de las moléculas anfipáticas en membranas se establece como un fenómeno universal que ocurre durante la deshidratación de semillas ortodoxas, es posible que estén ausentes o presentes, incompletamente funcionales o no funcionales en semillas sensibles a la deshidratación. Se encontró que la deshidratación de los embriones de las semillas recalitrantes de *Camellia sinensis* inducen un cambio de fase en los lípidos de la

membrana, que era reversible, pero las proteínas fueron afectadas irreversiblemente (Sowa *et al.*, 1991). Esto puede ser importante que a un contenido de agua de 0.6 g g^{-1} , cuando se ha observado que la división de las moléculas anfipáticas es completa (Golovina *et al.*, 1998), las semillas recalitrantes secadas lentamente, y aun los ejes de ciertas especies, habrán perdido viabilidad (Pammenter *et al.*, 1991, 1993; ver a continuación). En semillas recalitrantes altamente sensibles a la deshidratación, es posible que los cambios de fase de las bicapas de la membrana puedan no ser reversibles, por ejemplo, si resultan estructuras no bicapas o fases hexagonales (revisado por Vertucci y Farrant, 1995). Es improbable que la división de las moléculas anfipáticas endógenas en la bicapa al deshidratarse actúe aisladamente; así, aun si tales moléculas están presentes en células de semillas recalitrantes, podrían bien depender de otro mecanismo o proceso para obtener su migración reversible.

LA POSIBLE FUNCIÓN DE LAS OLEOSINAS

El término *oleosina* se refiere a un tipo único de proteína que rodea gotitas de lípido (aceite) en las células de plantas (Huang, 1992). Las oleosinas tienen un campo central hidrofóbico que interactúa con la periferia del lípido, y un campo anfipático N-terminal que, con el campo C-terminal facilita la interacción con la citomatrix acuosa. El borde de oleosina de cuerpos lipídicos permite que estas masas hidrofóbicas se acomoden como entidades separadas en la citomatrix acuosa bajo condiciones hidratadas, y se ha indicado que su papel durante la deshidratación evita que los cuerpos se junten en las semillas tolerantes a la deshidratación (Leprince *et al.*, 1997).

Leprince *et al.* (1997) indicaron una falta (o cantidad inadecuada) de oleosinas en semillas de algunas especies sensibles a la deshidratación, y aunque se observaron pequeños cambios evidentes en la integridad de los cuerpos como consecuencia de la deshidratación, la rehidratación parecía tener efectos nocivos en su estabilidad. La coalescencia de cuerpos lipídicos es una anomalía común que acompaña el deterioro, aun en células de semillas ortodoxas almacenadas (Smith y Berjak, 1995). Aunque los efectos de hongos asociados con semillas almacenadas tanto ortodoxas como recalitrantes, de causar la coalescencia de cuerpos lipídicos no puede descartarse, la ocurrencia de este fenómeno podría bien ser, al menos parcialmente, una consecuencia de alguna deficiencia en semillas sensibles a la deshidratación. En vista de los

hallazgos de Leprince *et al.* (1997), la deficiencia de una cubierta de oleosina adecuada alrededor de los cuerpos lipídicos puede ser la razón de la inestabilidad inherente de estos organelos durante la rehidratación, después de los niveles dañinos de deshidratación de algunas semillas recalcitrantes. Sin embargo, se debe recalcar que la presencia de oleosinas completamente funcionales no puede por sí misma, explicar la tolerancia a la deshidratación. Más bien, debe verse como uno de los mecanismos que contribuyen al espectro de propiedades necesarias si las semillas ortodoxas han de sobrevivir a la deshidratación extrema.

LA PRESENCIA Y OPERACIÓN DE MECANISMOS DE REPARACIÓN DURANTE LA REHIDRATACIÓN

Existen evidencias directas e indirectas que los mecanismos de reparación entran en juego cuando semillas secas ortodoxas son rehidratadas. Por ejemplo, las semillas que han sido almacenadas bajo condiciones adversas, pero con un 100% de viabilidad, comúnmente muestran un intervalo antes de que haya señales visibles de germinación, durante el cual es aceptado que se gestan los procesos de reparación. Estudios ultraestructurales de las semillas de maíz han proporcionado evidencia que sustenta este punto de vista, donde se observó la reparación mitocondrial durante el período de retraso (Berjak y Villiers, 1972). Estudios de semillas de centeno han demostrado que aun en estado seco existe un deterioro progresivo del ADN como resultado de la actividad endo y exonucleasa durante el almacenamiento (Elder *et al.*, 1987), que no puede ser reparado hasta que las semillas sean rehidratadas (Boudriak *et al.*, 1997).

