

03058 4
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL CCH
CENTRO DE ECOLOGIA

"Estudio sobre ecología fisiológica de la germinación de siete especies tropicales para fines de conservación ex situ"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN ECOLOGIA

PRESENTA:

María del Carmen Rodríguez Hernández

Noviembre de 1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL CCH
CENTRO DE ECOLOGIA

"Estudio sobre ecología fisiológica de la germinación de siete
especies tropicales para fines de conservación ex situ"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN ECOLOGIA

PRESENTA:

María del Carmen Rodríguez Hernández

Noviembre de 1992

RESUMEN

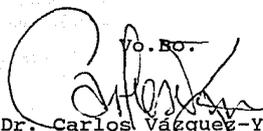
El almacenamiento de semillas se plantea como una alternativa de conservación ex situ de especies amenazadas o cuyo hábitat se encuentra en peligro de desaparecer. El trabajo se centra en el estudio de las semillas de siete especies tropicales (Diospyros digyna, Cupania dentata, Cymbopetalum baillonii, Poulsenia armata, Chamaedorea tepeilote, Rhhedia edulis y Stemmadenia donnel-smithii) que presentan características tales como alto contenido de humedad e intolerancia a la desecación que pueden dificultar su almacenamiento. A fin de contribuir al conocimiento de los eventos relacionados con este problema, se analiza el efecto de la deshidratación de las semillas sobre su respuesta fisiológica, así como el papel de algunas soluciones de metabolitos compatibles (prolina, glicina-betaína, sacarosa, Ca++ y ABA), los cuales se presume juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de membranas, mismas que son consideradas como los sitios primarios de daños por desecación. Al mismo tiempo, se analiza la respuesta germinativa de las semillas en su hábitat de origen y en sitios en los que ha desaparecido la cubierta vegetal.

Las semillas colectadas en la selva se sometieron en laboratorio a los tratamientos con las soluciones de metabolitos compatibles, posteriormente se deshidrataron a diferentes niveles y se mantuvieron en cámaras de germinación. Se midió la tasa de respiración de las semillas antes y después de la imbibición y se analizó la salida de solutos (medida como conductividad del agua de inmersión), la cual es considerada en principio por varios autores como un índice de deterioro a nivel de membranas.

Se encontró que las siete especies estudiadas mostraron un retardo en la germinación provocado por la deshidratación; cinco de las cuales muestran una reducción de su viabilidad. Al mismo tiempo se observa una disminución en la tasa de respiración antes de la imbibición de las semillas, pero después de la imbibición se reactiva el metabolismo respiratorio. No todos los metabolitos compatibles producen el efecto esperado, es decir, conservar la estructura celular en semillas desecadas. Por otra parte, la conductividad no puede considerarse como un índice seguro de daños

a nivel de membranas conforme las semillas pierden agua. Por otra parte se encontró que la capacidad germinativa de seis de las siete especies se pierde casi por completo fuera del dosel.

Los resultados indican, que las semillas de cuatro de las especies estudiadas presentarían serias dificultades si se intentara almacenarlas bajo las condiciones convencionales, debido a la reducción de su viabilidad provocada por la deshidratación. Las especies restantes tienen una mayor esperanza, pero sería necesario continuar las investigaciones en este campo antes de proceder a realizar ensayos de almacenamiento, ya que de otra forma, sólo quedaría la alternativa de experimentar por ensayo y error.

Vo.Bo.

Dr. Carlos Vázquez-Yanes
DIRECTOR DE TESIS

13 de noviembre de 1992

SUMMARY

Seed storage is outlined as an alternative to ex situ preservation of risk extinction species or whose habitat is in danger. The work is focused in the study of seven tropical species (Diospyros digyna, Cupania dentata, Cymbopetalum baillonii, Poulsenia armata, Chamaedorea tepejilote, Rheedia edulis y Stemmadenia donnell-smithii) with characteristics as high water content and desiccation intolerance which could make difficult their storage. In order to increase to the understanding of the events related to this problem, the effect of the seed dehydration on their physiological response is analyzed, as well as the role of some compatible solute solutions (proline, glycine-betaine, sucrose, Ca++ y ABA), known to have an effect on cellular membrane protection, wich is considered a primary site of desiccation damage. The germinative response of the seeds in their natural habitat and in sites where the canopy has been removed is analyzed too.

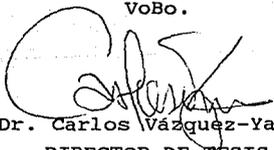
Seeds collected in the field were tested in the laboratory after treatments whit compatible metabolite solutions, then they were dehydrated to get different humidity levels and were maintained in germination chambers. The respiratory rate was measured before and after imbibition and the leaked solute were analyzed (measured as immersion media conductivity), which is considered as a membrane damage index by some authors.

It was founded that the seven studied species showed a germination delay caused by dehydration. Five of the seven species showed a viability reduction. At the same time, a decreased respiration rate was observed before imbibition but, after this the respiratory metabolism was reactivated. Not all the compatible metabolites showed the predicted behavior, that is, to preserve the cellular structure of desiccated seeds. The conductivity can not be considered as a reliable membrane damage index when the seeds are desiccated. It was founded that the germination capacity of six of the seven species was lost almost completely.

The results indicate that four of the seven studied seed species could show difficulties if their storage were intended

under the conventional storage conditions, because of the viability reduction after dehydration. The other three species have a greater possibility to be stored, but it is necessary to continue the research in this field before assay their storage.

VoBo.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Vázquez-Yanes', is written over the typed name below.

Dr. Carlos Vázquez-Yanes
DIRECTOR DE TESIS

INDICE

RESUMEN

CAPITULO 1. INTRODUCCION.....	1
CAPITULO 2. CLASIFICACION DE SEMILLAS Y CARACTERISTICAS ECOLOGICAS	
a) Clasificación de semillas.....	3
b) Características ecológicas.....	6
c) Clasificación ecológica.....	8
d) Tendencias evolutivas.....	12
CAPITULO 3. GERMINACION	
a) Absorción de agua.....	16
b) Reactivación de macromoléculas y organelos.....	19
c) Síntesis de proteínas.....	19
d) Respiración.....	20
CAPITULO 4. ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS	
a) Almacenamiento de semillas ortodoxas.....	22
b) Deterioro de semillas en almacenamiento.....	22
c) Problemas de almacenamiento en semillas recalcitrantes.....	27
d) Investigaciones previas en semillas recalcitrantes.....	34
CAPITULO 5. EL PAPEL DEL AGUA EN LAS SEMILLAS	
a) Secado en la maduración de las semillas.....	38
b) El estado del agua en la semilla.....	40
c) Tolerancia a la desecación.....	43
CAPITULO 6. METABOLITOS COMPATIBLES Y OSMORREGULACION.....	45
CAPITULO 7. OBJETIVOS.....	53
CAPITULO 8. METODOLOGIA.....	56
CAPITULO 9. RESULTADOS Y DISCUSION	
9.1 Contenido de humedad.....	71
9.2 Deshidratación.....	71
9.3 <u>Diospyros digyna</u>	77
9.4 <u>Cupania dentata</u>	89
9.5 <u>Cymbopetalum baillonii</u>	98
9.6 <u>Poulsenia armata</u>	106
9.7 <u>Chamaedorea tepejilote</u>	114
9.8 <u>Rheedia edulis</u>	120
9.9 <u>Stemmadenia donnell-smithii</u>	128
9.10 Germinación en campo.....	134

CAPITULO 10 . DISCUSION GENERAL.....	145
CONSLUSIONES.....	158
BIBLIOGRAFIA.....	160

RESUMEN

El almacenamiento de semillas se plantea como una alternativa de conservación ex situ de especies amenazadas o cuyo hábitat se encuentra en peligro de desaparecer. El trabajo se centra en el estudio de las semillas de siete especies (Diospyros digyna, Cupania dentata, Cymbopetalum baillonii, Poulsenia armata, Chamaedorea tepejilote, Rhedia edulis y Stemmadenia donnel-smithii) que presentan características tales como alto contenido de humedad e intolerancia a la desecación que pueden dificultar su almacenamiento. A fin de contribuir al conocimiento de los eventos relacionados con este problema, se analiza el efecto de la deshidratación de las semillas sobre su respuesta fisiológica, así como el papel de algunas soluciones de metabolitos compatibles (prolina, glicina-betaína, sacarosa, Ca++ y ABA), los cuales se presume juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de membranas, mismas que son consideradas como los sitios primarios de daños por desecación. Al mismo tiempo, se analiza la respuesta germinativa de las semillas en su hábitat de origen y en sitios en los que ha desaparecido la cubierta vegetal.

Las semillas colectadas en la selva se sometieron en laboratorio a los tratamientos con las soluciones de metabolitos compatibles, posteriormente se deshidrataron a diferentes niveles y se mantuvieron en cámaras de germinación. Se midió la tasa de respiración de las semillas antes y después de la imbibición y se analizó la salida de solutos (medida como conductividad del agua de inmersión), la cual es considerada en principio por varios autores como un índice de deterioro a nivel de membranas.

Se encontró que las siete especies estudiadas mostraron un retardo en la germinación provocado por la deshidratación; cinco de las cuales muestran una reducción de su viabilidad. Al mismo tiempo se observa una disminución en la tasa de respiración antes de la imbibición de las semillas, pero después de la imbibición se reactiva el metabolismo respiratorio. No todos los metabolitos compatibles producen el efecto esperado, es decir, conservar la estructura celular en semillas desecadas. Por otra parte, la conductividad no puede considerarse como un índice seguro de daños

a nivel de membranas conforme las semillas pierden agua. Por otra parte se encontró que la capacidad germinativa de seis de las siete especies se pierde casi por completo fuera del dosel.

Los resultados indican, que las semillas de cuatro de las especies estudiadas presentarían serias dificultades si se intentara almacenarlas bajo las condiciones convencionales, debido a la reducción de su viabilidad provocada por la deshidratación. Las especies restantes tienen una mayor esperanza, pero sería necesario continuar las investigaciones en este campo antes de proceder a realizar ensayos de almacenamiento, ya que de otra forma, sólo quedaría la alternativa de experimentar por ensayo y error.

CAPITULO 1
INTRODUCCION

En la actualidad cada vez es mayor el número de especies vegetales que se encuentran en peligro de extinción debido al creciente deterioro del ambiente, particularmente en las comunidades vegetales localizadas en la región intertropical, en donde existe la mayor riqueza de especies. Por lo que ante el evidente peligro de reducción de la diversidad genética de valor actual o potencial, es necesario enfocar la investigación hacia los aspectos de conservación de la riqueza de especies.

Existen diversas alternativas de conservación de germoplasma vegetal tanto en las comunidades naturales de las que las plantas forman parte integral (*in situ*) como fuera de ellas (*ex situ*). Entre estas últimas están los bancos o almacenes de semillas que preserven la riqueza de especies y poblaciones manteniendo su germoplasma latente por tiempo indefinido, lo cual permitiría planear con más tiempo las estrategias más adecuadas para renovar y reponer las poblaciones de plantas en peligro (Vázquez-Yanes, 1987).

Las semillas como elementos de conservación; son fáciles de recolectar, transportar, almacenar, distribuir y germinar; por lo que desde que comenzó a ser evidente la necesidad de conservar especies amenazadas, se pensó en la posibilidad de almacenar semillas como una forma de preservar el germoplasma vegetal en peligro de extinción (Vázquez-Yanes, 1987). El almacenamiento de semillas tanto de especies silvestres como cultivadas en condiciones de baja humedad y temperatura, que prolonguen su viabilidad al límite de sus potencialidades, es una alternativa de conservación aplicable a un número considerable de especies cuyas semillas son tolerantes a la deshidratación y a la congelación (ortodoxas) características de muchas zonas de vegetación templada y tropical seca. Desafortunadamente esta forma de conservación no puede ser aplicada a todas las especies ya que por un lado, cierto tipo de plantas no producen semillas, y por otro, algunas producen

semillas difíciles de almacenar (recalcitrantes).

Roberts (1973c), clasificó a las semillas de diferentes especies en dos tipos con base en su tolerancia a condiciones convencionales de almacenamiento, en dos tipos de comportamiento diferente: ortodoxas y recalcitrantes. Las semillas ortodoxas son fáciles de almacenar por largos periodos en una condición seca y baja temperatura en recipientes herméticamente sellados, mientras que por el contrario, las semillas recalcitrantes presentan una serie de problemas que las conducen, en la mayoría de los casos, a la pérdida total de viabilidad en corto tiempo cuando se intenta almacenarlas bajo estas condiciones de baja humedad y temperatura.

De lo anterior se deduce que existen grandes posibilidades de éxito cuando se intenta almacenar semillas de especies ortodoxas por métodos convencionales con la finalidad de conservar su germoplasma; sin embargo, en el caso de las semillas de especies recalcitrantes las perspectivas son bastante desalentadoras para muchas especies (Roberts y King, 1980; Vázquez-Yanes y Toledo, 1987).

Este último tipo de semillas merece una atención especial ya que a éste pertenecen la mayor parte de las especies primarias de los bosques tropicales (Roberts, 1973c); sin embargo, han recibido poca atención por parte de los investigadores debido a los serios problemas que tienen para su manejo, su estudio y por supuesto su almacenamiento.

Debido a que hasta el presente se desconocen las bases fisiológicas y bioquímicas que permitirían adquirir tolerancia al almacenamiento en semillas recalcitrantes, se pensó y se realizó el presente trabajo con la finalidad de contribuir al conocimiento sobre ecología y fisiología de semillas de siete especies de vegetación madura de la selva alta perennifolia de Los Tuxtlas, Veracruz; y con base en ello proponer experimentos técnicos con bases firmes para el almacenamiento de estas especies con fines de conservación de su germoplasma.

CAPITULO 2

CLASIFICACION DE SEMILLAS Y CARACTERISTICAS ECOLOGICAS

a) CLASIFICACION DE SEMILLAS

A través del tiempo, diversos investigadores han apreciado las diferencias en la tolerancia al almacenamiento (longevidad potencial) que presentan las semillas de diferentes tipos de plantas, entre los que pueden citarse los siguientes:

Ewart (1908, citado por Harrington, 1972) fue el primero que realizó una recopilación de trabajos acerca de la longevidad de las semillas, y con base en ella las dividió en 3 grupos: 1) semillas macrobióticas (de larga longevidad); 2) semillas mesobióticas (de longevidad media); y 3) semillas microbióticas (de corta longevidad).

Harrington (1972) resumió la información publicada hasta los inicios de los 70's sobre longevidad de semillas mantenidas en diversas condiciones de almacenamiento, y propuso que las semillas podían separarse en dos grupos. En uno de ellos ubicó a las semillas que pierden la viabilidad en corto tiempo (generalmente menos de 1 año), y en el otro a las semillas que pueden permanecer viables 10 años o más.

Como ya mencionó, Roberts (1973c) clasificó a las especies de semillas basándose en su tolerancia a las condiciones de almacenamiento en dos tipos de comportamiento: ortodoxas y recalcitrantes, los cuales coinciden con la clasificación de Harrington.

SEMILLAS ORTODOXAS

Las semillas ortodoxas son aquellas que pueden almacenarse fácilmente por varios años (y en algunos casos indefinidamente) a baja temperatura (entre 5°C y 18°C o menos) y con un contenido de humedad residual de 5 a 7% sin mostrar una disminución significativa de su viabilidad; son por lo general semillas pequeñas (de 0.001 a 0.1 g), que se liberan de la planta progenitora con un contenido de humedad menor del 20% (sobre el peso húmedo), el cual puede disminuirse a menos del 5%,

incrementando con ello su capacidad de almacenamiento por largos períodos de tiempo; de hecho, Ellis y Roberts, (1980a; 1980b) y Ellis, et al., (1990b) encontraron una ecuación que denominaron ecuación universal de la viabilidad la cual puede aplicarse a cualquier especie con semillas ortodoxas, y predice que la longevidad potencial de estas semillas puede aumentar en una forma específica para cada especie, disminuyendo la temperatura y el contenido de humedad de las semillas en almacenamiento. Las semillas ortodoxas tienen latencia natural prolongada, es decir, presentan una mayor longevidad potencial y, por lo tanto, menos dificultades para su almacenamiento que las recalcitrantes debido a que al momento de la diseminación el embrión se encuentra profundamente deshidratado y en un estado de completa inhibición del metabolismo (con una tasa respiratoria mínima o nula) y un estado de interrupción temporal del crecimiento (Bewley y Black, 1978; Bewley, 1979; Berjak et al., 1990).

SEMILLAS RECALCITRANTES

Las semillas recalcitrantes, al contrario de las ortodoxas, no resisten el almacenamiento bajo las mismas condiciones de baja temperatura y bajo contenido de humedad, pierden su viabilidad en corto tiempo; son por lo general semillas grandes, de 0.1 a 10 g o más, que se liberan de la planta progenitora con un alto contenido de humedad, el cual llega a representar aproximadamente 50% o más del peso húmedo. Este contenido de humedad difícilmente puede disminuirse a menos del 20% sin que las semillas se dañen irreversiblemente por desecación; pero si se intenta almacenarlas en una condición húmeda se presentan problemas asociados con el alto contenido de humedad, como son, germinación en almacenamiento, desarrollo de hongos y bacterias, y formación de cristales de hielo que deterioran las estructuras celulares cuando se intenta almacenarlas a bajas temperaturas (Roberts, 1973c). En otras palabras, este tipo de semillas no están ni estructural ni fisiológicamente condicionadas para resistir la desecación y el frío, por lo que no se pueden almacenar con éxito bajo estas condiciones. A diferencia de las semillas ortodoxas, estas

mantienen un cierto grado de actividad metabólica que se traduce en una alta tasa respiratoria; la latencia en este tipo de semillas es de naturaleza efímera y poco profunda y en muchos casos no se presenta (Roberts y King, 1980), muestran una menor longevidad potencial, debido a que tienden a germinar rápidamente después de ser liberadas sin pasar por un período de espera en condiciones desfavorables, perdiendo su viabilidad si no logran germinar.

