



La tolerancia de las semillas a la desecación y su implicación en la conservación del germoplasma

The tolerance of seeds to drying and its implication for germplasm conservation

 **María de los Ángeles Torres Mederos***

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), calle 188 esq. 397, Santiago de la Vegas, Boyeros, La Habana, Cuba. CP10800

RESUMEN: Este trabajo resume investigaciones enfocadas a estudiar la tolerancia de las semillas a la desecación y las formas establecidas para preservarlas; así como las propiedades del estado sólido del citoplasma de las semillas tolerantes desecadas. También, incluye las características de las semillas sensibles a la desecación y el procedimiento general para su conservación a largo plazo. Se hace referencia, a partir de diferentes trabajos, al modelo conceptual que incorpora los efectos espacial y temporal de la pérdida de agua para explicar la compresión celular como origen del daño por desecación, y la protección que ejercen las reservas de materia seca a la estabilidad del citoplasma solidificado y la longevidad de las semillas.

Palabras clave: criopreservación, longevidad.

ABSTRACT: This paper summarizes researches focused to study seed desiccation tolerance and ways to preserve them. The investigations it contains are related to the properties of the solid state of the cytoplasm of dried tolerant seeds. Also, characteristics of desiccation sensitive seeds, and the general procedures for their long-term conservation are presented. Reference is made, considering different research papers, to the conceptual model that incorporates spatial and temporal effects of water loss to explain the cellular compression as damage origin, and the protection of dry matter reserves to the stability of solid cytoplasm and seed longevity.

Key words: cryopreservation, longevity.

INTRODUCCIÓN

Los Bancos de conservación de germoplasma tienen como función esencial el mantenimiento de la viabilidad de las semillas y reducir la frecuencia de la regeneración de la muestra original, con la consiguiente reducción de los costos y los riesgos de erosión genética (1).

Las semillas que toleran la desecación extrema y las bajas temperaturas, al parecer, pueden sobrevivir al menos 100 años, si se usan para su conservación las condiciones convencionales de un congelador (de -18 a -20 °C). Actualmente, existen en el mundo cerca de 1750 bancos de semillas que conservan cerca de seis millones de accesiones; sin embargo, no todas las plantas producen

semillas, o semillas que sobrevivan a las condiciones de la congelación (2).

La longevidad expresa la retención de la viabilidad y el vigor de un lote de semillas durante el almacenamiento (3,4), y diferentes laboratorios han aceptado como criterio para la evaluación de la longevidad el valor de P50, definido como el tiempo de almacenamiento en el cual la germinación de un lote decae al 50 % de su valor inicial (4,5).

El tiempo de supervivencia de las semillas (la longevidad) depende de las condiciones de almacenamiento, es decir, de la humedad relativa y la temperatura (6) y de las propiedades inherentes a las especies en comparación con las otras (5).

*Autor para correspondencia: genetica1@inifat.co.cu

Recibido: 01/04/2024

Aceptado: 15/04/2024

Conflicto de intereses: La autora declara no tener conflicto de intereses

Contribución de los autores: Conceptualización, Investigación, Metodología, Supervisión, Curación de datos, Escritura del borrador inicial y edición final- María de los Ángeles Torres Mederos

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



En este trabajo se presentan resultados obtenidos en las dos últimas décadas en relación con las características fundamentales de las semillas tolerantes y susceptibles a la desecación, y las estrategias que se han desarrollado para su conservación, por lo que puede ser utilizado como referencia por los especialistas que deseen actualizarse y profundizar en este tema.

DESARROLLO

Semillas tolerantes a la desecación (ortodoxas) de larga y corta vida

Las semillas tolerantes a la desecación se identifican como semillas ortodoxas (7) debido a que pueden almacenarse por períodos predecibles bajo condiciones controladas (8). Estas semillas pueden sobrevivir en estado seco por períodos de tiempo considerables y almacenarse exitosamente a bajos contenidos de agua y temperaturas por debajo de 0 °C (-18 a -20 °C) (9). Durante la maduración, las semillas tolerantes a la deshidratación experimentan un proceso de deshidratación natural, en el que pierden la mayor parte del agua de los tejidos hasta llegar a un equilibrio con la humedad relativa del medio circundante.