Mucha de la evidencia para la operación de los procesos de reparación durante la rehidratación viene de los experimentos de osmoacondicionamiento de semillas de bajo vigor. Este proceso abarca la rehidratación controlada hasta el fin de la fase II, que alcanza un nivel de hidratación que facilita la reparación pero impide la germinación misma (Bray, 1995; Bray *et al.*, 1993). Esos autores han demostrado que el reemplazo del rARN dañado ocurre, y las lesiones en el ADN y los sistemas sintetizadores de proteínas se reparan, durante la preparación.

Por lo general se entiende que la generación de radicales libres (ver arriba) continúa en semillas ortodoxas secadas al aire durante su almacenamiento (reseñado por Smith y Berjak, 1995), y el daño resultante obviamente debe ser reparado en la rehidratación, indicando

enfáticamente la presencia y operación eficiente de sistemas antioxidantes en esta etapa. Sin embargo, durante la deshidratación de semillas y plántulas sensibles a la deshidratación, se ha demostrado que tales sistemas fallan (Hendry *et al.*, 1992; Leprince *et al.*, 1992) y se supone que permanecen ineficaces cuando se proporciona nuevamente agua (Côme y Corbineau, 1996a, 1996b).

Cuando las semillas recalcitrantes o ejes extirpados de tales semillas se someten a deshidratación no letal, se observa por lo general, que hay un aumento en el tiempo que toma el crecimiento progresivo de la germinación, lo cual puede interpretarse como que facilita la reparación. Sin embargo, es probable que esto sea estrictamente limitado; estudios actuales han demostrado que después que se pierde el 22% del contenido de agua de las puntas del hipocotilo de *Avicennia marina*, el daño al ADN asociado con la deshidratación ya no puede repararse cuando se provee agua nuevamente. La inestabilidad del ADN frente a la deshidratación también es demostrada por las plántulas producidas de semillas ortodoxas, cuando éstas han llegado a la etapa donde la tolerancia a la deshidratación se ha perdido (Boubriak *et al.*, 1997).

Muy pocos trabajos se han realizado que se centran en el tema de la posible reparación de semillas maduras recalcitrantes que han sufrido daño por deshidratación. Actualmente se supone tácitamente que los sistemas de reparación necesarios están presentes, pero que ellos mismos son dañados por la deshidratación más allá de ciertos límites, que pueden variar entre semillas de especies con una marcada sensibilidad a la deshidratación. Sin embargo, este aspecto requiere investigación considerable para obtener información tanto cualitativa como cuantitativa que permita clarificar esta situación.

TASA DE SECADO – UN FACTOR ESENCIAL PARA DETERMINAR EL GRADO DE DESHIDRATACIÓN QUE SERA TOLERADO

Se sabe que en la actualidad existe mucha confusión en trabajos comparativos sobre especies individuales de semillas recalcitrantes, debido a información incompatible respecto a “contenidos críticos de agua”, debajo de los cuales se pierde la viabilidad. Esto se debe a que se ha pasado por alto la magnitud del *tiempo* que se toma para que se pierda el agua, o la temperatura de secado a la que se hicieron los experimentos. Aunque no se discutirán ahora los efectos de la temperatura, hay varias

publicaciones que se concentran en las semillas de *Zizania* spp., que muestran que este parámetro puede tener efectos muy marcados en el resultado de regímenes de secado, y/o contenidos de agua óptimos para el almacenamiento (Kovach y Bradford, 1992b; Ntuli *et al.*, 1997; Vertucci *et al.*, 1994, 1995). El efecto del estado de madurez de las semillas – que con frecuencia es extremadamente difícil de determinar para los tipos recalcitrantes – también tiene efectos importantes en el grado de deshidratación que se tolerará (reseñado por Berjak y Pammenter, 1997; Finch-Savage, 1996), aunque tampoco se considerará más adelante.