Es necesario hacer notar que existen muchas semillas que no son totalmente ortodoxas o totalmente recalcitantes sino que se encuentran en una condición intermedia, es decir que existe un gradiente desde la condición ortodoxa a la condición recalcitante. Por ejemplo, Ellis et al., (1990a) afirman que las semillas de café (Coffea arabica L.) no satisfacen las definiciones típicas de conducta en almacenamiento de ortodoxas o recalcitantes. En un trabajo reciente se propone que lo mismo ocurre en Carica papaya (Ellis et al., 1991).

Bonner y Vozzo (1990) proponen que las semillas pueden agruparse en cuatro clases de acuerdo con sus características de almacenamiento: 1) **ortodoxas verdaderas**, las cuales pueden almacenarse por largos períodos a contenidos de humedad de 5 a 10% y temperaturas de subcongelación; 2) **sub-ortodoxas**, son semillas que pueden almacenarse bajo las mismas condiciones, pero por períodos más cortos debido al alto contenido de lípidos o a la presencia de testas delgadas; 3) **recalcitrantes templadas**, las cuales no pueden deshidratarse, pero pueden almacenarse durante 3 a 5 años a temperaturas cercanas al punto de congelación; y 4) **recalcitrantes tropicales**, las cuales tampoco pueden deshidratarse y mueren a temperaturas por debajo de 10 o 15°C.

b) CARACTERISTICAS ECOLOGICAS

Los organismos vivos, incluyendo las semillas, no se encuentran aislados en una campana de cristal, si no que forman parte de ecosistemas naturales, en los que interactúan con otros organismos, ya sea de su misma especie o de especies diferentes tanto de plantas como de animales, y con el ambiente físico que los rodea. De tal forma, existe una compleja y dinámica red de interacciones entre un organismo particular y el ambiente (biótico y abiótico) que lo rodea. Muchos factores que componen el ambiente, afectan positiva o negativamente la permanencia de una especie (en espacio y/o tiempo) en un sitio particular, es decir su longevidad ecológica.

La longevidad ecológica de las semillas se refiere al período de tiempo que estas pueden permanecer viables latentes en el suelo bajo condiciones naturales, lo cual determina las posibilidades de sobrevivencia de las especies en diferentes ambientes; este período varía entre especies dependiendo de varios factores que se relacionan entre sí. En otras palabras, la longevidad ecológica depende tanto de las características de las semillas como de los factores bióticos y abióticos del hábitat en el que las semillas son diseminadas.

Las diferencias en longevidad ecológica (así como de la potencial) entre semillas ortodoxas y recalcitrantes determinan en parte las diferencias en su capacidad para sobrevivir en condiciones de almacenamiento.

Las semillas ortodoxas presentan una mayor longevidad ecológica que las recalcitrantes; son producidas por especies anuales, herbáceas, arvenses y algunas leñosas que se desarrollan en hábitats discontinuos e inestables con climas marcadamente estacionales, caracterizados por períodos más o menos largos de sequía o frío (Vázquez-Yanes, 1987). De acuerdo con Tompsett (1985), las semillas pequeñas producidas por especies que se desarrollan en hábitats más secos resisten mejor el daño por desecación; esta asociación sugiere que la evolución en un clima relativamente seco puede haber favorecido adaptaciones en la

fisiología de tales semillas, ya que aparentemente existen asociaciones entre hábitats más secos y mayor resistencia de las semillas al estrés hídrico por un lado, y mayor longevidad por otro (Tompsett, 1985). Para estas especies es importante la persistencia en su ambiente natural por largos periodos de tiempo en estado latente después de la diseminación, lo cual constituye un factor de supervivencia, resistiendo la estación desfavorable hasta que llegue la estación del año adecuada para la germinación y crecimiento de las plántulas, formando bancos de semillas de alguna duración (Garwood, Álvarez-Buylla y Martínez-Ramos, 1990). Este tipo de especies producen una gran cantidad de semillas pequeñas con bajo contenido de humedad, lo cual incrementa su potencial de dispersión a grandes distancias por medios abióticos (agua, viento, etc.) (Foster, 1986); aunque también son dispersadas por medios bióticos (principalmente aves y algunos mamíferos) (Coates-Estrada y Estrada, 1988 #). No ignoramos que existe una biología compleja involucrada con los síndromes de dispersión, pero este tema no entra en los objetivos del presente trabajo. Las semillas de este tipo por lo general presentan una germinación de tipo epigea (Ng, 1978).

Las semillas recalcitrantes, por el contrario, presentan una menor longevidad ecológica que las ortodoxas; son producidas por especies perennes, leñosas que se desarrollan en comunidades maduras, localizadas en regiones con climas cálido-húmedo en los que no existe una estacionalidad relativamente marcada, por lo que las semillas no tienen que enfrentar condiciones desfavorables (Vázquez-Yanes, 1987). Esta situación probablemente haya influido para que las semillas no presenten latencia prolongada como estrategia evolutiva (Moreno-Casásola, 1983) y germinen pronto después de ser liberadas, lo cual a su vez determine su menor resistencia al almacenamiento. Este tipo de especies producen una menor cantidad de semillas grandes de rápida germinación, formando un banco de semillas efímero (Guevara, 1983; Guevara y Gómez-Pompa, 1983; Vázquez-Yanes, 1983; Vázquez-Yanes y Guevara, 1985). Las semillas grandes por lo general son ricas en reservas, lo cual

favorece el establecimiento inicial de plántulas (independientemente de los recursos externos) (Angevine y Chabot, 1979; Foster, 1986), pero las convierten en recursos alimenticios de primera calidad para los depredadores (Janzen, 1970; Vázquez-Yanes, 1983; Vázquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1987). El alto contenido de humedad con el que son liberadas este tipo de semillas, combinado con su gran tamaño, reduce las posibilidades de dispersión a grandes distancias por medios abióticos (generalmente presentan dispersión barócora, Foster, 1986), por lo que más bien están adaptadas para la dispersión biótica (principalmente aves y mamíferos) (Coates-Estrada y Estrada, 1988; #). Este tipo de especies pueden presentar una germinación semihipógea, hipógea o duriana (Ng, 1978).

c) CLASIFICACION ECOLOGICA

Las semillas son estructuras de reproducción, diseminación y en la mayoría de los casos de persistencia que forman parte del ciclo de vida de una planta, el cual constituye un puente entre una generación y la siguiente, asegurando la continuación de la población (Harper et al., 1970; Vázquez-Yanes, 1987).

Existe una gran diversidad de mecanismos adaptativos en esta etapa del ciclo de vida (semilla) de las plantas; sin embargo, se puede observar (basándonos en los reportes de varios autores) que existen dos tendencias más o menos bien definidas en cuanto a la capacidad de germinación y a la permanencia de las semillas en el suelo, las cuales están en función (entre otras razones) del tamaño, del número y de la dispersabilidad de las semillas, y del tipo de hábitat en el que se encuentran: especies colonizadoras y especies de comunidades maduras.

Salisbury (1942), analizó algunas de las diferencias principales entre los mecanismos reproductivos en relación con el número, el tamaño y la dispersabilidad de las semillas producidas, comparando plantas que se establecen en ambientes permanentes y estables, y plantas que se establecen en hábitats inestables y efímeros. El encontró que las plantas que se establecen en hábitats estables producen una menor cantidad de semillas de mayor tamaño y

menor dispersabilidad; mientras que las especies que se establecen en hábitats inestables producen una mayor cantidad de semillas pequeñas con mayor capacidad de dispersión (Vázquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1987).

MacArthur y Wilson (1967), establecen que la presión de selección que recibe un organismo está en función del estado sucesional del ecosistema en el que se encuentre y distinguen dos tipos diferentes de selección (r y k). En términos generales es posible asegurar que la estrategia r y la estrategia k coinciden respectivamente con los estados iniciales y finales de la sucesión (Toledo, 1976). Del gradiente r - k , en el punto más extremo de r , la estrategia óptima será la de disponer la mayor cantidad posible de materia y energía a la reproducción, es decir, que los organismos tenderán a producir una gran cantidad de descendientes cada uno de los cuales estará dotado con la menor cantidad posible de materia y energía. En el otro extremo, el último punto k , la estrategia óptima implica canalizar la mayor cantidad posible de materia y energía a la producción de unos cuantos descendientes (Harper et al., 1970; Lloyd, 1987). De tal forma, la selección k tiende a incrementar la eficiencia de la utilización de los recursos ambientales (Pianka, 1970). En una comunidad madura, como la selva tropical húmeda, donde la densidad y la competencia incrementan notablemente, la mejor estrategia es la del tipo k , por lo que se puede pensar que parte de las especies que forman esta comunidad muestran estrategias del tipo k (Toledo, 1976).

Baker (1972) analizó la flora de California y encontró que existen correlaciones entre los pesos de las semillas y las condiciones ambientales en las que se desarrollan. Estableció que las diferencias encontradas en el peso de las semillas son adaptativas y resultan del compromiso entre producir unas cuantas semillas más pesadas con grandes reservas alimenticias que aseguran la sobrevivencia de las plántulas, y por otro lado, una mayor dispersabilidad de semillas de menor tamaño que se producen en grandes cantidades.

Angevine y Chabot (1979) reconocen dos estrategias básicas de

la conducta de germinación: 1) evasión de condiciones difíciles para el crecimiento de las plántulas y 2) tolerancia de tales condiciones. La conducta de evasión involucra el uso de señales ambientales para predecir periodos favorables y desfavorables, generalmente está relacionada con la producción de una gran cantidad de semillas pequeñas. La tolerancia requiere generalmente un gasto materno alto en el tamaño de semillas para superar los riesgos de mortalidad. Las especies que utilizan esta estrategia son miembros de bosques (o selvas) maduros que pueden germinar bajo condiciones de intensidad de luz relativamente baja.

Diferentes autores han clasificado los árboles de la selva en grupos de acuerdo con sus características ecológicas y fisiológicas. Una de las más usadas los divide en: nómadas, totalmente dependientes de claros e independientes de claros para la germinación y el establecimiento de las plántulas. En el primer caso ubican a las especies que pueden crecer tanto en claros como en sitios abierto. En el segundo, estarían las especies "pioneras" que producen una gran cantidad de semillas muy pequeñas, requieren de claros para su germinación y presentan latencia prolongada. Mientras que en el último caso estarían las especies "primarias" o "persistentes", las cuales producen una menor cantidad de semillas grandes, de corta longevidad que tienden a germinar rápidamente formando carpetas de plántulas (Guevara y Gómez-Pompa, 1983; Bazzaz, 1984; Martínez-Ramos, 1985; Vázquez-Yanes y Guevara, 1985; Foster, 1986; Vázquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1987; Alvarez-B. y M, 1992).

Con base en las clasificaciones anteriores podemos darnos cuenta de que, aunque cada autor separa a los grupos de especies dándoles nombres diferentes, se trata en realidad de dos grupos ecológicos bien definidos con respecto a sus estrategias de germinación y establecimiento, las cuales están en función de las características de las semillas y del hábitat, entre otras razones.

Si analizamos lo anterior y lo relacionamos con el concepto de Roberts sobre especies ortodoxas y recalcitrantes, podemos llegar

a la conclusión y/o predicción, de que el grupo ecológico formado por "especies pioneras o colonizadoras" tendrán semillas de tipo ortodoxo, y que el grupo formado por "especies primarias o persistentes", tendrán semillas de tipo recalcitrante (Roberts, 1973c). Sin embargo, no hay que olvidar que estos grupos representan extremos de un gradiente, y que deben existir una gran cantidad de especies que presenten características intermedias.

Sentadas las bases anteriores, cuando hagamos referencia a semillas ortodoxas y semillas recalcitrantes, debemos tener en cuenta el contexto ecológico en el que se desenvuelven, ya que en buena parte, ello determina las características de las semillas.

Por otra parte, como se puede notar, una de las características más importantes que los investigadores toman en cuenta para la división de los grupos es el tamaño de las semillas. Harper et al. (1970), Angevine y Chabot (1979) y Foster (1986), analizaron cada factor del microambiente biótico y abiótico como posibles agentes responsables de mantener las diferencias en el tamaño (y otras características) de las semillas de los dos grupos ecológicos: luz, humedad ambiental, potencial hídrico del suelo y balance hídrico de las semillas, contenido de reservas y de metabolitos secundarios, dispersión, depredación y competencia. La contribución de los factores bióticos es muy importante y compleja, pero su análisis queda fuera de los objetivos del presente trabajo.

La reducida intensidad de luz en el suelo de la selva podría favorecer a las semillas grandes, ya que no se ha reportado que requieran de luz para su germinación (King y Roberts, 1980a), y por otra parte su gran cantidad de reservas podría incrementar la capacidad de las plántulas para resistir hasta que las condiciones de luz sean favorables, ya que se mantienen justo en el punto de compensación de luz (Foster, 1986). Por el contrario, las semillas pequeñas generalmente requieren de luz para germinar (fotoblásticas) (Vázquez-Yanes, 1983; Vázquez-Yanes y Guevara, 1985; Harper et al., 1970) por lo que con frecuencia son incapaces de germinar en el oscuro suelo de la selva, pasando a formar parte del banco de semillas hasta que se presenten las condiciones de luz

necesarias para su germinación (Castro y Guevara, 1983; Guevara y Gómez-Pompa 1983; Vázquez-Yanes, 1983; 1987; Fenner, 1985).

El potencial hídrico del suelo, el área de contacto entre la semilla y el suelo, y las características de permeabilidad de la cubierta de la semilla son determinantes de la tasa de absorción de agua por la semilla (Harper et al., 1970; Bewley y Black, 1978; Foster, 1986). Harper et al. (1970) y Foster (1986) han sugerido que el alto contenido de humedad de las semillas grandes puede ser una característica necesaria, debido a que son incapaces de absorber grandes cantidades de agua porque presentan una relación superficie/volumen pequeña, y por esta razón pueden ser incapaces de absorber suficiente agua para germinar en suelos relativamente secos que son favorables para la germinación de semillas pequeñas. Para germinar, una semilla debe absorber agua en la interfase suelo-semilla más rápido de lo que se pierde a la atmósfera (Bewley y Black, 1978), por estas razones es lógico suponer que las semillas grandes no puedan germinar en suelos desnudos en donde la evaporación es muy grande. El estrés por desecación en los claros de la selva (donde la humedad es menor y la evaporación y la temperatura son mayores que en el interior de la selva), podría evitar la exitosa germinación de este tipo de semillas debido a que probablemente en tales condiciones son incapaces de mantener un balance hídrico positivo necesario para su germinación (Foster, 1986).

d) TENDENCIAS EVOLUTIVAS

La hipótesis de que las plantas con semillas (particularmente las angiospermas) se originaron y diferenciaron en las regiones tropicales húmedas, ha sido aceptada por casi todos los botánicos del siglo XX. Este razonamiento está basado en la hipótesis de Willis (1922, citado por Stebbins, 1974), de que la región que contiene el mayor número de especies contemporáneas pertenecientes a un grupo, es la región en la que se originó el grupo ("centros de diversidad"). Sin embargo, de acuerdo con Stebbins (1974), las selvas tropicales no son las comunidades dentro de las cuales se originaron y diversificaron las angiospermas, sino que en un mayor

grado son "museos" o refugios, en donde se conservan las especies vivas ("hipótesis de museo") (Toledo, 1982).

La evolución de plantas superiores a varios niveles parece haberse debido a su capacidad para superar condiciones adversas (Bewley, 1979). De hecho, las condiciones ecológicas bajo las cuales se encuentran (actualmente) las semillas tienen profundos efectos sobre su viabilidad, latencia y finalmente sobre su crecimiento y desarrollo en estado de plántulas (Manguire, 1972 citado por López-Quiles y Vázquez-Yanes, 1983). La presencia de un período de interrupción del crecimiento y disminución del metabolismo durante alguna etapa del ciclo de vida (como ocurre en la etapa de semilla de la mayoría de las especies colonizadoras), es una característica adaptativa de supervivencia frente a condiciones ambientales adversas (Vázquez-Yanes, 1983).

En zonas cálidas húmedas no existe una marcada estación desfavorable, por lo que en las selvas altas perennifolias las condiciones adecuadas para la germinación pueden perdurar todo el año; de tal forma, las semillas producidas por las especies primarias que crecen en las selvas no necesariamente deben presentar latencia como una estrategia adaptativa (Gómez-Pompa et al., 1972), incluso, Priestley (1986), sugiere que en este tipo de clima las condiciones ambientales son lo suficientemente favorables como para que una semilla pueda prescindir de adaptaciones especiales (fisiológicas o morfológicas) o de una capacidad para superar condiciones inclementes. De hecho, por lo general las especies que producen semillas recalcitrantes, las cuales presentan la viabilidad más corta, son nativas de aquellas áreas que no presentan sequía estacional marcada (Roberts y King, 1980).