Los organismos secos se diferencian de los hidratados, ya que tienen el citoplasma celular solidificado en oposición al citoplasma fluido de los organismos hidratados (10). Para comprender la estabilidad del estado sólido de las semillas y su relación con la longevidad, se ha realizado una serie de estudios sobre la estabilidad de las sustancias sólidas.

Los sólidos cristalinos son estables termodinámicamente debido a que la aproximación muy estrecha entre las moléculas minimiza el área superficial, y éstas tienen pocos lugares a donde fluir. En contraste, los sólidos formados por el secado o por el enfriamiento, en los cuales las moléculas no están dispuestas de manera alineada, constituyen matrices porosas referidas como "sólidos amorfos" y la temperatura a la cual se forman (a partir de un fluido) se denomina temperatura de transición vítrea. Además, producto de que están alineadas irregularmente, las moléculas van a tener cierta movilidad (11); por ello, los poros no son estables desde el punto de vista termodinámico, y la estructura solidificada de la matriz porosa se relaja con el tiempo hacia un empaquetado más eficiente (12).

En el estado seco, los materiales biológicos tienen las características de los sólidos amorfos, ya que tienen considerables espacios porosos, al estar formados por grandes moléculas que no se comprimen bien; y por esta condición presentan fragilidad vítrea, lo que significa que cambian abruptamente de sólido a fluido, en un estrecho rango de temperaturas (10).

Durante el secado, el citoplasma embrionario de las semillas tolerantes a la desecación solidifica con las características de los sólidos amorfos, y a esa condición del citoplasma solidificado se le denomina estado vítreo o matriz vítrea.

Estudios realizados sobre la velocidad de relajación de los estados vítreos de las semillas han demostrado que en ellos existe considerable movilidad molecular, aún en condiciones criogénicas, y confirman la verificación práctica de que todos los sólidos mantienen algún movimiento molecular (12). Se ha señalado que la cinética del envejecimiento de las semillas está regulada por la tendencia al movimiento en la estructura molecular del citoplasma solidificado (11-13).

Con el objetivo de encontrar la relación entre la movilidad molecular y la actividad fisiológica de las semillas, se han realizado estudios con diferentes tipos de análisis; entre ellos, el análisis de mecánica dinámica (DMA, por sus siglas en inglés). Este análisis permite medir la relación entre una fuerza aplicada y la deformación estructural que se produce sobre el material que la recibe, de modo que permite detectar diferencias en la estabilidad estructural de los materiales (12); por lo cual, resulta una herramienta valiosa para cuantificar la estabilidad estructural y la movilidad molecular de los estados vítreos de las semillas (12,14).

El DMA se aplicó para estudiar los movimientos moleculares en los cotiledones secos de guisante (*Pisum sativum*) y demostró la existencia de movimientos intramoleculares de la matriz vítrea de los cotiledones, y que la naturaleza y la extensión de los mismos varían considerablemente con la humedad y la temperatura (11).

Investigaciones enfocadas a estudiar la longevidad de las semillas durante el almacenamiento han permitido encontrar diferencias entre las familias de plantas. Así, algunas familias, como las *Apiaceae* y *Brassicaceae*, se caracterizan por tener una vida corta durante la conservación, mientras que las semillas de las *Malvaceae* y *Chenopodiaceae* tienen larga vida, lo que dio origen a la hipótesis de que las especies individuales tienen un potencial característico de vida en el almacenamiento (5).

El DMA también se utilizó para estudiar los estados sólidos de los ejes embrionarios del guisante y la soya (*Glycine max*), especies de semillas de larga y corta vida en el almacenamiento, respectivamente. El análisis permitió determinar que en el estado sólido del citoplasma se producen movimientos moleculares vibratorios y de rotación; y que, a temperaturas entre 25 y 100 °C, en los ejes embrionarios ocurren movimientos moleculares difusivos que producen la transición del material del estado sólido al fluido (10). Al comparar las dos especies, se detectó que las matrices sólidas de los ejes embrionarios de la soya mostraron evidencias de alta presencia de movimientos difusivos y las propiedades de las matrices vítreas frágiles, sugiriendo que pueden ser propensas al envejecimiento; mientras que las estructuras dentro de los ejes del guisante mostraron menor movilidad (10). Los resultados de estos análisis son coherentes con las características de longevidad de estas especies, referidas anteriormente.