El factor del *tiempo* que toma perder el agua es una variable que ha sido identificada como la que tiene efectos profundos en el grado de deshidratación que tolerará el material de la semilla que es sensible a la deshidratación. Cuanto más rápido se alcance la deshidratación, más bajo es el contenido de agua al cual las semillas o ejes pueden secarse, sin que haya acumulación de daño que culmine en la pérdida de viabilidad. Esto es particularmente marcado cuando se secan los ejes extirpados (Berjak *et al.*, 1993; Normah *et al.*, 1986; Pammenter *et al.*, 1991, 1993). El secado muy rápido de ejes recalcitrantes extirpados (secado inmediato) facilita una deshidratación que no es letal, a contenidos de agua alrededor de 0.4 a 0.25 g g⁻¹ dm, que es cerca del nivel de hidratación donde toda el agua no es congelable (por lo general asociada a la estructura), aunque la tolerancia a tales bajos contenidos de agua, invariablemente no es el caso (Pammenter *et al.*, 1993). Sin embargo se debe indicar que tal secado rápido *no* significa que los tejidos de las semillas serán potencialmente tolerantes a la deshidratación; más bien, cuanto más rápidamente se pueda alcanzar la deshidratación, menor es el tiempo durante el cual, los ejes se ubican en la escala del contenido de agua que permite que ocurran reacciones dañinas de base acuosa, potencialmente letales. Como se discute abajo, éstos son los procesos que, con suficiente tiempo, causarán la pérdida de viabilidad a relativamente altos contenidos de agua, cuando los tejidos han sido deshidratados lentamente (Berjak *et al.*, 1989, 1993; Pammenter *et al.*, 1998; Pritchard, 1991). En efecto, lejos de ser tolerantes a la deshidratación, los ejes de semillas recalcitrantes sobrevivirán solamente por períodos muy cortos (desde horas a uno o dos días), a los contenidos de agua más bajos alcanzables (Walters *et al.*, 2001).

Por lo general, es más difícil obtener los efectos marcados de la velocidad del secado en semillas enteras porque frecuentemente el tamaño de la semilla impide el lograr una deshidratación adecuadamente rápida. Sin embargo, no todas las

semillas recalcitrantes son demasiado grandes, o pierden agua muy lentamente, para facilitar el obtener muy diferentes tasas de secado. Se ha reconocido la capacidad para obtener bajos contenidos de agua mientras se conserva la viabilidad para las semillas de *Avicennia marina* (Farrant *et al.*, 1985) y *Quercus rubra* (Pritchard, 1991). Recientemente se han llevado a cabo estudios para averiguar los efectos de la velocidad del secado en semillas enteras de *Ekebergia capensis* (especie recalcitrante tropical meliácea), para las cuales pueden obtenerse tasas de secado marcadamente diferentes (Pammenter *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos ilustraron fuertemente los efectos de la tasa del secado: la pérdida de viabilidad fue aparente en semillas secadas lentamente a altos contenidos de agua en los ejes [1.25g de agua por g de material seco (55%, en base húmeda)] mientras que aquéllas que se deshidrataron rápidamente mostraron un vigor intacto y una completa germinabilidad a un contenido de agua del eje de 0.7 g g⁻¹ (40%, en base húmeda). Las semillas secadas a una tasa intermedia conservaron su viabilidad a un nivel intermedio del contenido de humedad del eje de 1.0 g g⁻¹ (50%, en base húmeda). Observaciones ultraestructurales indicaron que diferentes mecanismos dañinos causan daño intracelular, dependiendo de la velocidad del secado. La degradación avanzada de membranas, particularmente de los plástidos, y una anomalía en los cuerpos lipídicos ocurrieron en los ejes de semillas secadas lentamente, a contenidos de agua alrededor de 1.1 g g⁻¹ (52%, en base húmeda), cuando la viabilidad había disminuído a 37%. El daño empeoró continuamente con el secado lento a contenidos más bajos de agua, hasta que, a 0.6 g g⁻¹ (37%, en base húmeda) solo se mantuvieron fragmentos de componentes intracelulares. A un contenido de agua de 0.57 g g⁻¹ (36%, en base húmeda), los ejes de semillas secadas rápidamente (80% de viabilidad) mostraron pocas señas de daño intracelular; esto fue solo a contenidos de agua de los ejes considerablemente más bajos que se mostraron señas de deterioro, que coincidieron con una disminución de la viabilidad. En ninguna etapa ocurrió la extensa degradación que caracterizaba las células de los ejes de las semillas secadas lentamente, sustentando el argumento que si el material sensible a la deshidratación puede pasar lo suficientemente rápido a través de las escalas de contenidos de agua, en las cuales son frecuentes las reacciones letales, entonces es posible secar el material a niveles de hidratación mucho más bajos. (Ver Vertucci y Farrant, 1995 para una discusión sobre los diferentes niveles de hidratación).