La breve persistencia de las semillas recalcitrantes en el suelo de la selva debida a su rápida germinación y la subsecuente formación de carpetas de plántulas ("las especies persistentes no forman bancos de semillas, pero al parecer sus plántulas funcionan como los 'bancos regenerativos' más importantes al momento de la apertura de un claro", Martínez-Ramos, 1992), indica que ha habido una transferencia de funciones de la semilla al estado de plántulas

en cuanto a la función de permanencia (Vázquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1984). Este tipo de transferencia de funciones ocurre en diferentes líneas evolutivas (Stebbins, 1974).

La tolerancia a la desecación, que presentan las semillas producidas por especies colonizadoras en hábitats inestables, es en muchos aspectos una característica primitiva, siendo más prevalente en procariontes que en eucariontes, y más común en plantas inferiores que en superiores (Bewley, 1979).

Ante estas evidencias cabe preguntarse si existe alguna relación taxonómica o filogenética entre las especies que producen semillas ortodoxas y entre las que producen semillas recalcitrantes. Si la respuesta fuera afirmativa, entonces cabría esperar que tanto la conducta ortodoxa como la recalcitrante muestran tendencias evolutivas bien definidas; por el contrario, si la respuesta es negativa, es decir, si no existieran relaciones filogenéticas entre las especies, entonces probablemente las especies que presentan conducta recalcitrante hayan evolucionado por convergencia en respuesta a presiones de selección ambiental (Martínez-Ramos, 1991).

Por otra parte, si existieran relaciones filogenéticas entre las especies que producen semillas ortodoxas y entre las que producen semillas recalcitrantes, entonces cabría preguntarse si la conducta recalcitrante es más primitiva o más avanzada que la ortodoxa. Si fuera más avanzada, querría decir que en algún momento de su historia evolutiva desarrollaron mecanismos de latencia y después los perdieron, lo cual podría indicar que guardan en su poza génica la información necesaria para "re-inducir" los mecanismos de latencia perdidos. Si por el contrario, fuera más primitiva, entonces posiblemente nunca desarrollaron mecanismos de latencia, por lo que en tal caso, deberemos buscar mecanismos alternativos de inducción de latencia. Posiblemente la presencia en plantas de genes no expresados que en un momento dado podrían conferir a las semillas una mayor resistencia al estrés.

Lo cierto es que de las pocas especies recalcitrantes reportadas hasta la fecha, se encuentra que no existen relaciones

taxonómicas que las separen en dos grupos, ya que en una misma familia se presentan especies y/o géneros que poseen semillas ortodoxas y otros con semillas recalcitrantes, como es el caso específico de la familia Moraceae, la cual presenta especies ortodoxas como Cecropia obtusifolia y especies recalcitrantes como Brosimum alicastrum.

CAPITULO 3
GERMINACION

La germinación es un proceso que incluye una serie de eventos metabólicos comunes a todas las semillas (metabolismo basal); sin embargo, algunos de estos eventos muestran pequeñas diferencias a nivel de especie, las cuales no se discutirán en este trabajo. En esta sección nos ocuparemos únicamente de presentar un panorama general los conocimientos que hasta la fecha se han reunido sobre el metabolismo basal de la germinación.

METABOLISMO BASAL

La semilla "seca" constituye una unidad funcional equipada para llevar a cabo una gran cantidad de reacciones bioquímicas que dan lugar al proceso de germinación (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975). La primera condición necesaria para que dé inicio este proceso es la presencia de agua. Cuando una semilla se encuentra en un medio húmedo, con una temperatura óptima y en presencia de oxígeno, empieza a "despertar". Este paso (también denominado período de imbibición) puede durar desde unos cuantos minutos hasta unas cuantas horas o días dependiendo de la especie, de la temperatura y la disponibilidad de oxígeno. Durante este período ocurren 4 grandes eventos: 1) rápida absorción de agua; 2) reactivación de macromoléculas y organelos preexistentes, los cuales fueron formados durante la maduración de la semilla, pero fueron almacenados o inactivados por el proceso de secado en la maduración (Higgins, 1984; Murray, 1984); 3) síntesis de proteínas; y 4) respiración (Ching, 1972; Bewley y Black, 1978). En seguida revisaré cada uno de estos eventos.

a) ABSORCION DE AGUA

La cantidad de agua absorbida por una semilla y la velocidad con la que se realiza esta absorción varían dependiendo de la permeabilidad de la cubierta, de la composición química de las reservas, del tamaño y del contenido de humedad de la semilla, de la temperatura y, por supuesto, de la cantidad de agua disponible (Ching, 1972; Hamabata y Martínez, 1980; Priestley, 1986).

La representación gráfica de la absorción de agua en una

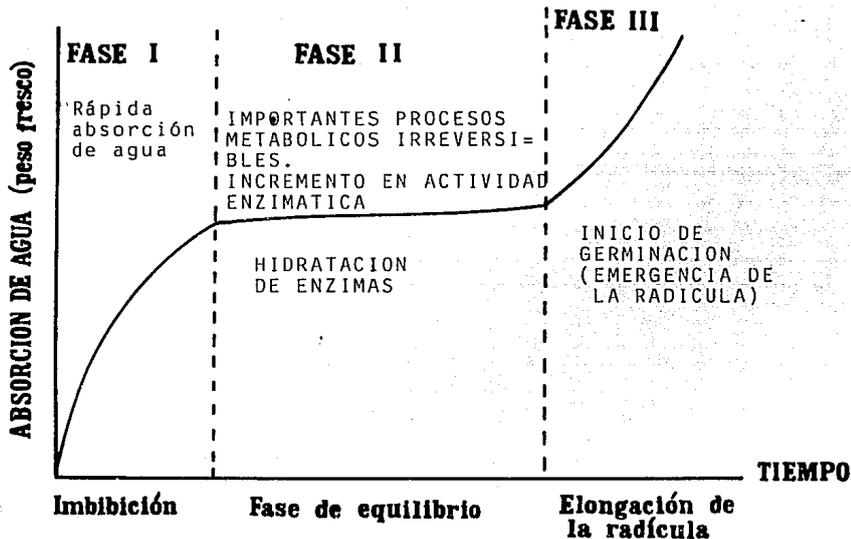


Figura 1. Curva teórica de absorción de agua en una semilla seca. (Tomado de Bewley y Black, 1978.)

semilla "seca", da como resultado una curva sigmoideal negativa (ver figura 1), en la cual se pueden distinguir 3 diferentes fases de imbibición:

FASE I. Consiste en una absorción inicial rápida, la cual aparentemente es un proceso fisicoquímico ya que depende de la diferencia entre los potenciales hídricos dentro y fuera de la semilla. Esta absorción inicial ocurre independientemente de si la semilla es latente o no latente, viable o no viable (Hamabata y Martínez, 1980; Pehap, 1987). La absorción se realiza de la periferia hacia el interior, siguiendo la secuencia de una, dos, y luego múltiples capas de moléculas de agua que rodean a los constituyentes celulares y estructuras de los tejidos de almacenamiento y posteriormente del embrión (Ching, 1972; Hamabata y Martínez, 1980; Simon, 1984; Priestley, 1986; Pehap, 1987). La duración de esta fase es variable dependiendo de la especie; por ejemplo, se ha encontrado que dura de 5-10 min en semillas de frijol soya (Glicine max) y 30 min en semillas de chícharo (Pisum sativum) (Waggoner y Parlange, 1976; citados por Simon, 1984); 40 min en semillas de trigo (Triticum aestivum) (Simon, 1984); y 12 hrs en semillas de Solanum elaeagnifolium (Trione y Cony, 1990). Aunque algunos eventos metabólicos ocurren muy pronto después de la hidratación de enzimas y sustratos, la mayor parte de estos eventos ocurren en la segunda fase.

FASE II. Esta es la fase de equilibrio (periodo lag de absorción), en la cual no hay gran absorción de agua. Las semillas muertas y las latentes mantienen este nivel de hidratación, a diferencia de las semillas en germinación, las cuales entran en la tercera fase (Hamabata y Martínez, 1980; Pehap, 1987). La duración de esta fase depende de la especie y de la temperatura; se ha reportado una duración de 5 hrs en semillas de trigo (Simon, 1984), y 180 hrs en semillas de Solanum elaeagnifolium (Trione y Cony, 1990). En esta fase ocurren los principales eventos metabólicos que preparan a la semilla para germinar, los cuales se discutirán con más detalle en la siguiente sección.

FASE III. En esta fase el aumento en la captación de agua se

asocia con la elongación de la radícula y su emergencia; es decir, con la germinación visible (Hamabata y Martínez, 1980; Pehap, 1987).

b) REACTIVACION DE MACROMOLECULAS Y ORGANELOS

Se dice que las semillas son unidades funcionales "bien equipadas" para germinar, ya que poseen todos los elementos necesarios (componentes bioquímicos y estructurales) para llevar a cabo esta función. La mayoría de estos componentes, es decir, macromoléculas y organelos preexistentes, tales como enzimas, DNA, RNAm, mitocondrias, ribosomas, etc., comienzan a reactivarse al final de la primera fase de hidratación e inicio de la segunda fase (Ching, 1972; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Bewley y Black, 1978; Simon, 1984; Priestley, 1986).

La secuencia y la magnitud de la reactivación son muy importantes para el proceso de germinación. Los primeros pasos son: 1) la activación de las enzimas necesarias para la degradación de los materiales de reserva que proporcionan sustratos para la respiración; 2) el transporte de materiales de una parte de la semilla a otra y de un tejido a otro, especialmente del endospermo al embrión; 3) reactivación de las biomoléculas necesarias para la síntesis de proteínas; y 4) reactivación de organelos en los que se realiza la síntesis de proteínas y la respiración (ribosomas y mitocondrias, respectivamente), (Ching, 1972; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Lehninger, 1978; Bewley y Black, 1978).

c) SINTESIS DE PROTEINAS

La síntesis de proteínas es uno de los procesos biosintéticos más elaborados y complejos que tienen lugar en los organismos vivos (Lehninger, 1975). Se sabe que la maquinaria de síntesis de proteínas proporciona el equipo básico para que las células sinteticen proteínas enzimáticas, estructurales, regulatorias y de almacenamiento (Ching, 1972).

La síntesis de proteínas comienza muy pronto después de la imbibición, y aunque no se conoce con exactitud el momento del inicio, ya que varía entre especies (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Simon, 1984), se ha demostrado que ocurre en un período comprendido entre el final de la primera fase de imbibición y el

transcurso de la segunda (Ching, 1972; Priestley, 1986; Pehap, 1987).

d) RESPIRACION

La respiración es un evento fundamental que proporciona energía a las células aeróbicas (Lehninger, 1978), y dado que la germinación es un proceso que demanda energía, es por lo tanto dependiente de la respiración, la cual puede contemplarse desde dos puntos de vista: 1) intercambio gaseoso y 2) mecanismo bioquímico (el cual dada su complejidad no se expone en este trabajo, consultar entre otros Koslowski, 1972; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Bewley y Black, 1978; Murray, 1984).

INTERCAMBIO GASEOSO

El intercambio gaseoso es la absorción de oxígeno y la expulsión de bióxido de carbono. Algunos de los factores internos y externos que influyen en este intercambio son: contenido de humedad de la semilla, permeabilidad de la cubierta a los gases, el tamaño de la semilla (expresada en volumen o en masa), la edad de la semilla, la viabilidad, la latencia, la temperatura ambiental, el contenido de oxígeno y de bióxido de carbono de la atmósfera y la luz (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Bewley y Black, 1978; Garwood y Lighton, 1990).

Las semillas "secas" (ortodoxas) muestran una tasa metabólica baja, lo cual probablemente es una consecuencia de la carencia de agua (Robets, 1973b; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975). Algunos investigadores están de acuerdo en que si ocurre intercambio gaseoso respiratorio en semillas "secas", éste debe ocurrir a niveles muy bajos, por lo que es casi imposible medir ya sea la absorción de oxígeno o la liberación de bióxido de carbono (por supuesto en semillas ortodoxas). Sin embargo, conforme se incrementa el contenido de humedad de la semilla se produce un incremento en la tasa de intercambio gaseoso (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Bewley y Black, 1978; Hamabata y Martínez, 1980; Simon, 1984; Priestley, 1986; Garwood y Lighton, 1990). Por ejemplo, en semillas de Zea mays el consumo de oxígeno se incrementó de 0.0913 $\mu\text{M}/\text{gr}/\text{hr}$ en semillas con un contenido de

humedad de 11% a 9.38 $\mu\text{M}/\text{gr}/\text{hr}$ cuando el contenido de humedad aumentó a 18%. Incrementos similares se han detectado en semillas de sorgo, trigo y arroz (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975).

Varios autores (Ching, 1972; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Bewley y Black, 1978; Simon, 1984; Priestley, 1986; Garwood y Lighton, 1990) atribuyen una cinética trifásica a la respiración en semillas en imbibición, la cual aparentemente coincide con las fases de imbibición (aunque, Mayer y Poljakoff-Mayber no están muy de acuerdo con esto último). La primera fase se caracteriza por un incremento inicial rápido en las primeras fases de imbibición; la segunda fase es estacionaria (fase lag) en la cual se mantiene casi constante la tasa de respiración, su duración varía dependiendo de la duración de la fase II de imbibición, la cual a su vez depende de la especie y de la temperatura; y por último, un segundo incremento, el cual se asocia con la división celular y con la emergencia de la radícula.

CAPITULO 4

ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS

a) ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS ORTODOXAS

Desde el punto de vista agronómico la mejor forma de almacenar una semilla es la que minimiza los cambios dentro de la misma. La forma convencional de almacenar semillas ortodoxas por largos períodos consiste en colocar a las semillas en alguna condición desfavorable para la reactivación metabólica del embrión pero adecuada para mantenerlo sin daño y vivo por mucho tiempo. Esto puede lograrse reduciendo cuidadosamente su contenido de humedad a niveles menores que los iniciales (i. e. cuando son diseminadas) en atmósferas secas; la deshidratación se realiza hasta lograr que prácticamente no quede agua libre en la semilla, sino sólo aquella que está más o menos integrada a la estructura molecular (Bewley y Black, 1978; Berjak et al., 1984). Después se guardan en recipientes herméticos que se colocan en cámaras refrigeradas (a muy bajas temperaturas, generalmente entre -15°C y -20°C) o incluso en nitrógeno líquido. Teóricamente bajo estas condiciones estables de almacenamiento en frío podrían conservarse con éxito muchas especies con semillas ortodoxas por tiempo indefinido, pero no así en el caso de especies con semillas recalcitrantes.

b) DETERIORO DE SEMILLAS EN ALMACENAMIENTO

La idea de que en todos los organismos vivos ocurre un proceso de deterioro y envejecimiento que conduce inevitablemente a la muerte no es nada alentadora ni confortante para quienes buscan el elixir de la eterna juventud o de la inmortalidad. La experiencia y la información alcanzados a través de los años han permitido al hombre disminuir la velocidad del proceso pero no detenerlo totalmente (Abdul-Baki y Anderson, 1972; Bernal-Lugo, 1987).

En el caso de las semillas, el deterioro implica un cambio degenerativo irreversible (expresado como daño) de las funciones de una semilla que ha alcanzado su grado máximo de madurez fisiológica. Estos cambios degenerativos se producen a varios

niveles: a) bioquímico (disminución en actividad enzimática, biosintética y respiratoria, y cambios en la composición de las reservas alimenticias); b) fisiológico (reducción y retardo en la germinación, disminución en la tolerancia a condiciones ambientales adversas durante la germinación y el almacenamiento); c) citológico (daño en la membrana y en el material genético) y d) morfológico (cambio en el color y en el aspecto general de la semilla) (Abdul-Baki y Anderson, 1972; Roberts, 1973b; Gosh et al., 1981; Priestley, 1986; Bernal-Lugo, 1987).

No se sabe con certeza si estos cambios degenerativos que se manifiestan como daño son la causa o son la consecuencia del deterioro ocasionado por las condiciones ambientales del almacenamiento (Gosh et al., 1981; Bernal-Lugo, 1987). Lo cierto es que existen correlaciones entre condiciones inadecuadas de almacenamiento y deterioro de las semillas.

Una de las formas más generalizadas de medir y expresar el deterioro en las semillas es a través de índices. La mayoría de los autores sugieren que la reducción de la viabilidad (expresada generalmente en porcentaje de germinabilidad) es más útil, aunque recientemente se han adoptado otros enfoques que consideran los cambios bioquímicos o fisiológicos cualitativos y cuantitativos, tales como actividad de enzimas específicas, síntesis de proteínas y carbohidratos, degradación de compuestos de reserva, tasa respiratoria y salida de solutos orgánicos e inorgánicos fuera de las células; sin embargo, estos índices son arbitrarios y los resultados reportados hasta la fecha muestran que la mayoría de ellos no se han estandarizado (Abdul-Baki y Anderson, 1972).

DAÑO GENETICO

Se sabe que, por lo general, casi cualquier combinación de tiempo, temperatura y contenido de humedad que conduzca a la pérdida de viabilidad de semillas en almacenamiento, producirá algún daño genético en los sobrevivientes (Bewley y Black, 1978; King y Roberts, 1980a).