Conservación de las semillas tolerantes a la desecación

Las normas para los bancos de germoplasma establecen que las muestras originales y las duplicadas de seguridad se deben almacenar en condiciones a largo plazo (colecciones base) a temperaturas de $-18 \pm 3^\circ\text{C}$ y la humedad relativa del $15 \pm 3\%$. Para la conservación a mediano plazo (colecciones activas) las muestras se almacenan refrigeradas entre 5 y 10°C , con una humedad relativa del $15 \pm 3\%$ (1).

Se estima que las semillas ortodoxas secas, que sobreviven de 25 a 50 años en condiciones de refrigeración, pueden sobrevivir por un período de 100 a 200 años en un congelador (2). Por otra parte, se ha demostrado que la criopreservación prolonga la longevidad de las semillas desecadas en comparación con la conservación en los congeladores tradicionales (de -18 a -20°C) (15). Sin embargo, en la respuesta a la criopreservación juega un papel importante el grado de desecación de las semillas. Se han encontrado resultados en los que las semillas con un contenido de humedad entre 5-13 % no mostraron daños por las temperaturas ultrabajas, mientras que las que presentaban contenidos de humedad entre el 13-16 % sí manifestaron daños (16).

Semillas sensibles a la desecación, (recalcitrantes, excepcionales)

El término recalcitrante se originó para describir a las semillas cuya vida en el almacenamiento no se incrementaba de manera predecible por la reducción del contenido de agua y la temperatura ambiente (8), de manera que el término se convirtió en descriptivo para las semillas sensibles a la desecación y de limitada longevidad.

La condición de sensibilidad a la desecación se ha asociado a la ecología de los cultivos. Las especies que producen semillas sensibles están mayormente, aunque no exclusivamente, confinadas a los hábitats uniformes que favorecen la germinación de las semillas y el establecimiento de las plántulas (17). Se estima que los mecanismos de dispersión y la fisiología postcosecha han evolucionado para asegurar que la germinación ocurra cuando las condiciones sean favorables para el establecimiento de las plantas, antes de la pérdida de la viabilidad; lo cual puede explicar por qué las semillas recalcitrantes son menos comunes en los climas marcadamente estacionales que en los trópicos húmedos.

Las semillas sensibles no presentan la fase final del desarrollo de las semillas ortodoxas, no tienen o no expresan la información genética que permite el desarrollo de la tolerancia a la desecación. En el momento de la cosecha del fruto, están metabólicamente activas, hidratadas y no se pueden almacenar a temperaturas inferiores a 0°C . Las semillas sensibles a la desecación muestran considerable variabilidad entre las especies y dentro de las especies individuales respecto a la magnitud de la pérdida de agua que pueden tolerar (9).

Recientemente, las semillas sensibles a la desecación se han identificado como "semillas excepcionales", considerando que, en el contexto de los bancos de germoplasma y la criobiología, el término recalcitrante puede resultar confuso, ya que se aplica a las semillas con requerimientos complejos para la germinación que involucran períodos separados y repetitivos de humidificación a temperaturas alternantes para estimular el desarrollo del embrión rudimentario (2).

Para las especies leñosas se ha desarrollado un método para predecir la sensibilidad a la desecación que establece una relación matemática la cual considera la masa seca de la estructura de la cubierta de la semilla (endocarpo y testa) y la masa seca de la semilla total. Si el resultado de ese cálculo, denominado probabilidad de sensibilidad a la desecación (P), es mayor que 0,5; la especie parece ser sensible a la desecación (18-19).

Conservación de las semillas sensibles a la desecación

El único método posible para la conservación a largo plazo del germoplasma sensible a la desecación es la criopreservación (20), que consiste en el almacenamiento del material a la temperatura ultrabaja del nitrógeno líquido (-196°C). Para el éxito de la criopreservación es fundamental evitar la formación de hielo en el interior de las células, haciendo que el agua congelable, presente en las células, vitrifique y forme un sólido amorfo (no cristalino) de muy alta viscosidad (estado vítreo) (9), similar al estado sólido que adquiere de forma natural el citoplasma de las semillas tolerantes a la desecación.