Habrà un contenido de agua al cual el material *secado rápidamente* que es sensible a la

deshidratación sufrirá daño y, mientras que el valor varía de especie a especie, por lo general está cerca de la escala donde solamente queda agua asociada a la estructura (no congelable) (Pammenter *et al.*, 1991, 1993; Pritchard, 1991). El daño que ocurre a tales contenidos de agua relativamente bajos se define como daño por deshidratación en el sentido estricto (Pammenter *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 2001) y se indica que coincide con la alteración del agua no congelable (Pammenter *et al.*, 1991). En contraste, el material tolerante a la deshidratación puede soportar la remoción de una considerable proporción de esta agua (Pammenter *et al.*, 1991; Vertucci y Farrant, 1995).

El material sensible a la deshidratación con un *secado lento* sufre daño a contenidos de agua relativamente altos, ciertamente aquéllos donde el agua de solución (esto es, congelable) prevalece. Se sugiere que este daño resulta de reacciones de base acuosa degradativas que son el resultado de un metabolismo desbalanceado (Pammenter *et al.*, 2001; Walters *et al.*, 2001). Las semillas recalcitrantes (y probablemente todos los tipos no ortodoxos) son hidratados y metabólicamente activos cuando se desprenden (Berjak *et al.*, 1989; Berjak y Pammenter, 1997). Conforme se pierde el agua lentamente, el metabolismo continuará, pero cuando las semillas mantienen contenidos de humedad relativamente altos, el metabolismo se volverá desequilibrado o fuera de fase como resultado del estrés hídrico interno (Senaratna y McKersie, 1986; Smith y Berjak, 1995; Vertucci y Farrant, 1995). Una consecuencia probable de este metabolismo no regularizado será la generación de radicales libres y consecuentemente un daño por oxidación (Finch-Savage *et al.*, 1994a, Hendry, 1993; Hendry *et al.*, 1992; LePrince *et al.*, 1990b). Se predice que la gravedad de este tipo de daño, el cual ha sido denominado daño metabólico (Walters *et al.*, 2001) aumenta en proporción inversa a la velocidad del secado, ocurriendo una pérdida de viabilidad cuando el contenido de agua se incrementa rápidamente.

CONCLUSIONES

Se ha propuesto que el comportamiento de semillas no ortodoxas es una consecuencia de la carencia de alguno, o quizás todos, de la serie de mecanismos o procesos protectores que juntos otorgan a las semillas ortodoxas tolerancia a la deshidratación. Es probable que haya una gradación en presencia y/o eficacia de los procesos/mecanismos planteados entre las semillas de especies no ortodoxas, explicando la variabilidad de respuestas al estrés, especialmente los impuestos por deshidratación. Las semillas recalcitrantes más sensibles a la

deshidratación son probablemente aquéllas que carecen virtualmente, de todos los factores protectores y de reparación que facilitan la adquisición y el mantenimiento de la tolerancia a la deshidratación en semillas ortodoxas.

Se han sugerido dos principales factores que contribuyen a la pérdida de viabilidad de semillas recalcitrantes: (1) las consecuencias de un metabolismo desbalanceado durante la deshidratación [y posiblemente también cuando tales semillas se almacenan en la condición hidratada (Smith y Berjak, 1995)]; (2) el daño por deshidratación en el sentido estricto, que ocurre cuando se retira el agua que es esencial para la integridad de las estructuras intracelulares; en semillas recalcitrantes, esto se considera igual que el agua no congelable (Pammenter *et al.*, 1991).

Probablemente no podremos explicar satisfactoriamente el comportamiento de semillas no ortodoxas, especialmente aquél de semillas verdaderamente recalcitrantes, hasta que se obtenga un conocimiento completo de los factores aparentemente numerosos que interactúan, para hacer posible que se obtenga tolerancia a la deshidratación.

Será necesaria una fuerte colaboración en la investigación de especialistas en semillas de todo el mundo, lo cual pueda producir mayor información, más precisas, de criterios múltiples para calcular el comportamiento de semillas en almacenamiento y así, poder determinar ambientes apropiados para el almacenamiento de semillas. Creemos que el método resumido aquí es especialmente útil para el almacenamiento de semillas de árboles, y que tal reto de colaboración se requiere urgentemente.