Cuando se incrementa el período de almacenamiento en estado

seco de un lote de semillas dado, se produce un incremento en el daño cromosómico, el cual se manifiesta por un aumento en el número de células aberrantes (Roberts, 1973a; Villiers, 1975; Bewley y Black, 1978). Sin embargo, Villiers (1975) afirma que si se almacenan semillas fotoblásticas en estado de completa imbibición, no se produce ningún incremento en el número de aberraciones cromosómicas.

La mayoría de las células aberrantes en semillas sobrevivientes no persisten más allá de la primera división, pero puede persistir algún otro tipo de daño genético, como las mutaciones de genes recesivos que son enmascarados por su alelo dominante (Bewley y Black, 1978), la acumulación de mutaciones, en particular, mutaciones en genes que codifican para la transcripción del material genético, lo cual resulta en la síntesis de proteínas no funcionales (Bernal-Lugo, 1987) y en la consecuente pérdida de viabilidad y de vigor (Roberts, 1973a; 1973b; Villiers, 1975; Bewley y Black, 1978).

Villiers (1975), quien originalmente postuló la teoría sobre sistemas y mecanismos de reparación, y otros autores como Abdul-Baki y Anderson (1972), Roberts (1973b), Bewley y Black (1979) entre otros, afirman que puede ser posible la reparación de parte del daño genético (y otros tipos de daño, como daño en membranas), cuando las semillas fotoblásticas viables se encuentran completamente imbibidas en condiciones de completa obscuridad, de tal forma que cualquier daño sufrido será reparado continuamente y no se acumulará; pero si el daño es demasiado extensivo al grado de dañar incluso a los mecanismos de reparación, entonces la reparación puede ser imposible.

Es importante tener en mente que cualquier cambio genético producido en las semillas durante el almacenamiento tiene serias implicaciones cuando el almacenamiento se realiza para fines de conservación de germoplasma a largo plazo (Bewley y Black, 1978).

DAÑO A MEMBRANAS

El agua es importante para los organismos no sólo como un

disolvente de las reacciones bioquímicas, sino también como estabilizadora de estructuras (Simon, 1984). Las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas estabilizan la estructura de las macromoléculas y membranas celulares y subcelulares (Simon y Wiebe, 1975; Bewley, 1979; Gaff, 1980; Raison et al., 1980; Simon, 1984; Koster y Leopold, 1988), de tal forma que, en particular, la estructura de las membranas depende de estas interacciones complejas, por lo que frecuentemente son consideradas como sitios primarios de daño por desecación (Koster y Leopold, 1988). De hecho, existe un consenso general de que las membranas celulares son el sitio principal de susceptibilidad al estrés ambiental, principalmente el ocasionado por desecación excesiva y temperaturas extremas en semillas almacenadas (Villiers, 1975; Gosh et al., 1981; Bernal-Lugo, 1987; Hincha et al., 1987; Raison et al., 1987; Koster y Leopold, 1988; Kermode et al., 1989); incluso, uno de los primeros eventos que al parecer están relacionados con la pérdida de viabilidad es la pérdida de integridad de membranas en semillas desecadas (Roberts, 1973b; Hamabata y Martínez, 1980; Gosh et al., 1981; Berjak et al., 1984; Nautiyal y Purohit, 1985b; Priestley, 1986).

En presencia de agua, las membranas se encuentran en un estado dinámico y realizan funciones esenciales para la sobrevivencia de cualquier organismo hidratado; por ejemplo, manteniendo separaciones entre compartimientos subcelulares mutuamente incompatibles (Bewley y Black, 1978) y regulando el flujo de materiales entre estos compartimientos y con el exterior. Las membranas son un medio de control del metabolismo intermediario proporcionando una estructura dinámica para numerosas reacciones enzimáticas (p.e. enzimas respiratorias en mitocondrias); por lo que cualquier perturbación del sistema de membranas, tendrá consecuencias inmediatas en la fisiología celular; en semillas deshidratadas se observan consecuencias inmediatas una vez que se imbebe la semilla (Bewley y Black, 1978; Priestley, 1986).

Cuando las semillas desecadas se colocan en un medio líquido para su hidratación, tienden a liberar una amplia variedad de

constituyentes celulares orgánicos e inorgánicos (lixiviación), en forma tal que sugiere alteraciones en la integridad de la estructura de las membranas (Roberts, 1973b; Bewley y Black, 1978; Stewart y Hanson, 1980; Simon, 1984; Priestley, 1986; Kermodé et al., 1989). Los constituyentes celulares incluyen: aminoácidos, proteínas de bajo peso molecular, nucleótidos, ácidos orgánicos, hormonas, azúcares simples (mono-, di-, y trisacáridos), sales inorgánicas, iones inorgánicos principalmente fosfato y potasio, fenoles, varios materiales fluorescentes y electrólitos en general; cada uno de estos constituyentes tiene una tasa de salida diferente (Abdul-Baki y Anderson, 1972; Bewley, 1979; Hamabata y Martínez, 1980; Simon, 1984; Nautiyal y Purohit, 1985b).

La forma más simple y generalizada de medir la concentración de los solutos que se encuentran en el medio de inmersión es medir la conductividad de la solución (Abdul-Baki y Anderson, 1972; Roberts, 1973b; Simon, 1984); de hecho, desde hace más de un siglo se sabe que la conductividad eléctrica de una solución, en la cual se encuentra inmerso un tejido, se incrementa conforme el tejido envejece y muere (Weber, 1863, Ranke, 1865, citados por Abdul-Baki y Anderson, 1972). En la actualidad, existen varios trabajos que refuerzan estas observaciones en el caso de semillas envejecidas, por ejemplo, el de Simon y Wiebe (1975), en chícharo (Pisum sativum); de Gosh et al. (1981), en arroz (Oryza sativa); de Grazia-Galli y Levi (1982), en Haplopappus gracilis; de Klein et al. (1986), en Triticum aestivum; y el de Koster y Leopold (1988), en Glicine max, Pisum sativum y Zea mayz. También se ha observado que las semillas muertas o envejecidas dejan escapar solutos más rápido que las viables (Bewley y Black, 1978; Simon, 1984; Priestley, 1986). Este incremento en conductividad al parecer es causado por incremento en la permeabilidad de las membranas de los tejidos que mueren (Abdul-Baki y Anderson, 1972; Gosh, et al., 1981).

Los solutos no pueden salir de las células en estado seco, debido a la falta de disolvente, pero una vez que se hidratan, la salida de solutos se convierte en una posibilidad (Simon, 1984).

Se sabe que la salida de solutos es un fenómeno transitorio y al parecer normal en semillas ortodoxas viables, que por lo general dura poco tiempo después de la adición de agua, dependiendo de la especie, la temperatura de imbibición y del estado de la semilla (Bewley, 1979). Esto sugiere que la integridad de las membranas en semillas viables es incompleta por lo menos durante los primeros minutos de imbibición (Bewley y Black, 1978). Por lo general la salida de solutos es más rápida durante los primeros estados de imbibición (Priestley, 1986), pero a medida que la germinación procede, puede darse un cambio en sentido inverso, es decir las membranas recuperan su estructura original (Simon, 1984), ya que se reduce la salida de solutos y eventualmente se detiene cuando las semillas alcanzan un determinado nivel de hidratación, que también depende de la especie (Simon y Wiebe, 1975; Villiers, 1975; Bewley y Black, 1978; y Simon, 1974, 1978, citado por Hamabata y Martínez, 1980). Sin embargo, existe la posibilidad de que en algunos casos las membranas recuperen su estructura original pero que no recuperen totalmente su funcionalidad (Bewley, 1979; King y Roberts, 1980b).

La recuperación de la estructura original de las membranas sólo ocurre en semillas ortodoxas (tolerantes a la desecación), pero en semillas recalcitrantes se producen cambios irreversibles en la estructura de las membranas, que resultan en una pérdida continua y prolongada de solutos a través de las membranas, lo cual es una característica de tejido dañado irreversiblemente (Bewley, 1979). En semillas deterioradas (no viables o con baja viabilidad), las membranas han perdido su integridad (durante el secado), o presentan una menor capacidad para recuperar sus propiedades funcionales, debido probablemente a la presencia de mecanismos de reparación ineficientes, de tal forma que la reparación es imposible (Bewley y Black, 1978; Ellis y Roberts, 1980b; Bernal-Lugo, 1987).

c) PROBLEMAS DE ALMACENAMIENTO EN SEMILLAS RECALCITRANTES

King y Roberts (1980a), Yap (1981); Berjak et al. (1984); Farrant et al. (1985; 1986; 1988); Ellis et al. (1990b), señalan

que existe un considerable número de factores que pueden contribuir a la corta longevidad de semillas recalcitrantes cuando se intenta almacenarlas: daños por desecación, daños por congelación y problemas asociados con el almacenamiento de semillas con alto contenido de humedad, tales como contaminación microbiana y germinación durante el almacenamiento.

DESECACION

Recordemos que, por definición, la deshidratación en las semillas recalcitrantes resulta en una disminución de la viabilidad (Roberts, 1973c). Varios autores (Sasaki, 1976; Bewley, 1979; King y Roberts, 1980a; Chin et al., 1981; Berjak et al., 1984; Nautiyal y Purohit, 1985a; 1985b; 1985c; Farrant et al., 1988; Dood et al., 1989b; Fu et al., 1990), señalan que esta deshidratación produce cambios irreversibles en la estructura y permeabilidad de las membranas de semillas recalcitrantes, lo cual es una de las causas principales de la disminución de la viabilidad en este tipo de semillas.

A diferencia de las semillas ortodoxas, las semillas recalcitrantes mueren por una reducción del contenido de humedad por debajo de algún valor crítico relativamente alto (Owen, 1988). Por ejemplo: Mangifera indica, 40%, Litchi chinensis, 33%, Euphorbia longan, 25%, Theobroma cacao, 19-27% (Fu et al., 1990; King y Roberts, 1980a); Dipterocarpus obtusifolius y D. turbinatus, 45% (Tompsett, 1987); Araucaria araucana, A. angustifolia, A. hunsteinii y A. bidwillii, 25-40% (Tompsett, 1984); Shorea roxburghii y Hopea odorata, 20% (Corbineau y Come, 1986); Hevea brasiliensis, 15-20% (Chin et al., 1981); Shorea roxburghii, 35%, S. almon, 40% S. robusta, 40% (Tompsett, 1985); Shorea robusta, 25% (Nautiyal y Purohit, 1985b); Carapa procera, 33% (Ferraz, 1989).

Villiers (1972, citado por King y Roberts, 1980b), sugiere que el daño por desecación en semillas recalcitrantes puede ocurrir en alguna de dos formas alternativas: 1) la muerte ocurre rápidamente en o por debajo de un contenido de humedad crítico (hipótesis del contenido de humedad crítico) o 2) la pérdida de viabilidad ocurre a una tasa que está relacionada con el contenido de humedad

(hipótesis del contenido de humedad no crítico), es decir, disminución gradual de la viabilidad conforme disminuye el contenido de humedad.

De acuerdo con Villiers (1975), las semillas hidratadas tienen enzimas operacionales, membranas intactas y mecanismos de reparación de membranas que pueden perder su funcionalidad cuando se deseca la semilla. En semillas ortodoxas todos estos efectos son reversibles durante la imbibición; sin embargo, este no parece ser el caso de las semillas recalcitrantes. Es posible que la estructura de ciertas enzimas o proteínas estructurales sea dañada permanentemente por la deshidratación.

Villiers (1975), Bewley y Black (1978), Bewley (1979), y King y Roberts (1980b), sugieren que es posible que el deterioro de la membrana durante la desecación de las semillas recalcitrantes y la consecuente descompartimentalización de la célula podría provocar la liberación de enzimas hidrolíticas durante la imbibición y hacer entrar en contacto muchos componentes celulares tóxicos normalmente aislados, tales como fenoles y radicales libres, los cuales pueden reaccionar inadecuadamente y disminuir por lo tanto la viabilidad de la semilla. Por otro lado, es difícil concebir que la gran variedad de reacciones enzimáticas que conducen a la degradación de reservas y a la síntesis de nuevos componentes se realicen simultáneamente dentro de un sistema homogéneo. Es claro que debe existir una separación de reacciones enzimáticas en espacio y en tiempo; ya que de otra forma, no podrían ocurrir secuencias de reacciones distintas, o la presencia de algunos sustratos, productos o enzimas fuera de lugar y/o tiempo podrían ocasionar un caos metabólico. De tal forma que la compartimentalización es muy importante para separar y modular las reacciones. Quizá por la misma razón, no siempre todos los reactantes están presentes en el sitio de reacción. En tal caso, la movilidad de sustratos y difusión de los productos lejos del sitio de reacción indudablemente constituye importantes limitaciones en las tasas enzimáticas en sistemas parcialmente hidratados (es decir, con bajo contenido de humedad), ya que como veremos más adelante, es

necesario mantener un contenido de humedad específico para que se puedan movilizar las moléculas.

CONGELACION

Existen algunos trabajos que confirman que las semillas de origen tropical con un alto contenido de humedad (recalcitrantes) sufren daños cuando se exponen a bajas temperaturas, lo cual se refleja en la disminución de la viabilidad y en la mayoría de los casos por la muerte de las semillas, la pérdida de la integridad de las membranas y la consecuente salida de solutos de las células, y por la acumulación de intermediarios metabólicos, consecuencia de perturbaciones metabólicas (King y Roberts, 1980a; Raison *et al.*, 1980; Simon, 1984; Corbineau y Come, 1988; Farrant *et al.*, 1988; Ellis *et al.*, 1990a; Fu *et al.*, 1990).

Se han dado varias razones para explicar el efecto deletéreo de las bajas temperaturas en semillas ortodoxas y probablemente algunas de ellas puedan aplicarse al caso de las semillas recalcitrantes; por ejemplo, desnaturalización de proteínas y enzimas, aumento en la viscosidad del citoplasma acompañada por la reducción de la actividad enzimática ó disminución de la fluidez de los lípidos de membranas (King y Roberts, 1980a).

King y Roberts (1982), han observado que la disminución en la viabilidad por disminución de temperatura en semillas de cacao (*Theobroma cacao*), puede ser abrupta, y sugieren tres posibles razones para esta respuesta: 1) alteración metabólica; 2) ausencia de alguna sustancia protectora que esté presente en semillas resistentes al frío; 3) liberación de algún material tóxico debido a cambios en la permeabilidad de la membrana inducidos por las bajas temperaturas.

King y Roberts (1980a), y Roberts y Ellis (1989), proponen que el daño por congelación en semillas húmedas está asociado con la formación de cristales de hielo a contenidos de humedad entre 15 y 20 %, por lo que para sobrevivir a bajas temperaturas deben secarse las semillas.

Ellis *et al.* (1990a), reportan daños por bajas temperaturas (de 10 a 15°C) en semillas de café (*Coffea arabica*) y formación de

cristales de hielo por debajo de 0°C. Otros autores también han observado daños por bajas temperaturas en semillas recalcitrantes, por ejemplo en semillas de la familia Dipterocarpaceae (Ng, 1976; Yap, 1981 y Tompsett, 1987); en semillas de Shorea ovalis (Sasaki, 1976); en semillas de Hopea odorata y Shorea roxburghii (Corbineau y Come, 1986); en Symphonia globulifera (Corbineau y Come, 1988); en varias especies del género Araucaria (Tompsett, 1984).

Bajo ciertas circunstancias las semillas son capaces de los daños por bajas temperaturas debido a que el agua intercelular puede congelarse y la formación de hielo puede deshidratar a la semilla, elevar su potencial osmótico y disminuir el punto de congelación de los constituyentes intracelulares (Roberts y Ellis, 1989). Keefe y Moore (1983, citados por Roberts y Ellis, 1989), muestran que esto puede ocurrir en semillas de lechuga imbibidas. Las semillas pueden también superar los daños por bajas temperaturas cuando se enfrían rápidamente ("super-cooling") y el agua se vitrifica en lugar de cristalizarse (Roberts y Ellis, 1989).

Debido a la susceptibilidad de las semillas recalcitrantes a las bajas temperaturas su almacenamiento bajo tales condiciones puede ser inapropiado (King y Roberts, 1980a).

CONTAMINACION Y GERMINACION DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Debido a que el secado puede ser imposible para semillas recalcitrantes, se ha considerado la posibilidad de almacenarlas en una condición húmeda, lo cual trae como consecuencia contaminación microbiana y germinación durante el almacenamiento. Esto puede ser una restricción importante para la conservación de semillas recalcitrantes (Roberts, 1973c; Sasaki, 1976; King y Roberts, 1980a; Yap, 1981).

Ferraz (1989) observó daño por contaminación en semillas recalcitrantes de Carapa procera y una relación inversamente proporcional entre deshidratación y contaminación.

El incremento en la salida de solutos orgánicos provocada por daño a membranas puede contribuir al crecimiento de microorganismos contaminantes (Bewley y Black, 1978) ya que constituyen un medio

nutritivo para el crecimiento de colonias de bacterias y hongos patógenos, lo cual conduce a la muerte de la semilla (Bewley, 1979; Simon y Wiebe, 1975; Priestley, 1986).