En relación con el secado de las semillas sensibles, se ha encontrado que el material que se seca rápidamente (en el término desde minutos a pocas horas) puede sobrevivir (en corto plazo) a materiales con más bajo contenido de agua, pero que se secan lentamente. Ese efecto es más pronunciado a medida que el secado es más rápido, pero la mayoría de las semillas recalcitrantes son demasiado grandes para obtener las velocidades de secado requeridas. En estos casos, la escisión del embrión o el eje embrionario ofrece un explante de un tamaño que sí permite el secado rápido y los ejes embrionarios parcialmente deshidratados pueden generar plántulas (21).

Los embriones cigóticos y los ejes embrionarios pueden ser deshidratados mediante un secado rápido, colocando los explantes en una desecadora con sílica gel activada, por la cual se hace circular el aire mediante un ventilador computarizado; no obstante, es necesario tener en cuenta que la velocidad del secado presenta diferencias entre los explantes de las distintas especies, los lotes de semillas y entre los tejidos que constituyen los embriones individuales (22).

En un estudio de los embriones de cuatro especies de semillas recalcitrantes, se determinó que su morfología y la anatomía determinan las características del secado de los diferentes tejidos que componen el explante, y de ahí la supervivencia a la criopreservación; de modo

que la intensidad del secado y su duración también interactúan con la morfología y el tamaño del embrión (o el eje embrionario), para producir (o impedir) su supervivencia (22).

Los embriones o ejes embrionarios de las semillas sensibles también requieren que el enfriamiento se produzca de manera muy rápida, debido a que en el rango de temperaturas justo por debajo de 0 °C hasta los -80 °C es posible la formación y crecimiento de cristales de hielo (en las células no suficientemente deshidratadas). Por esta razón, la mayoría de los protocolos de criopreservación de tejidos multicelulares complejos incluyen velocidades de enfriamiento y de retorno a la temperatura ambiente muy rápidas. La velocidad de enfriamiento más rápida se logra colocando los explantes en lo que se ha llamado nieve de nitrógeno (nitrogen slush), que se forma a -210 °C (23).

Modelo conceptual que incorpora los efectos espacial y temporal de la pérdida de agua

En los últimos años, han avanzado las investigaciones que describen las características de las semillas en el almacenamiento mediante un modelo conceptual que cuantifica la respuesta celular al estrés por la desecación, considerando escalas de tipo espacial y temporal. Según este modelo, la respuesta primaria al estrés hídrico se considera espacial al valorar la cantidad de agua que sale de las células en términos de cambio de volumen. El modelo también vincula la protección al daño con el efecto que produce la acumulación de las moléculas de sustancias sólidas de reserva, las cuales forman una estructura estabilizadora (24).

La tolerancia a la deshidratación y la longevidad de las semillas se adquiere durante la etapa media y tardía del desarrollo del embrión, debido a que las células del embrión acumulan compuestos específicos, que están asociados a la habilidad de las células de tolerar el estrés hídrico extremo, como los antioxidantes de bajo peso molecular; carbohidratos complejos, como los oligosacáridos; las proteínas LEAs (late embryogenesis abundant proteins) y las proteínas HSPs (heat-shock proteins) (12, 25).

El modelo asume que las características espaciales que adquiere el citoplasma solidificado, en el momento de la desecación, van a determinar el tiempo de la conservación de su estado sólido y la longevidad de las semillas (24). El mismo se utilizó para identificar el nivel crítico mínimo de acumulación de materia seca celular requerido para una apropiada tolerancia a la desecación de *Pritchardia remota* (una palma tropical sensible a la desecación). Se demostró que las semillas en desarrollo o los embriones deben adquirir, al menos, un 35% de material de reserva para evitar una reducción letal del volumen celular durante el secado (26).