Los hongos que generalmente atacan a las semillas (ortodoxas de interés económico) en almacenamiento pertenecen a los géneros Aspergillus y Penicillium, los cuales pueden crecer bajo las condiciones en las que normalmente se almacenan las semillas (Bewley y Black, 1978; Chistensen, 1978; Moreno, 1987a; 1987b). Sin embargo, algunos tipos de semillas pueden presentar mayor resistencia a la invasión fungal, por ejemplo aquéllas que presentan testas muy duras (Chistensen, 1978).

Cada especie de hongos se encuentra limitada por un cierto valor de contenido de humedad de las semillas por debajo del cual no crece, aunque existen otros factores que también determinan su virulencia, p.ej. la temperatura, la condición de la semilla (estado de salud), la disponibilidad de nutrientes (tipo de reservas de la semilla) y su capacidad para penetrar a la semilla. Los principales efectos deletéreos de los hongos de almacenamiento son: 1) disminución de la viabilidad, 2) producción de micotoxinas, 3) aumento de temperatura y 4) desarrollo de micelio y daño total de la semilla. (Bewley y Black, 1978; Chistensen, 1978; Moreno, 1987a; 1987b).

Bajo contenidos de humedad de la semilla en equilibrio con una humedad relativa del ambiente, por debajo de 69% no crecen los hongos (Bewley y Black, 1978).

Por otro lado, Harrington (1963, citado por King y Roberts, 1980a) considera que en una semilla con un contenido de humedad mayor que 10-13% la invasión microbiana y en particular la fungica pueden disminuir rápidamente la viabilidad de la semilla o provocarle la muerte (Roberts, 1975).

Las bacterias probablemente no juegan un papel significativo en el deterioro de las semillas durante la germinación, a menos que la infección progrese a un nivel de daño obvio, y por otro lado, debido a que las colonias de bacterias necesitan agua libre para su crecimiento, es muy poco probable que puedan desarrollarse en

semillas ortodoxas almacenadas porque éstas por lo general se encuentran en estado seco. Pero si las condiciones fueran de suficiente humedad, podrían facilitar el crecimiento de hongos, los cuales pueden reprimir el crecimiento bacteriana (Bewley y Black, 1978).

Es probable que la combinación de fungicidas, bactericidas, bajo contenido de humedad, y baja temperatura, puedan disminuir la contaminación microbiana al mínimo. Desafortunadamente la susceptibilidad de las semillas recalcitrantes a las bajas temperaturas y a la deshidratación hacen impracticable esta combinación, así que la contaminación microbiana es un problema de primer orden.

d) INVESTIGACIONES PREVIAS EN SEMILLAS RECALCITRANTES

De los pocos trabajos realizados hasta la fecha sobre semillas recalcitrantes podemos citar los siguientes:

- Avicenia marina Berjak et al. (1984); Farrant et al. (1985; 1986).
- Carapa procera Ferraz (1989); Ferraz et al. (1989).
- Dipterocarpaceae Ng (1976); Yap (1981).
- Dipterocarpus obtusifolius Tompsett (1987).
- D. turbinatus Tompsett (1987).
- Euphorbia longan Fu et al. (1990).
- Hevea brasiliensis Chin et al. (1981).
- Hopea odorata Corbineau y Come (1986; 1988).
- Landolphia kirkii Berjak et al. (1990).
- Litchi chinamensis Fu et al. (1990).
- Mangifera indica Corbineau y Come (1988); Fu et al. (1990).
- Podocarpus henkelii Dood et al. (1989a; 1989b).
- Portesia coarctata Probert y Longley (1989).
- Shorea album Tompsett (1985).
- S. ovalis Sasaki (1976).
- S. robusta Nautiyal y Purohit (1985a; 1985b; 1985c); Nautiyal et al. (1985).
- S. roxburghii Tompsett (1985); Corbineau y Come (1988).
- S. tortula Sasaki (1976).
- Sportina anglica Probert y Longley (1989).
- Symphonia globulifera Corbineau y Come (1988).
- Tabebuia avellaneda Kageyama y Márquez (1983).
- T. serratifolia Kageyama y Márquez (1983).
- T. sp Kageyama y Márquez (1983).
- Terminalia brassii Tompsett (1986).
- Thoebroma cacao King y Roberts (1982).
- Ulmus carpinifolia Tompsett (1986).
- Virola surinamensis Cunha et al. (1989).

Esta serie de trabajos tienen varias características en común, por ejemplo:

1) No siguen una técnica de secado estándar bajo condiciones controladas, sino que cada autor utiliza la técnica que considera más conveniente, incluso algunos de ellos (Berjak et al., 1990; Chin et al., 1981; Fu et al., 1990; Tompsett, 1985; 1987), ensayan con dos o más técnicas a la vez para determinar cuál de ellas puede ser la más apropiada. Sin embargo, por los resultados obtenidos podemos darnos cuenta de que cualquiera que sea la técnica y la velocidad de secado, conduce a la pérdida de viabilidad de las semillas en corto tiempo.

2) Para las pruebas de almacenamiento utilizan cajas o bolsas de plástico selladas, pero utilizan temperaturas y humedades ambientales así como períodos de almacenamiento diferentes, lo cual los hace no comparables entre sí. Por supuesto esto es debido a los requerimientos de cada especie.

3) En estos trabajos no controlan con precisión el contenido de humedad de las semillas al momento de almacenarlas; ni tampoco hacen pruebas para determinar el efecto de la disminución gradual del contenido de humedad sobre la germinación y sobre el almacenamiento.

4) En la mayoría de los trabajos en los que se utilizaron varias especies a la vez, no se sigue una metodología uniforme para todas las especies, aun tratándose de especies de la misma familia o del mismo género.

5) La principal característica en común que tienen estos trabajos son los resultados obtenidos: todas las especies estudiadas muestran una disminución parcial o total de la viabilidad conforme se disminuye su contenido de humedad o conforme se incrementa el período de almacenamiento.

Algunos de los autores hacen sugerencias interesantes, por ejemplo, Corbineau y Come (1986; 1988), sugieren utilizar soluciones con presión osmótica adecuada o agentes crioprotectores; Tompsett (1985) sugiere mantener a las semillas en varias

soluciones con varias concentraciones de inhibidores de crecimiento como ABA, utilizar osmóticos u otros métodos que puedan ayudar a mantener a las semillas con un contenido de humedad por arriba del punto crítico. Probert y Longley (1989), sugieren utilizar técnicas de criopreservación, por ejemplo, combinar bajas temperaturas con la aplicación de soluciones estériles de polietilen-glicol (PEG) con potenciales osmóticos por arriba del punto crítico para mantener la sobrevivencia del embrión. Por último, Berjak *et al.* (1990), sugieren imprimir un secado muy rápido ("flash drying"), por ejemplo reduciendo el contenido de humedad hasta un 15% en 1 hora, para evitar cambios conformacionales de las membranas.

Otros investigadores sugieren la posibilidad de estudiar otros métodos alternativos para incrementar la viabilidad de las semillas recalcitrantes en almacenamiento. Por ejemplo King y Roberts (1980b), sugieren el uso de crioprotectores para reducir los efectos dañinos producidos por la concentración de solutos y la formación de hielo a temperaturas por debajo de los 0°C. Vázquez-Yanez (1987), sugiere la aplicación de antioxidantes y hormonas inhibitoras del metabolismo para facilitar la deshidratación y prolongar el tiempo de almacenamiento; sin embargo, King y Roberts (1980a), afirman que el uso de inhibidores naturales de la germinación, para evitar la germinación de semillas recalcitrantes durante el almacenamiento en general ha tenido poco éxito, y ponen en duda la efectividad de inhibidores artificiales como metil-naftalenacetato, o las altas concentraciones de bióxido de carbono utilizadas por otros autores que ellos citan. Por otro lado, afirman que aparentemente no existen inhibidores químicos efectivos disponibles y que los únicos inhibidores de la germinación realmente efectivos y con efectos reversibles pueden ser polietilen-glicol y soluciones de azúcar concentrada, los cuales actúan a nivel osmótico.

Meryman (1966a, citado por King y Roberts, 1980b), identificó algunos de los requisitos que debe cumplir un aditivo protector:

- 1) prevenir la congelación del agua,
- 2) ser un disolvente de electrólitos,

- 3) tener una propiedad de rápida penetración a la célula,
- 4) ser no tóxico,
- 5) tener un bajo peso molecular (menor de 150) y
- 6) tener afinidad por el agua.

CAPITULO 5

EL PAPEL DEL AGUA EN LAS SEMILLAS

El agua tiene propiedades y características que la hacen el líquido más adecuado para mantener la vida de cualquier organismo, ya que es el medio en el cual se llevan a cabo todas las reacciones vitales y en el que se transportan todos los compuestos orgánicos e inorgánicos dentro de cualquier ser viviente.

El agua es importante aun en semillas "secas" (Hamabata y Martínez, 1980), ya que éstas raramente están completamente desprovistas de agua, la cual ejerce una profunda influencia tanto en semillas ortodoxas como en recalitrantes (Priestley, 1986). De hecho una de las principales características que distingue ambos tipos de semillas es su capacidad para tolerar la desecación. Esta diferencia depende de varias características propias de la especie principalmente a nivel de la etapa final del desarrollo ontogénico de las semillas.

a) SECADO EN LA MADURACION DE LAS SEMILLAS

Poco se conoce sobre la maduración en semillas recalitrantes, pero abundan reportes en la literatura sobre la maduración en semillas ortodoxas (consultar entre otros, Kozlowzki, 1972; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Bewley y Black, 1978; Murray, 1984; Kermode et al., 1989); la cual puede dividirse en 3 estados: 1) histodiferenciación, en la cual el cigoto unicelular sufre extensivas divisiones mitóticas, las células resultantes se diferencian para formar el patrón básico del embrión; 2) maduración en ausencia de nuevas divisiones celulares, caracterizada por expansión celular, altos niveles de síntesis de proteínas y de RNA, altos niveles de respiración (Berjak et al., 1984) y deposición de reservas en los tejidos de almacenamiento (generalmente proteínas con lípidos o con carbohidratos); y por último, 3) un período de secado durante la etapa final de la maduración (previo a la liberación de las semillas de la planta progenitora) (Bewley y Black, 1978; Kermode et al., 1989), durante el cual se produce una disminución gradual del metabolismo conforme disminuye el contenido de humedad de las semillas, el cual se reduce a valores muy bajos

(Berjak et al., 1984; Bewley, 1979; Kermodé et al., 1989; Sasaki, 1976); en esta última etapa el embrión pasa a un estado quiescente o inactivo (Kermodé et al., 1989).

Gaff (1980) sugiere que la tolerancia a la desecación es una característica contenida en la información genética y que puede expresarse tanto en la fase vegetativa como en la fase de desarrollo ontogénico y maduración del embrión en semillas ortodoxas.

Existe una variedad de observaciones que sugieren que el secado normal en la maduración es un evento crítico (de hecho, existen reportes que indican que el secado es un prerrequisito indispensable para que se lleve a cabo la germinación normal en semillas ortodoxas, Bewley, 1979; Berjak et al., 1990), durante el cual la semilla se libera del control materno y se prepara para enfrentarse a condiciones ambientales aleatorias, por lo que tiene que proteger sus estructuras y sus sistemas "desconectando" sus funciones. Se producen una serie de cambios celulares y estructurales reversibles, tales como rearrreglos relativamente ordenados de moléculas estructurales de las membranas celulares, cambios en la estructura terciaria de las proteínas, disminución gradual y general del metabolismo, incluyendo disminución en la síntesis de proteínas, en el contenido de RNA total y en la tasa de respiración (Berjak et al., 1984; Bewley, 1979; Kermodé et al., 1989; Simon, 1984).

Las semillas recalcitrantes, por el contrario, son liberadas con un alto contenido de humedad lo cual indica que aparentemente no sufren un período de secado durante la maduración; de hecho, al parecer no requieren de este secado ya que pueden germinar sin ser desecadas (Berjak et al., 1984; 1990; Kermodé et al., 1989). A partir de este hecho surge la inquietud por saber si presentan un desarrollo ontogénico y maduración análoga a la de las semillas ortodoxas antes de que estas últimas entren en la fase de secado (Berjak et al., 1984). Sólo se sabe que mantienen altos niveles de síntesis de proteínas y altos niveles de respiración durante el período de maduración indicando que el embrión no entra en un

estado de verdadera quiescencia, es decir, no ocurre la inducción de la latencia (Sasaki, 1976). Al momento de la liberación no existe una inhibición de la germinación, y además contienen una cantidad suficiente de agua para comenzar a germinar (Berjak et al., 1984). De lo anterior se deduce que cualquiera que sea la señal que marque en una semilla ortodoxa el inicio de la fase de secado en la maduración, y por lo tanto de latencia, está ausente en semillas recalcitrantes (Berjak et al., 1984).

b) EL ESTADO DEL AGUA EN LA SEMILLA

Para entender mejor la interacción entre agua y semilla es necesario analizar los "isotermas de absorción" (ver figura 2), los cuales se obtienen midiendo el contenido de humedad en equilibrio, como una función de la humedad relativa a temperatura constante (Priestley, 1986). Los isotermas de absorción muestran tres zonas bien definidas, cada una de las cuales corresponde a un estado de hidratación en el cual predomina un tipo particular de enlace hídrico (Priestley, 1986). El contenido de humedad que separa una zona de otra puede variar con la especie.

En la zona I predominan enlaces químicos muy fuertes que unen a las moléculas de agua con los grupos amino y carboxilo de las proteínas, con los grupos iónicos de carbohidratos y de lípidos, y otros constituyentes celulares como paredes celulares y membranas (Priestley, 1986). Algunos autores (Drost-Hansen, 1971; Drost-Hansen y Clegg, 1979; citados por Berjak et al., 1984) han aceptado ampliamente los términos de "agua estrechamente asociada" con la superficie molecular, "agua vecinal", "agua estructural" o "agua de enlace" para denominar a la cantidad de agua presente en esta zona de hidratación, la cual es necesaria para: 1) mantener la estabilidad de las estructuras subcelulares, manteniendo la asociación lipoproteína-membrana (la cual es típicamente un sistema hidratado); 2) mantener la estabilidad de las estructuras moleculares (enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos), manteniendo la continuidad de la capa monomolecular de agua que las rodea; y 3) la ordenación de los componentes citoplásmicos solubles, tales como los sistemas multienzimáticos de

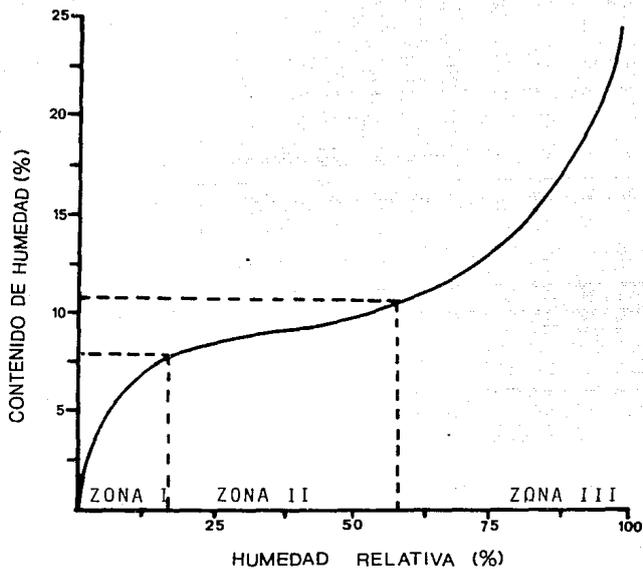


Figura 2. Isothermas de absorción de agua en semillas de *Hibiscus cannabinus* a 20°C. (Tomado de Priestley, 1986.)

las rutas metabólicas (Bewley, 1979; Berjak et al., 1984; Nautiyal y Purohit, 1985b).

Para que una semilla permanezca viva (viable) en una condición "seca" en almacenamiento es necesario que mantenga su contenido de humedad por arriba de la zona I de hidratación, p.ej.: 5% en frijol soya (Glicine max) y 8% en Hibiscus cannabinus (Priestley, 1986); 25% en Shorea robusta (Nautiyal y Purohit, 1985b); 20-30% en Avicenia marina (Berjak et al., 1984); 19-27% en Theobroma cacao (King y Roberts, 1980a).

En la zona II predominan enlaces hídricos menos fuertes (puentes de hidrógeno) entre moléculas de agua "libre" y el "agua estructural" (Priestley, 1986). La presencia de agua comprendida en esta zona es esencial para el movimiento de moléculas de un compartimento celular a otro (Berjak et al., 1984). No se ha detectado movimiento de moléculas a través de los tejidos en la zona I (Duckworth, 1962; citado por Priestley, 1986). Por arriba del límite entre las zonas I y II la difusión se hace gradualmente más evidente conforme incrementa el nivel de hidratación (Priestley, 1986).

La zona III puede considerarse como una región de "agua libre" o "móvil", en la cual dominan fuerzas capilares y osmóticas. No se ha detectado actividad enzimática en la zona I, ésta es muy lenta y casi imperceptible en la zona II, e incrementa con el inicio de la zona III (Priestley, 1986). Esta zona de hidratación (zona III) coincide con la FASE I de imbibición (es importante no confundir zona de hidratación con fase de imbibición, ya que los isoterms de hidratación se refieren al contenido de humedad en equilibrio con la atmósfera y las fases de imbibición se refieren al proceso de germinación).

El deterioro de semillas en almacenamiento depende principalmente de la zona de hidratación con la cual se almacene la semilla y de las condiciones particulares de almacenamiento. Es decir, las semillas ortodoxas pueden tolerar muy bien el almacenamiento si su contenido de humedad está comprendido en la zona I de hidratación, mientras que las semillas recalcitrantes

necesitan mantener su contenido de humedad entre los límites de las zonas II y III.

c) TOLERANCIA A LA DESECACION

Una de las características más sorprendentes de las semillas ortodoxas es su capacidad para tolerar la desecación severa (Priestley, 1986), por lo que pueden considerarse como tipos especializados de organismos tolerantes a la desecación. La mayoría de los estudios sobre los efectos de la desecación a nivel celular en este tipo de organismos se han realizado en algunos procesos metabólicos, en particular, la síntesis de proteínas y de RNA, la respiración, y la estabilidad de membranas (Bewley, 1979).

Bewley (1979), sugiere que la tolerancia a la desecación está relacionada con algunas propiedades inherentes del contenido celular; es decir, la tolerancia es "protoplásmica" y puede caracterizarse por: a) la presencia de mecanismos que limitan el daño durante la desecación, como podrían ser la producción o disponibilidad de sustancias (como sacarosa, aminoácidos, aniones, etc.) para mantener el contenido de agua estructural y así mantener la integridad de las macromoléculas; b) mantener la integridad fisiológica en estado "seco", de tal forma que el metabolismo pueda ser reactivado rápidamente al inicio de la imbibición; c) mantener la integridad nuclear y con ello la integridad del material genético; y d) mantener operativos los mecanismos de reparación de daño principalmente para recobrar la integridad de las membranas y organelos.

Es evidente que los organismos tolerantes a la desecación, como las semillas ortodoxas, muestran cambios celulares y estructurales reversibles (tales como rearreglos relativamente ordenados de moléculas componentes de las membranas, y cambios en la estructura terciaria de las proteínas) cuando son sometidos a desecación extrema (Bewley, 1979; Simon, 1974; Seewaldt et al., 1981 citados por Berjak et al., 1984); estos cambios están ausentes o son dañinos en organismos intolerantes, como en el caso de las semillas recalcitrantes. Además, la falla de cualquiera de las propiedades características de la tolerancia a la desecación

conduce a la pérdida de viabilidad.

Se ha propuesto que las diferencias en la tolerancia a la desecación entre semillas ortodoxas y recalcitrantes puede estar relacionada con diferencias en el estado del agua subcelular en los dos tipos de semillas (Berjak et al., 1984).

CAPITULO 6

METABOLITOS COMPATIBLES Y OSMORREGULACION

Muchos organismos, particularmente las plantas, han desarrollado una variedad de mecanismos sofisticados para sobrevivir en sitios deficientes en agua disponible. Estos mecanismos consisten en equilibrar su fuerza osmótica con el medio que las rodea (osmorregulación); en otras palabras, son capaces de evitar la deshidratación absorbiendo o sintetizando moléculas que actúan como agentes de balance osmótico en respuesta a estrés hídrico (LeRudulier et al., 1984). Estas moléculas, denominadas metabolitos o solutos compatibles u osmoprotectores, como su nombre lo indica, deben ser totalmente compatibles con la función metabólica celular y con la actividad enzimática, y deben ser osmóticamente activas (Reed, 1984). Schobert, (1977, citado por Reed, 1984) sugiere que su función primaria es la de mantener la hidratación de biopolímeros dentro del citoplasma para evitar una pérdida neta de agua, pero también pueden actuar como estabilizadores de la estructura y la función de proteínas y membranas (LeRudulier et al., 1984).

Estrictamente hablando, la osmorregulación es un conjunto de procesos y mecanismos por medio de los cuales las plantas regulan la presión osmótica de sus células, modificando la concentración (número de partículas osmóticamente activas por célula) de solutos celulares, ya sea por adición o remoción, hasta que el potencial osmótico intracelular sea aproximadamente igual al potencial del medio que rodea a la célula; esta adaptación celular es un proceso biológico cardinal que protege a los organismos en contra de los efectos letales de la deshidratación (Turner y Jones, 1980; LeRudulier et al., 1984; Morgan, 1984; Reed, 1984; LaRosa et al., 1987).

Teóricamente, un gran número de compuestos podrían actuar como metabolitos compatibles para realizar estas funciones; sin embargo, un determinado organismo sólo puede utilizar algunos de ellos para cubrir esta necesidad (LeRudulier et al., 1984).

Los principales compuestos involucrados en la osmorregulación

que se han encontrado hasta el momento son: azúcares solubles (particularmente sacarosa), potasio, cloruro, calcio, ácidos orgánicos y aminoácidos libres, específicamente prolina y glicina betaína (Wyn Jones et al., 1977; Stewart y Hanson, 1980; Turner y Jones, 1980; Enoch y Glinka, 1983; Gaff y Loveys, 1984; LeRudulier et al., 1984; Klein et al., 1986; LaRosa et al., 1987; Koster y Leopold, 1988).

En plantas superiores, prolina y glicina betaína son los osmóticos fisiológicos más comunes que se acumulan en el citoplasma en respuesta a estrés hídrico o salino, mientras que los azúcares solubles se acumulan sólo en algunos casos raros (Selinioti et al., 1987). Otros autores (Turner y Jones, 1980), proponen que la prolina y algunos azúcares están implicados como importantes contribuyentes a la supervivencia de células bajo deshidratación, pero no se sabe si esto se debe a su contribución como solutos osmóticos para el mantenimiento de la turgencia, ó a través del mantenimiento de la integridad estructural y fisiológica del citoplasma.

A continuación se resumen los conocimientos que hasta el presente se tienen sobre el papel de los metabolitos compatibles utilizados en este trabajo, y los resultados obtenidos por otros investigadores, que apoyan los argumentos para utilizarlos como protectores o estabilizadores de membranas.

PROLINA

Se ha especulado que la acumulación de prolina podría representar un mecanismo compensatorio para la supervivencia de plantas durante un período de estrés por sequía u otro tipo de estrés. Se ha sugerido que actúa a varios niveles: 1) como un soluto citoplásmico compatible o regulador osmótico (Stewart y Lee, 1974, citados por Lone et al., 1987; Aspinall y Paleg, 1981, citados por Ibarra Caballero et al., 1988); 2) como almacén de nitrógeno y fuente de carbono (Thompson et al., 1966, citados por Lone et al., 1987; Fukutaru y Yamada, 1984); 3) como protector de la estabilidad de membranas y protector en contra de la desnaturalización de enzimas, ocasionada por altas temperaturas o por altas concentraciones de sales (Ahmad et al., 1982; Paleg et

al., 1982, citados por Lone et al., 1987; Paleg et al., 1984); 4) como un agente que incrementa la solubilidad de proteínas (Schobert y Tschesche, 1978, citados por LeRudulier et al., 1984); o incluso 5) como un estabilizador de la maquinaria de síntesis de proteínas (Kardpal y Rao, 1985). Estas actividades propuestas no son mutuamente incompatibles y pueden complementarse unas con otras dentro de un patrón metabólico y ontogénico integrado (Jeffereis, 1980; Jeffereis y Rudmik, 1984; citados por Lone et al., 1987).

Kermode y MacPherson (1954; citados por Stewart y Hanson, 1980) fueron los primeros en describir la acumulación de prolina libre en hojas bajo estrés hídrico. Se propone que la acumulación de prolina tiene un papel adaptativo, ya que la capacidad para acumular altos niveles de prolina libre se relaciona directamente con un incremento en la supervivencia bajo condiciones de estrés hídrico severo, y con una rápida restauración del crecimiento de plantas sometidas a estrés hídrico, después de eliminar el estrés (Stewart y Hanson, 1980). Aunque esto último no está completamente demostrado ya que también existen reportes de casos en los que no hay correlación entre la resistencia a sequía y los niveles de prolina.

También se ha observado ampliamente una acumulación de prolina en una gran variedad de plantas sujetas a estrés hídrico y otros tipos de estrés ambiental (Lone et al., 1987; Klein et al., 1986). Estos son algunos ejemplos: Wyn Jones et al. (1977), encontraron acumulación de prolina en presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio en plántulas de Suaeda monoica, Atriplex spongiosa y Spartiana townsendii. Wyn Jones y Storey (1978, citados por Lone et al., 1987), reportan que el aminoácido prolina es el soluto predominantemente acumulado en plántulas de cebada (Hordeum vulgare) después de un "shock" osmótico. Tymms y Gaff (1979, citados por Gaff y Loveys, 1984) y Gaff (1980) reportan acumulación de prolina en varias especies de plantas sometidas a estrés hídrico. LeRudulier y Valentine (1982, citados por LeRudulier et al., 1984), afirman que la prolina confiere tolerancia en contra de estrés osmótico en bacterias del género Klebsiella. LeRudulier y

Valentine (1983, citados por Lone et al., 1987), han encontrado que la capacidad para producir prolina en exceso puede conferir un incremento en la tolerancia a estrés osmótico en Salmonella typhimurium. LaRosa et al. (1987), reporta acumulación de prolina en células de tabaco.

Cálculos a partir de la literatura muestran que la cantidad de prolina acumulada en hojas de cultivos rara vez excede 50 $\mu\text{mol/g}$ de peso fresco, un nivel que no puede contribuir grandemente al potencial osmótico, a menos que la prolina sea compartimentalizada en una pequeña fracción del volumen total de la célula (Stewart y Hanson, 1980).

Existen pocos trabajos experimentales en los que se ha aplicado prolina externamente; por ejemplo, Christian, (1955, citado por Lone et al., 1987), encontró que la aplicación externa de prolina estimuló el crecimiento de colonias de Salmonella orianenburg sujetas a estrés osmótico, lo mismo que Britten y McClure (1962, citados por Lone et al., 1987) encontraron en E. coli; Lone et al. (1987) aplicaron prolina en una concentración de 10 μM en plántulas de cebada y encontraron que confiere resistencia al estrés. Mientras que, por el contrario, Tymms y Gaff (1979, citados por Gaff y Loveys, 1984) encontraron que la aplicación de prolina externa no tiene efecto protector en hojas desecadas de Borya nitida ni de Myrothamnus flabellifolia.

GLICINA BETAÍNA

La glicina betaína es otro soluto que se acumula en ciertas plantas bajo condiciones de estrés hídrico o de otro tipo. Existen evidencias de que la glicina betaína actúa como: 1) un soluto citoplasmático compatible que puede estabilizar parcialmente enzimas y membranas en contra de algunas perturbaciones (Wyn Jones et al., 1977; Wyn Jones, 1984, citado por Lone et al., 1987); 2) como un osmorregulador generalizado (LeRudulier et al., 1984), que aparentemente protege a las células en contra del daño por congelación (Ahmad et al., 1987), al igual que en contra de los efectos de toxicidad por sales, principalmente cloruro de sodio (Wyn Jones et al., 1977; LeRudulier et al., 1984; Ahmad et al.,

1987).

Wyn Jones et al. (1977), sugieren que los niveles de glicina betaína acumulada en tres especies de plantas halófitas (Suaeda monoica, Atriplex spongiosa y Spartiana townsendii), son lo suficientemente altos como para pensar que el compuesto podría actuar como un osmolito citoplásmico si éste fuera concentrado en el citoplasma y excluido de las vacuolas. También encontraron que los datos tomados de muchos experimentos en tres especies de la familia Chenopodiaceae y seis de la familia Gramineae, muestran una alta correlación ($r=0.85$) entre niveles de glicina betaína y presión osmótica.

Wyn Jones y Storey (1978, citados por Lone et al., 1987), encontraron que en cebada (Hordeum vulgare L.) se acumula más glicina betaína que prolina bajo condiciones de estrés gradual.

Bouillard y LeRudulier (1983, citados por LeRudulier et al., 1984), encontraron que la glicina betaína protege a bacterias del género Klebsiella en contra del estrés osmótico.

LeRudulier et al. (1984) sugiere que sólo células bajo estrés osmótico acumulan niveles significativos de glicina betaína.

Son pocos los trabajos en los que se ha aplicado glicina betaína exógena; por ejemplo, Wyn Jones et al. (1977) y Lone et al. (1987), encontraron que aplicada externamente, en una concentración de 10 $\mu\text{M/g}$ de peso fresco, la glicina betaína incrementa la tolerancia a la salinidad en plántulas de varias especies.. LeRudulier et al. (1984), reportan que si se aplica externamente debe ser en una concentración dentro del intervalo de $1 \times 10\text{E}-5$ a $5 \times 10\text{E}-5$ (o sea de 10 μM a 50 μM). Por último, Ahmad et al. (1987), encontraron que su aplicación exógena incrementa la tolerancia a sales, promoviendo el crecimiento de plántulas de cebada (Hordeum vulgare L.) sometidas a "shock" con cloruro de sodio.

CALCIO

Las evidencias acumuladas sugieren que el calcio (Ca^{++}) actúa como un segundo mensajero en la transducción de señales extracelulares en plantas, al igual que en células animales en las

que es muy conocido su papel como importante regulador de diversos procesos (p.ej. motilidad celular, elongación, neurotransmisión y secreción hormonal), (Owen, 1988).

Varios autores citados por Enoch y Glinka (1983), afirman que se han realizado observaciones que demuestran que en plantas el calcio es necesario para mantener la integridad de membranas y sus características de permeabilidad, lo cual es muy importante, ya que la pérdida de integridad de la membrana puede conducir a la muerte de la célula.

En cuanto a la aplicación externa, Clarkson y Hanson (1980, citados por Enoch y Glinka, 1983), afirman que las plantas tienen un bajo requerimiento de calcio exógeno, por lo que su aplicación puede ser a bajas concentraciones.

AZUCARES SOLUBLES (SACAROSA)

Se ha demostrado que los azúcares solubles protegen a los lisosomas y a los microsomas de los daños por desecación, y que tienen un papel protector en algunos sistemas anhidros (Koster y Leopold, 1988).

La estructura de las membranas puede mantenerse por la presencia de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos que pueden sustituir al agua, la cual es considerada como el estabilizador universal de estructuras (LeRudulier et al., 1984). Esta hipótesis de reemplazamiento de agua sugiere que algunos compuestos poli-hidroxilo pueden sustituir al agua precisamente en su función de estabilizar la estructura de las membranas en estado seco (Webb, 1965, Santarius, 1973 y Crowe, 1977, citados por Koster y Leopold, 1988). Algunas evidencias que apoyan esta hipótesis han sido reunidas por Crowe et al. (1987, citados por Koster y Leopold, 1988), quienes han demostrado que un dímero de la glucosa (la trehalosa), puede efectivamente reemplazar al agua en sistemas de membranas artificiales. La trehalosa se encuentra en muchos organismos tolerantes a la desecación, pero no ha sido detectada en semillas de angiospermas.

Otros azúcares solubles, especialmente la sacarosa, pueden asumir un papel protector en sistemas de membranas artificiales

(Crowe et al., 1984; 1986, citados por Koster y Leopold, 1988). Los resultados obtenidos por Koster y Leopold (1988), apoyan la idea de que la sacarosa puede considerarse como el principal agente responsable de la tolerancia a la desecación en semillas de Glicine max, Zea mays y Pvsum sativum. Estos autores estimaron el grado del daño ocasionado por desecación en las membranas de semillas de estas especies en varios estados de imbibición mediante la medición de la tasa de salida de electrólitos. En algunos casos, encontraron altas tasas de salida de solutos, lo cual es un indicador de que las barreras de difusión fueron dañadas por la desecación y/o la rehidratación.

EL PAPEL DEL ABA EN LAS SEMILLAS

Actualmente se tienen evidencias de que el ABA participa en las respuestas a distintos tipos de estrés (Davies et al., 1980; Owen, 1988; Creelman, 1989), ya que se ha demostrado que por una parte estimula la osmorregulación por acumulación de solutos tales como azúcares, iones como Ca++ y aminoácidos, particularmente prolina (Aspinall, 1980; Gaff y Loveys, 1984; Klein et al., 1986; LaRosa et al., 1987; Owen, 1988); y que por otra parte juega un papel principal en la adaptación de plantas a condiciones ambientales adversas (estrés por sequía, temperaturas extremas, salinidad, inundación, y aún al estrés asociado con el proceso de senescencia), cuando se encuentra en altas concentraciones, ya sea endógeno o aplicado exógenamente (Hiron y Wright, 1973; Mizrahi et al., 1974; Rikin y Richmond, 1976; Aspinall, 1980; Gaff, 1980; Davies y Mansfield, 1980 y Van Steveninck, 1983, citados por LaRosa et al., 1987; Grazia-Gali y Levi, 1982; Eze et al., 1983; Gaff y Loveys, 1984).

Se sabe que la concentración de ABA se incrementa rápidamente en muchas angiospermas en respuesta a niveles moderados de estrés (Zabañal, 1974, citado por Gaff, 1980). Por ejemplo, Gaff (1980), encontró que los niveles de ABA se incrementaron en hojas de Borya nitida y de Myrothamnus flabellifolia durante las primeras etapas de desecación, alcanzando una concentración máxima 20 horas después. Aspinall (1980), encontró que la pérdida de agua en hojas

de trigo (Triticum aestivum) y otras muchas especies induce un rápido incremento en el contenido endógeno de ABA.