Una relación similar se encontró en estudios realizados con semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), cultivar 'SS-96', en los que se observó que las semillas que se cosecharon antes de alcanzar los 35 días posteriores

a la antesis (35DDA) presentaron una disminución de la tolerancia a la desecación y, como consecuencia, una disminución de la longevidad después de la criopreservación (27). Congruentemente, en otro estudio sobre las características de las semillas de cinco variedades de morera (*Morus alba* L.), se pudo apreciar que su índice de sensibilidad a la desecación (P) fue menor de 0,5; característico de las semillas tolerantes (ortodoxas), y que más del 60 % de la materia seca total formaba parte de las reservas nutricionales (embrión-endospermo) (28).

La tolerancia a la deshidratación de las angiospermas de resurrección (plantas que se mantienen viables a pesar de una deshidratación considerable y que recuperan la actividad metabólica cuando el agua se hace disponible) está basada en un espectro de mecanismos que acompañan al secado de manera similar a como ocurre en las semillas ortodoxas (29).

Al respecto, se estima que existen unas 153 especies de angiospermas, comúnmente referidas como plantas de resurrección, que sobreviven la pérdida de hasta un 95 % del contenido del agua celular por prolongados períodos de tiempo y después recuperan la actividad metabólica de los tejidos en un tiempo de rehidratación de 24 a 72 horas (30).

El plegamiento activo y reversible de la pared celular y la sustitución del agua de las vacuolas por sustancias no acuosas se consideran dos posibles mecanismos generales usados por las plantas angiospermas tolerantes a la desecación para evitar el estrés mecánico durante ese proceso (31). Esos mecanismos de protección son coherentes con el modelo espacial y temporal, respecto al criterio de que las moléculas comprimidas forman una estructura que protege la estabilidad del citoplasma solidificado y contribuye a la longevidad de las semillas (24).

Teniendo en cuenta el modelo conceptual espacial y temporal, se han realizado estudios sobre los mecanismos que controlan la velocidad del envejecimiento y de las variaciones de la longevidad entre tipos de células. Se han propuesto tres tipos de interacciones entre la conformación estructural del citoplasma seco y el envejecimiento: 1) las células que no contienen clorofilas y almacenan pocos lípidos pueden exhibir larga vida en el almacenamiento y el envejecimiento ocurre, probablemente, debido a procesos auto oxidativos cuando el estado sólido del citoplasma se relaja; 2) las células con clorofila activa pueden morir rápidamente, ya que son propensas al estrés oxidativo originado por los pigmentos fotosintéticos en ausencia de agua metabólica y 3) las células que carecen de cloroplastos, pero que tienen un alto contenido de lípidos pueden morir rápidamente durante el almacenamiento a -20 °C, posiblemente debido a que a esa temperatura los lípidos cristalizan, se contraen y desestabilizan la matriz vítrea (25).

Semillas intermedias

Las semillas denominadas intermedias tienen más características de las tolerantes a la desecación que de las recalcitrantes, pero su vida en el almacenamiento no se incrementa por la reducción de la temperatura (32).

La condición de intermedias puede manifestarse de formas diferentes, que incluye: 1) semillas que pueden tolerar el secado a contenidos de agua más bajos que las recalcitrantes, pero no tan bajos como las ortodoxas; 2) muestran una longevidad anómala a temperaturas entre +10 y -30 °C; y 3) tienen corta vida, independientemente de cómo han sido secadas o enfriadas. La existencia de una categoría intermedia de la fisiología postcosecha demuestra la variación natural de las semillas en la respuesta a la pérdida de agua (24).

La longevidad anómala a temperaturas entre +10 y -30 °C parece provenir de la cristalización de los triacilgliceroles (TAG), debido a que el citoplasma rico en lípidos es un material compuesto, con diferentes propiedades térmicas. La contracción de los cuerpos lipídicos produce vacíos desestabilizadores en la matriz citoplasmática (24) y permite la entrada de grandes moléculas de las especies del oxígeno reactivo (EOR). Los TAG son una característica común de las células del germoplasma caracterizado de comportamiento intermedio. En el 80 % de las especies caracterizadas como intermedias, el contenido de los TAG en las semillas supera al 20 %; y excede al 40 % en el 57 % de estas especies (25).