Los trabajos en los que se reporta aplicación de ABA en semillas son pocos pero significativos, y son de dos estilos: 1) sobre la tolerancia a la desecación. Por ejemplo, Grazia-Galli y Levi (1982), encontraron que embriones de Haplopappus gracilis imbibidos durante 6-7 días en ABA 10 μM mantuvieron casi completamente la capacidad para germinar después de la deshidratación, mientras que embriones imbibidos en agua durante 9 hrs perdieron completamente su capacidad para sobrevivir la deshidratación; y 2) sobre inhibición de la germinación. Por ejemplo, Milborrow (1974, citado por Kermode, et al., 1989), afirma que la aplicación exógena de ABA inhibe el proceso de germinación en embriones maduros de varias especies, promoviendo al mismo tiempo, algunos procesos de desarrollo (Kermode, et al., 1989).

Los niveles de ABA aplicados exógenamente o encontrados en diversos tejidos y en diversas especies varían desde 134 ng/g de peso fresco, en hojas de Borya nitida (Gaff y Loveys, 1984); 10 μM , aplicado en células de tabaco (La Rosa et al., 1987); 100 μM , aplicado en hojas de Haplopappus gracilis (Grazia-Galli y Levi, 1982); 1 mM, aplicado en hojas de maíz (Davies et al., 1980; Ibarra-Caballero et al., 1988); hasta 38 mM, aplicado en hojas de Myrothamus flabellifolia (Gaff y Loveys, 1984).

CAPITULO 7

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Obtener un conocimiento más preciso e integral sobre ecología y fisiología de la germinación de semillas de siete especies de la vegetación de selva madura de Los Tuxtlas, Ver., para poder proponer técnicas de almacenamiento a largo plazo, con bases sólidas, científicas y no empíricas como se ha venido haciendo hasta este momento.

OBJETIVOS PARTICULARES:

A) ASPECTO ECOLOGICO

Se sabe que las semillas grandes, con alto contenido de humedad pueden ser incapaces de absorber suficiente cantidad de agua para germinar en suelos relativamente secos (Foster, 1986); deben absorber agua en la interfase suelo-semilla más rápido de lo que la pierden para poder germinar (Bewley y Black, 1978). Por esta razón es lógico suponer que no puedan germinar en suelos desnudos donde la evaporación es muy alta, por lo tanto, su germinación puede restringirse a los hábitats húmedos, como el interior de la selva. Por otra parte se sabe que las semillas pequeñas por lo general requieren de luz para germinar (Vázquez-Yanes, 1983; Vázquez-Yanes y Guevara, 1985; Harper et al., 1970), por lo que con frecuencia son incapaces de germinar en el oscuro suelo de la selva.

Decidir si las semillas de las especies utilizadas en este estudio: Diospyros digyna (Ebenaceae), Cupania dentata (Sapindaceae), Cymbopetalum baillonii (Annonaceae), Poulsenia armata (Moraceae), Chamaedorea tepejilote (Palmae), Stemmadenia donnell-smithii (Apocynaceae) y Rheedia edulis (Guttiferae), restringen su éxito germinativo al interior de la selva (es decir, su hábitat natural preferencial), o si pueden germinar fuera de la selva (sitios en los que ha desaparecido el dosel), o incluso con abertura parcial del dosel, como los claros.

B) ASPECTO FISIOLÓGICO

Se sabe por una parte, que la mejor forma de almacenar semillas consiste en reducir su contenido de humedad, y por otra parte, que uno de los principales problemas a los que se enfrentan las semillas recalcitrantes (de corta longevidad) para su almacenamiento es el alto contenido de humedad con el que son liberadas; el cual no puede reducirse sin que las semillas se dañen, ya que la deshidratación es considerada como uno de las principales causas de pérdida de viabilidad en este tipo de semillas. Por esta razón se decidió analizar el efecto de la deshidratación sobre:

- 1) su capacidad de germinación
- 2) la actividad metabólica antes y después de la imbibición.
- 3) la capacidad de las semillas para recuperar el agua perdida

Encontrar la posible relación entre el contenido de humedad con el que son liberadas las semillas de estas especies y su respuesta a la deshidratación con la conducta recalcitrante.

Las membranas son consideradas como sitios primarios de daño por desecación (Koster y Leopold, 1988). Incluso uno de los primeros eventos que parecen estar relacionados con la pérdida de viabilidad es la pérdida de integridad de membranas en semillas desecadas (Roberts, 1973b; Hamabata y Martínez, 1980; Gosh et al., 1981; Berjak et al., 1984; Nautiyal y Purohit, 1985b; Priestley, 1986). Si se colocan semillas desecadas en un medio líquido para su hidratación, tienden a liberar solutos en una forma que sugiere alteraciones en la integridad de la estructura de las membranas (Roberts, 1973b; Bewley y Black, 1978; Stewart y Hanson, 1980; Simon, 1984; Priestley, 1986; Kermodé et al., 1989). Por esta razón se decidió:

- 3) Determinar si la capacidad de germinación está relacionada con la pérdida de integridad celular conforme las semillas pierden agua, utilizando la salida de solutos como un índice de daño.

Se ha reportado que los metabolitos compatibles pueden actuar como estabilizadores de la estructura y la función de las membranas en situaciones de estrés hídrico. Aunque un gran número de

compuestos podrían actuar como metabolitos compatibles para realizar estas funciones, un determinado organismo solo puede utilizar algunos de ellos para cubrir esta necesidad (LeRudulier et al., 1984). Por lo que se decidió:

4) Determinar si la aplicación de soluciones de metabolitos compatibles con distintas concentraciones (prolina, glicina betaína, calcio, sacarosa) y del fitorregulador ABA, estabiliza la integridad celular y con ello ayuda a mantener la capacidad de germinación de semillas deshidratadas.

CAPITULO 8

METODOLOGIA

La metodología que a continuación se relata se realizó paso a paso en la misma forma para las siete especies estudiadas.

AREA DE ESTUDIO

La colecta del material biológico se llevó a cabo en la Estación de Biología Tropical de Los Tuxtlas, Ver., con la autorización del Instituto de Biología.

La Estación se localiza entre 95°04' y 95°09' de longitud Oeste y entre 18°34' y 18°36' de latitud Norte, y con una altitud de 150 a 650 msnm. El clima es cálido húmedo, con temperaturas máximas y mínimas de 29°C y 17°C, respectivamente. La precipitación media anual es aproximadamente de 4500 mm; aunque llueve todos los meses del año, existe lo que se podría llamar una "época de lluvias", que va de junio a febrero, y una "época de secas", que va de marzo a mayo (Ibarra y Sinaca, 1987).

DESCRIPCION DE LAS ESPECIES

Las especies estudiadas fueron elegidas por su alto contenido de humedad, por ser especies de la vegetación original de la selva de Los Tuxtlas. A continuación se hace una breve descripción botánica de las mismas, la cual está basada en el trabajo de Ibarra (1986), por lo que para mayores detalles recomendamos consultar esta publicación.

Diospyros digyna Jacq. (Ebenaceae), nombre común "zapote prieto". Arbol dioico de 20 a 25 m de altura y 50 a 70 cm de diámetro (a la altura del pecho cuando adulto), con contrafuertes de 1.0 a 2.5 m de alto, planos, tubulares. Tronco recto, cilíndrico, ligeramente costillado. Corteza escamosa, de color parda negruzca. Copa densa, redondeada. Hojas simples, alternas, que miden de 8.5 a 18 cm de largo y 3.5 a 7.0 cm de ancho, forma elíptica, base aguda a redondeada, ápice agudo a redondeado, margen entero, haz glabro de color oscuro brillante, envés glabro de color más pálido, venación pinnada con 12 a 16 venas secundarias. Flores estaminadas con cáliz de 4 sépalos de color verde pálido, unidos en

la base; Corola tubular blanca, pubescente y anteras pardo amarillas; pistilo reducido, pubescente. Flores pistiladas con ovario escaso, pubescente y con 4 estilos bien delimitados entre sí. Fruto: baya comestible, de forma subesférica, de color negro, de 35 a 43 mm de largo, 50 a 60 mm de ancho y 40 a 55 mm de grueso, con 6 a 11 semillas por fruto. Semillas angulosas, aplanadas lateralmente y triangulares al corte transversal, de color pardo, miden de 13 a 25 mm de largo, 12 a 14 mm de ancho y 7 a 9 mm de grueso. Fenología: florece de mayo a junio y fructifica de septiembre a noviembre (ocasionalmente desde agosto hasta enero). Se localiza por el Golfo desde Veracruz hasta Yucatán, por el Pacifico en Oaxaca y Chiapas.

Cymbopetalum baillonii R.E.Fr. (Anonaceae), nombre común "huevo de mono". Arbol de 17 a 25 m de altura y 25 a 40 cm de diámetro, con contrafuertes insinuados, de hasta 50 cm de altura. Tronco cilíndrico, ligeramente acostillado (su madera es apropiada para construcción y contrachapado). Corteza lisa, de color pardo negruzco. Copa densa, alargada, relativamente redondeada, con ramas muy cercanas entre sí. Hojas simples, alternas, de forma elíptica oblonga, miden de 6 a 15 mm de largo y de 2 a 8 mm de ancho, base aguda, ápice redondeado, margen entero, haz oscuro, envés más pálido y con ambas caras brillantes y glabras, venación pinnada con 10 a 14 venas secundarias. Flores solitarias, situadas frecuentemente en las cicatrices de hojas caídas, miden de 6 a 11 cm de largo; cáliz con 3 sépalos verdosos, glabros y ovado triangulares; 6 pétalos carnosos, cóncavos, glabros, de color verde amarillento y dispuestos en 2 hileras con 3 elementos en cada una de ellas; estambres y pistilos numerosos, de 2 a 3 mm de largo. Infrutescencia con 8 a 17 frutos cilíndricos por racimo, de color rojo y lustrosos, miden de 15 a 25 cm de largo y de 6 a 10 cm de ancho, con 18 a 35 semillas por fruto. Semillas cilíndricas, aplanadas, de color pardo rojizo y negruzco al secar, cubiertas con un arilo rojizo, miden de 8.5 a 9.0 mm de ancho y 5.5 a 7.0 mm de grueso; endospermo rumiado. Fenología: florece de marzo a mayo y fructifica de febrero a mayo. Se localiza en Veracruz, Tabasco y

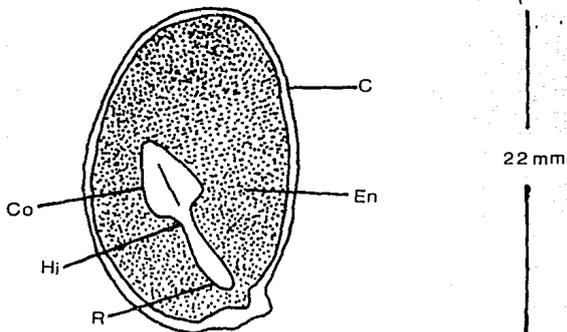


Figura 3. *Diospyros digna*. Representación esquemática de la semilla en sección mediana. C, cubierta seminal; E, endospermo; Co, cotiledón; R, radícula; Hi, hipocótilo. (Tomado de Niembro, 1899.)

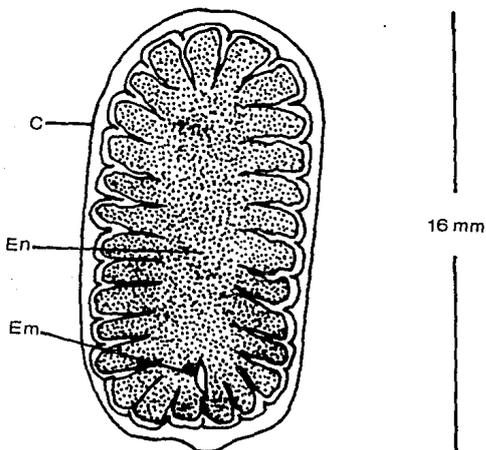


Figura 4. *Cymbopetalum baillonii*. Representación esquemática de la semilla en sección longitudinal. C, cubierta seminal; En, endospermo; Em, embrión. (Tomado de Niembro, 1989.)

Chiapas.

Cupania dentata DC. (Sapindaceae), nombre común "Tepeshi". Arbol de 13 a 25 m de altura y 25 a 40 cm de diámetro, con contrafuertes insinuados de hasta 50 cm de alto. Tronco cilíndrico, recto (usado en la construcción). Corteza lisa, parda. Copa irregular, más o menos densa. Hojas compuestas, en espiral, miden de 13 a 30 cm de largo; ápice truncado, margen crenado, haz oscuro, brillante, glabro, con el envés más pálido, opaco y glabrescente, venación pinnada, con 10 a 14 venas secundarias. Flores de 15 a 30 cm de largo; 5 sépalos libres, glabrescentes, de color verde amarillento, de 1.4 a 1.8 mm de largo y 1.0 a 1.3 mm de ancho; 5 pétalos blancos, libres, de 1.4 a 2.0 mm de largo y 0.6 a 1.0 mm de ancho; 8 estambres blancos, de 2 a 3 mm de largo; pistilo pubescente, de 1.5 a 2.0 mm de largo (comportamiento reproductivo complejo, con cambios de sexo no definidos). Infrutescencia, los frutos son cápsulas de color pardo verdoso, de 13 a 16 mm de largo y 12 a 17 mm de ancho, trivalvados y con 3 semillas por fruto. Semillas triangulares al corte transversal, de color negro, cubiertas casi en su totalidad por un arilo anaranjado, miden de 8 a 11 mm de largo, de 6 a 7 mm de ancho y de 4 a 6 mm de grueso; endospermo escaso. Fenología: florece de junio a julio y fructifica de abril a mayo. Se localiza por el Golfo desde Tamaulipas hasta Quintana Roo y por el Pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas.

Poulsenia armata (Miq.) Standl (Moraceae), nombre común "abasbabi" o "aguatoso". Arbol monoico de 20 a 30 m de altura y 0.5 a 1.0 m de diámetro, con 7 a 15 contrafuertes ligeramente tubulares, de 0.5 m de alto. Tronco recto, acostillado. Corteza variable, habitualmente lisa, de color pardo amarillento; exudado abundante de color pardo claro. Copa abierta, de forma irregular a redondeada. Hojas simples, alternas o en espiral, de forma elíptica, base redondeada, asimétrica, ápice obtuso, margen entero, ligeramente ondulado, haz oscuro brillante, envés más pálido y con ambas superficies glabras, miden de 8 a 30 cm de largo y 4.5 a 15 cm de ancho, con espinas cortas, verdosas con exudado blanco, venación pinnada, con 8 a 14 venas secundarias. Inflorescencias

estaminadas axilares de 2 a 3 cm de largo, aplanadas; 4 sépalos verdosos pubescentes y con ápice redondeado; 4 estambres, pistilo ausente. Inflorescencias pistiladas con 5 a 9 flores; cáliz tubular, con 4 pequeños dientes verde amarillentos, estambres ausentes; ovario unilocular, uniovular, con el estilo dividido en 2. Infrutescencia esférica de 20 a 28 mm de largo, 21 a 30 mm de ancho y 19 a 22 mm de grueso, de color gris verdosa, con 9 a 17 semillas correspondiendo cada una con una drupa individual. Semillas elipsoides, de color amarillo pálido, de 5 a 9 mm de ancho, 4 a 7 mm de ancho y 3.0 a 4.5 mm de grueso. Fenología: florece de abril a junio (ocasionalmente hasta octubre) y fructifica de mayo a junio (ocasionalmente hasta octubre). Se localiza por el Golfo en Veracruz y Tabasco y por el Pacífico en Oaxaca y Chiapas.

Stemmadenia donnell-smithii (Rose)Woodson (Apocynaceae), nombre común "Huevos de burro". Arbol de 10 a 20 m de altura y de 20 a 40 cm de diámetro, sin contrafuertes. Tronco cilíndrico, recto. Corteza lisa, pardo amarillenta, con exudado blanco, lechoso muy abundante. Copa abierta e irregular. Hojas simples, opuestas, decusadas, con exudado blanquecino, de forma elíptica, miden de 5 a 15 cm de largo y 2.5 a 7.0 cm de ancho, base atenuada, ápice acuminado, margen entero, haz oscuro, glabro, con el envés más pálido, glabro, venación pinnada, con 9 a 13 venas secundarias. Inflorescencia de 3 a 6 cm de largo. Flores con 5 brácteas en la base, miden de 4 a 8 mm de largo y de 4 a 7 mm de ancho, de color verde blanquecino, ovadas, desiguales; cáliz con 5 sépalos, verde amarillentos, desiguales entre sí, glabros; corola tubular, amarilla, glabra en el exterior y pubescente en el interior, con 5 lóbulos de 5 a 10 mm de largo; 5 estambres pubescentes, tecas amarillas; ovario bilocular, estigma simple. Frutos, folículos seminados de 4 a 9 cm de largo y 5 a 7 cm de ancho, reniformes, pardo verdosos, con 100 a 120 semillas por fruto. Semillas turbinadas, con numerosas costillas longitudinales, pardas opacas, cubiertas totalmente por un arilo anaranjado a rojo, miden de 7 a 11 mm de largo y 4 a 5 mm de ancho; endospermo presente. Fenología:

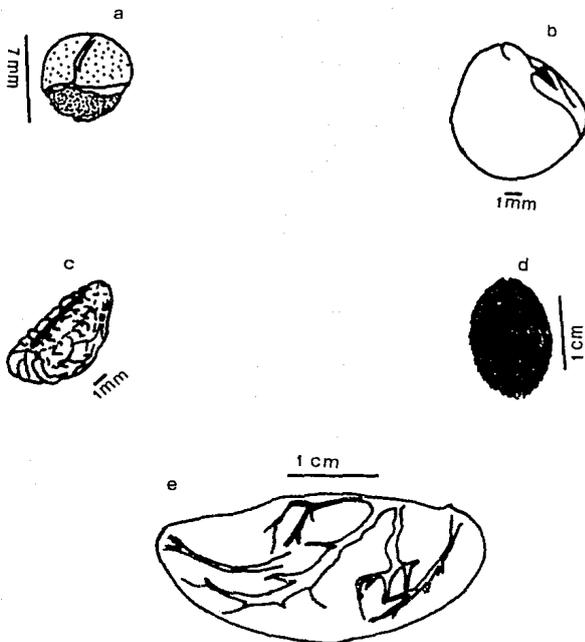


Figura 5. Representación esquemática de semillas de: (a) *Cupania dentata*, (b) *Poulsenia armata*, (c) *Stenadenia donnell-smithii*, (d) *Chamadorea tepejilote* y (e) *Rhesdia edulis*. (Tomado de Niembro, 1988.)

florece de junio a agosto (ocasionalmente desde mayo) y fructifica de marzo a junio (ocasionalmente hasta julio) del siguiente año. Se localiza por el Golfo desde Puebla y Veracruz hasta Tabasco y por el Pacífico en Oaxaca y Chiapas.