CONCLUSIONES

- Los resultados de las investigaciones presentadas muestran que los procedimientos utilizados para la conservación a largo plazo de las semillas, ya sean ortodoxas de corta o larga vida, así como los ejes embrionarios de las semillas recalcitrantes, tienen en común con los protocolos que se emplean para la criopreservación de los materiales vegetativos, la necesidad de lograr la solidificación del citoplasma celular, para ralentizar los movimientos de las moléculas que participan en las reacciones químicas propias del envejecimiento y la pérdida de la viabilidad.
- En los trabajos revisados se manifiesta que, existen diferencias entre las especies en cuanto a las características de los movimientos moleculares que se producen en el citoplasma solidificado con la variación de la temperatura, lo cual resulta congruente con la teoría que considera a la longevidad como una propiedad inherente de las especies. La existencia de movimientos moleculares, aún a temperaturas criogénicas, pone de manifiesto que, si bien la criopreservación puede alargar significativamente el período de conservación para muchas especies en relación con otros procedimientos, los métodos actuales de conservación requieren el control de la viabilidad del material conservado y la renovación del germoplasma en las condiciones ambientales para garantizar su preservación. Actualmente, no existen métodos de conservación que garanticen la preservación del germoplasma a perpetuidad, por lo cual, con el tiempo, es necesaria su renovación.

BIBLIOGRAFÍA

1. FAO. Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura “[Internet]”. Edición revisada. Roma. 2014; 167 p. E-ISBN 978-92-5-308262-9. Available from: <https://www.fao.org>
2. Walters C, Pence VC. The unique role of seed banking and cryobiotechnologies in plant conservation. *Plant People Planet PPP*. 2020. 9 p. doi: <http://doi.org/10.1002/ppp3.10121>
3. Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S, Buitink J. Late seed maturation: drying without dying. *Journal of Experimental Botany* 2017; 68: 827–41. doi: <http://doi.org/10.1093/jxb/erw363>
4. Hay FR, Davies RM, Dickie JB, Merritt DJ, Wolks DM. More on seed longevity phenotyping. *Seed Science Research*. 2022;1–6. doi: <http://doi.org/10.1017/S0960258522000034>
5. Walters C, Wheeler LM, Grotenhuis JM. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research* 2005; 15: 1 – 20. doi: <http://doi.org/10.1079/SSR2004195>
6. Walters, C. Genebanking seeds from natural populations. *Natural Areas Journal*, 2015a; 35(1): 98–106. <http://doi.org/10.3375/043.035.0114>
7. Roberts, E.H. Predicting the storage life of seeds “[Internet]”. *Seed Science and Technology*. 1973; 1: 499–14. Available from: <https://www.scirp.org>
8. Ellis RH, Roberts EH. Improved equations for the prediction of seed longevity “[Internet]”. *Ann Bot*; 1980; 45:13–3077. Available from: <https://www.jstor.org>
9. Pammenter NW, Berjak P. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. *Int. J. Plant Sci.* 2014; 175(1):21–28. doi: <http://doi.org/10.1086/673302>
10. Ballesteros D, Walters C. Solid-state biology and seed longevity: a mechanical analysis of glasses in pea and soybean embryonic axes. *Frontiers Plant Science*. 2019; 10: 920. doi: <http://doi.org/10.3389/fpls.2019.00920>.
11. Ballesteros D, Walters C. Detailed characterization of mechanical properties and molecular mobility within dry seed glasses: relevance to the physiology of dry biological systems. *The Plant Journal*; 2011(68): 607–19. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04711.x>
12. Walters C, Ballesteros D, Vertucci BA. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. *Plant Science*. 2010; 179: 565–573. doi: <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.06.016>
13. Buitink J, Leprince O, Hemminga MA, Hoekstra F. Molecular mobility in the cytoplasm: an approach to describe and predict lifespan of dry germplasm. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000; 97: 2385–90. doi: http://doi.org/10.1073/pnas.04055479_7
14. Williams RJ. Methods for determination of glass transitions in seeds. *Ann. Bot.* 1994; 74: 525–30. doi: <http://doi.org/10.1006/anbo.1994.1150>
15. Ballesteros D, Pence VC. Survival and death of seeds during liquid nitrogen storage: a case study on seeds with short lifespans. *CryoLetters* 2017; 38 (4), 278-289. PMID:29734429

16. Hugh W, Pritchard HW, Nadarajan J. Cryopreservation of orthodox (desiccation tolerant) seeds In: Reed BM, editor. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer. 2008. p. 485-94.
17. Pammenter NW, Berjak P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. *Seed Science Research*. 2000; 10, 301–306. doi: <http://doi.org/10.1017/S0960258500000349>
18. Daws MI, Garwood NC, Pritchard HW. Prediction of Desiccation Sensitivity in Seeds of Woody Species: A Probabilistic Model Based on Two Seed Traits and 104 Species. *Annals of Botany* 2006; 97: 667–74. doi: <http://doi.org/10.1093/aob/mcl022>
19. Millennium Seed Bank Kew. Identifying desiccation –sensitive seeds. Technical Information Sheet 10 “[Internet]”. 2022, Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. Available from: msbtraining@kew.org, <https://brahmsonline.kew.org/msbp>
20. Engelmann F. Cryopreservation of embryos: an overview. In: Thorpe TA, Yeung EC, editors. *Plant embryo culture: methods and protocols*. Methods in Molecular Biology, vol 710. Humana Press, 2011, p 155-184. doi: http://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_13
21. Pammenter NW, Berjak P. Development of the understanding of seed recalcitrant and implications for *ex situ* conservation “[Internet]”. *Biocología Vegetal* 2013; 13 (3):131-44. ISSN 2074-8647. Available from: <https://revista.ibp.co.cu>
22. Ballesteros D, Sershen, Varghese B, Berjak P, Pammenter NW. Uneven drying of zygotic embryos and embryonic axes of recalcitrant seeds: Challenges and considerations for cryopreservation. *Cryobiology*. 2014; 69: 100-09. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.05.010>
23. Berjak P, Pammenter NW. Translating theory into practice for conservation of germplasm of recalcitrant-seeded species. *Biocología Vegetal*. 2013; 13 (2):75-92 ISSN 2074-8647
24. Walters C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta*. 2015; 242:397–406. doi: <http://doi.org/10.1007/s00425-015-2312-6>
25. Ballesteros D, Pritchard HW, Walters C. Dry architecture: towards the understanding of the variation of longevity in desiccation-tolerant germplasm. *Seed Science Research*. 2020; 30:142–155. doi: <http://doi.org/10.1017/S0960258520000239>
26. Pérez H, Hill LM, Walters C. A Protective Role for Accumulated Dry Matter Reserves in Seeds During Desiccation: Implications for Conservation. In: Chong PA, Newman DJ, Steinmacher DA, editors. *Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery*. Springer. 2020. p.133-42. doi: http://doi.org/10.1007/978-3-030-51358-0_8
27. Pérez-Rodríguez JL, Torrecilla Guerra G, Ruiz Padrón O, Rodríguez Escriba RC, Lorente González GY, Martínez Montero ME, González Olmedo JL. Efecto de la madurez en la crioconservación de semillas de *Nicotiana tabacum* L. *Cultivos Tropicales*, 2016; 37, no. especial, 99-105. doi: <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.2831.8320>
28. Reino-Molina JJ, Montejo-Valdés LA, Sánchez-Rendón JA, Martín Martín GJ. Características seminales de cinco variedades de morera (*Morus alba* L.) cosechadas en Matanzas, Cuba “[Internet]”. *Pastos y Forrajes*, 2017; 40 (4) 276-80. Available from: <https://scielo.sld.cu>
29. Ntuli, TM. Drought and desiccation tolerance and sensitivity in plants. *Botany*, 2012; 29-50. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/221929147>
30. Farrant MJ, Cooper K, Hilgart A, Abdalla KA, Bentley J, Thomson JA. A molecular physiological review of vegetative desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker). *Planta*. 2015; 242:407–26. doi: <http://doi.org/10.1007/s00425-015-2320-6>
31. Farrant JM. Mechanisms of desiccation tolerance in angiosperm resurrection plants. In: Jenks MA, Wood AJ, editors. *Plant Desiccation Tolerance*. Blackwell Publishing. 2007. p. 11-50. doi: <http://doi.org/10.1002/9780470376861.ch3>
32. Ellis RH, Hong TD, Roberts EH. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. “[Internet]” *Journal of Experimental Botany*. 1990; 41:1167–74. Available from: <https://www.jstor.org/stable/23695125>