Chamaedorea tepejilote Liebm. (Palmae), nombre común "Tepejilote". Palma dioica de 2.0 a 4.5 m de altura y de 2 a 4 cm de diámetro. Tronco generalmente solitario, recto, cilíndrico, con anillos evidentes a todo lo largo, superficie lisa, de color verde pálida a oscura, menos grueso hacia el ápice; frecuentemente con raíces fulcrantes. Hojas divididas, en espiral, miden de 1.0 a 1.5 m de largo; de 20 a 26 segmentos por hoja, que miden de 30 a 50 cm de largo y de 2 a 7 cm de ancho, elípticos, subopuestos, margen entero, haz más oscuro en comparación con el envés y ambas superficies glabras, venación pinnada, con 7 a 8 venas secundarias en ambas superficies. Flores estaminadas; inflorescencias de 15 a 50 cm de largo, y de 4 a 8 flores por nudo; 6 estambres con filamentos blancos y tecas amarillas. Flores pistiladas; inflorescencias similares a las estaminadas, diferenciándose únicamente por la ausencia de estambres. Fruto: Infrutescencia de hasta 50 cm de largo, pedúnculo anaranjado de 30 a 30 cm de largo. Drupa elipsoide de 10 a 15 mm de largo y 6 a 8 mm de ancho, de color negro y brillante, con una semilla por fruto. Semilla elipsoide de color amarillento, mide de 10 a 13 mm de largo y de 5 a 8 mm de ancho. Fenología: florece de septiembre a enero (ocasionalmente de abril a julio) y fructifica de julio a septiembre (ocasionalmente hasta enero). Se localiza en Veracruz, Tabasco y Chiapas.

Rheedea edulis (Seem.) Triana & Planch. (Guttiferae), nombre común "Limoncillo". Árbol dioico de 6 a 8 m de altura y de 15 a 25 cm de diámetro, sin contrafuertes. Tronco cilíndrico, recto. Corteza lisa, pardo negruzca, con exudado amarillo, en gotas. Copa redondeada, estratificada, con las ramas cercanas entre sí, y más o menos densa. Hojas simples, opuestas, de forma elíptica, con exudado amarillento, miden de 13 a 23 cm de largo y de 6 a 8 cm de ancho, base y ápice agudos, margen entero, haz oscuro, glabro, con

el envés más pálido, glabro, venación pinnada, con 50 a 60 venas laterales, casi paralelas. Inflorescencias localizadas sobre nudos en donde han caído las hojas. Flores estaminadas numerosas; 2 sépalos verdosos, unidos en la base, ovados, glabros; 4 pétalos blanco amarillentos; de 18 a 30 estambres, de diferentes tamaños entre sí, filamentos translúcidos, tecas pardas. Flores pistiladas solitarias o pareadas, pistilo de 3 a 4 mm de largo, estigma engrosado. Fruto, baya comestible elipsoide, lisa de 50 a 65 mm de largo, 40 a 60 mm de ancho y 35 a 40 mm de grueso, exocarpo de color amarillo y mesocarpo blanco, con 4 a 5 semillas por fruto. Semillas elipsoides, ligeramente triangulares, de color pardo, sin endospermo, miden de 30 a 45 mm de largo, de 16 a 21 mm de ancho y de 11 a 13 mm de grueso. Fenología: florece de marzo a abril (ocasionalmente desde febrero) y fructifica de agosto a septiembre (ocasionalmente hasta noviembre). Se localiza por el Golfo en Puebla, Veacruz y Tabasco y por el Pacifico en Oaxaca y Chiapas.

RECOLECCION DE LAS SEMILLAS Y TRANSPORTE

Como es frecuente en los árboles de las selvas húmedas, cada una de las especies estudiadas tiene un corto período de fructificación variable y cambiante en el año; a continuación se listan los meses en los que fueron colectadas las semillas:

ESPECIE	FAMILIA	FECHA DE COLECTA
<u>Diospyros digyna</u> Jacq.	Ebenaceae	Enero 1989 y 1990
<u>Cupania dentata</u> DC.	Sapindaceae	Abril 1989 y 1990
<u>Cymbopetalum baillonii</u> R. E. Fr.	Annonaceae	Abril 1989 y 1990
<u>Poulsenia armata</u> (Miq.) Standl.	Moraceae	Junio 1989 y 1990
<u>Stemmadenia donnell-smithii</u> (R.) W.	Apocynaceae	Junio 1989 y 1990
<u>Chamaedorea tepejilote</u> Liebm.	Palmae	Agosto 1989 y 1990
<u>Rheedia edulis</u> (Seem.) Trian & Plan.	Guttiferae	Agosto 1989 y 1990

Los frutos se colectaron directamente del árbol, trepando cuando fue posible, o cortando ramas con frutos con ayuda de una garrocha. Se tomaron muestras de 5 individuos como mínimo. Los frutos colectados se mezclaron dividiendo la muestra en 2 partes: una para los experimentos de campo y otra para los de laboratorio.

Los experimentos de campo se realizaron en la estación de Los Tuxtles; para los cuales se seleccionó al azar una tercera parte de los frutos colectados, de los que se extrajeron y lavaron las semillas, seleccionando para la siembra sólo aquellas que estuvieran en buen estado físico (es decir, que no mostraran daño por depredación o por patógenos).

Los experimentos de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Fisiología Ecológica del Centro de Ecología (UNAM), en la Ciudad de México. Las semillas fueron transportadas en los frutos para evitar la desecación, ya que éstas pierden agua rápidamente; de tal forma, los frutos fueron colocados en cajas de madera bien ventiladas ("huacales"), y transportados a la Ciudad de México en un plazo no mayor de 24 hrs.

A) ASPECTO ECOLOGICO (EXPERIMENTOS DE CAMPO)

SIEMBRA:

De la muestra destinada a los experimentos de campo se tomaron lotes de 50 semillas con 6 repeticiones y se sembraron en cada uno de los siguientes sitios:

- 1) interior de la selva (control).
- 2) claro de aproximadamente 400 metros cuadrados.
- 3) fuera de la selva (sitio abierto).

Las semillas se sembraron sobre el suelo, protegiéndolas con una malla de alambre para evitar la depredación o el arrastre por lluvia.

En cada sitio se estimó la viabilidad (o capacidad de germinación) de cada especie.

MICROCLIMA:

Con el fin de hacer una evaluación de las diferencias entre los tres sitios, se midió en cada uno de ellos el microambiente en el momento de la siembra, registrando:

1) temperatura del aire (°C): la temperatura se registró con un teletermómetro (YSI modelo 44TD serie 6513) colocando la terminal a 10 cm sobre el suelo en cinco puntos en cada sitio de siembra. Se tomaron registros cada hora durante un día despejado para caracterizar la marcha diurna.

2) temperatura del suelo (°C): la temperatura del suelo se registró de la misma forma que se indica en el inciso anterior, utilizando una terminal especial para suelo que penetra a una profundidad de 5 cm. También se registró cada hora a lo largo de un día despejado.

3) humedad ambiental (% HR): se midió la humedad del ambiente con un hidrómetro (TAYLOR modelo 5P-377) a una altura de 10 cm sobre el suelo, cada hora durante 1 día.

4) humedad del suelo (% base húmeda): la humedad del suelo se determinó por el método gravimétrico. Se tomaron 5 muestras de suelo para cada sitio en frascos bien tapados. En el laboratorio se obtuvo el peso fresco y el peso seco en una balanza semianalítica (OHAUS modelo B300D), y se calculó el contenido de humedad por la

fórmula (peso fresco - peso seco)/peso fresco X 100.

B) ASPECTO FISIOLÓGICO (EXPERIMENTOS DE LABORATORIO)

CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS SEMILLAS:

Para determinar el contenido inicial de humedad se tomaron muestras de 100 semillas, se obtuvo el peso fresco de cada semilla en una balanza semianalítica (OHAUS modelo B300D), y se colocó a cada una de ellas en una bolsa de papel. Posteriormente, se secaron en estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 hrs, y se pesaron nuevamente. El contenido de humedad se calculó por medio de la fórmula de Evans (1972, citado por Nautiyal y Purohit, 1985a):

$$\text{CONTENIDO DE HUMEDAD (\%)} = \frac{\text{PESO FRESCO} - \text{PESO SECO}}{\text{PESO FRESCO}} \times 100$$

PREPARACION DE LAS SEMILLAS:

1) Se extrajeron las semillas de los frutos manualmente o con ayuda de una navaja cuando fue necesario. Se lavaron con hipoclorito de calcio al 1% para disminuir los riesgos de contaminación por microorganismos (hongos y bacterias).

2) Se eliminaron todas aquellas semillas que presentaron daño físico aparente.

3) El total de semillas obtenidas se separó en 7 lotes de igual número de semillas ($n=700$), cada uno de los cuales recibió un tratamiento diferente. La aplicación de los tratamientos se realizó colocando las semillas durante 48 hrs en cajas de acrílico, las cuales contenían las siguientes soluciones:

- a) control (tal como fueron extraídas de los frutos)
- b) agua desionizada (como control de hidratación)
- c) prolina ($10 \mu\text{M}$)
- d) glicina-betaína ($100 \mu\text{M}$)
- e) cloruro de calcio (20 mM)
- f) sacarosa (0.5 M)
- g) ácido abscísico ($10 \mu\text{M}$)

Las concentraciones utilizadas para cada solución fueron calculadas con base en datos reportados por otros investigadores. Aunque, en la mayoría de los casos, los reportes indican concentraciones encontradas en tejidos o en células, ya sea en

semillas o en plantas completas, y sólo unos cuantos reportan concentraciones de soluciones aplicadas exógenamente (capítulo 6).

El tratamiento con agua desionizada se aplicó con el objetivo de separar el efecto de los metabolitos del efecto "priming". De acuerdo con Simon (1984) cuando una semilla se coloca en una solución X en lugar de colocarla en agua pura, los solutos entran en la semilla junto con agua. Por otra parte, Pehap (1987) propone que en semillas deshidratadas después de una hidratación previa ("priming") ocurren eventos que adelantan la germinación, los cuales son "recordados" y no tienen que ser repetidos para que ocurra la germinación.

4) Después de transcurridas las 48 horas, se sacaron las semillas de las soluciones y se lavaron nuevamente con hipoclorito de calcio.

DESHIDRATACION

Las semillas de cada tratamiento se deshidrataron a temperatura ambiente en una secadora de flujo de aire (construida ex profeso en el mismo laboratorio), colocando las semillas de cada tratamiento sobre cuadros con malla de plástico, para permitir el flujo de aire. Se pesaron las semillas constantemente para saber en qué momento alcanzaban los contenidos de humedad deseados (100%, 80%, 60% y 40% sobre el contenido de humedad inicial de cada especie). Es decir, si el contenido de humedad real de la semilla es de 50% en base fresca, deshidratar a la semilla hasta un 80% significa que la semilla ha perdido 20% de su contenido de humedad real, o sea, que el contenido de humedad real de la semilla es de 40% en base fresca. Se utilizó esta forma de expresar la deshidratación de las semillas para uniformizar los resultados y poder hacer una comparación entre especies, debido a que cada especie tiene un contenido de humedad inicial diferente. Así, semillas deshidratadas 40% tienen un contenido de humedad relativo de 60% y semillas deshidratadas 60% tienen un contenido de humedad relativo de 40%. Al mismo tiempo se determinó la velocidad de deshidratación de las semillas de cada especie.

Una vez que se alcanzaron los contenidos de humedad (o niveles

de deshidratación) deseados, se sacaron las semillas de la secadora y se procedió de la siguiente forma:

REHIDRATACION: Para conocer la velocidad de rehidratación semillas con diferente nivel de deshidratación, se colocaron 70 semillas de cada condición en pequeños vasos de plástico con una capacidad de 25 ml (una semilla por vaso) que contenía agua desionizada y se registró a intervalos regulares el incremento de peso de cada semilla.

RESPIRACION: La tasa de respiración se determinó utilizando el método de titulación con ácido clorhídrico (HCl) del bióxido de carbono fijado en una solución de hidróxido de bario. Para esto se colocaron 10 semillas con cada nivel de deshidratación (con 21 repeticiones) en pequeñas bolsas de malla de plástico suspendidas en un frasco con una solución de hidróxido de bario 50mM, se taparon y sellaron perfectamente los frascos para evitar el intercambio de gas con el medio exterior. Los frascos se colocaron durante 48 horas en las cámaras de germinación bajo las mismas condiciones que para los experimentos de germinación. posteriormente se sacaron las semillas de los frascos y se determinó la concentración de bióxido de carbono fijada en la solución de hidróxido de bario por titulación con HCl 10mN, utilizando un potenciómetro (CHEMCADET modelo 5983). Para analizar los cambios en la tasa de respiración durante el proceso de germinación, se midió la tasa de respiración antes de la imbibición y después de la imbibición (al final del proceso de germinación).

GERMINACION: Las semillas de cada tratamiento (combinación de metabolitos y nivel de deshidratación) fueron colocadas en cajas de acrílico con tapa, con dimensiones de 25 cm de ancho x 35 cm de largo x 10 cm de alto con un litro de agar al 1%. En cada caja se sembraron lotes de 50 semillas con 3 repeticiones. Las cajas se colocaron en cámaras de germinación (Conviron E-15, Winnipeg, Canadá) bajo condiciones controladas: temperatura fluctuante de 20 a 25°C, fotoperíodo de 12 hrs luz/12 hrs de oscuridad, y con una humedad relativa de 98%. Se consideró que una semilla había germinado cuando se mostraba la emergencia visible de la radícula.

DAÑO CELULAR: Se colocaron 10 semillas de cada tratamiento (combinación de metabolitos compatibles y nivel de deshidratación) en pequeños vasos de plástico con una capacidad de 25 ml (una semilla por vaso) con agua desionizada (en la misma forma que para la determinación de la rehidratación), y se determinó la salida de solutos midiendo la conductividad del agua al final de la imbibición (período variable entre especies) en la que se sumergieron las semillas, con un conductímetro (Conductivity Meter Jenway Modelo 4070).

ANALISIS DE DATOS

El análisis estadístico de datos se realizó utilizando el programa "Statgrafics" versión 2.1.

CONTENIDO DE HUMEDAD: Las diferencias en contenido de humedad entre especies se analizaron por medio de un análisis de covarianza, considerando el peso de las semillas como covariable.

DESHIDRATAACION: La velocidad de deshidratación se calculó como la pendiente promedio de las curvas ajustadas por regresión. Las diferencias se analizaron por medio de un análisis de covarianza considerando el peso fresco como covariable.

REHIDRATAACION: El porcentaje de agua absorbida se calculó de la siguiente forma: (peso del agua absorbida/peso final de la semilla) X 100. Se obtuvieron las curvas de hidratación graficando el porcentaje promedio de agua absorbida con respecto al tiempo, en semillas con diferente nivel de deshidratación y se obtuvieron las funciones de las curvas de hidratación para estimar la duración de las fases I y II de hidratación calculando la tangente de la curva. La velocidad de hidratación de la fase I se calculó por medio de un análisis de regresión utilizando la tangente de la curva.

El contenido de humedad relativo final se calculó de la siguiente forma: [(% de agua absorbida/ contenido de humedad real de la especie) X 100] + contenido de humedad relativo inicial. Ejemplo: si una semilla de C. dentata (CH real=44.0%) con un contenido de humedad relativo inicial de 80% absorbió 11.54% de agua, entonces: CH relativo final = ((11.54/44.0) X 100) + 80 =

106.23%. Las diferencias en contenido de humedad relativo final se analizaron por medio de un análisis de varianza de una vía.

RESPIRACION: Las diferencias en la tasa de respiración se analizaron por medio de un análisis de varianza de dos vías, considerando como efectos principales el tiempo (antes y después de la imbibición) y el nivel de deshidratación de las semillas.

GERMINACION Y CONDUCTIVIDAD: Las diferencias en porcentaje de germinación y conductividad del agua de inmersión se analizaron por medio de un análisis de varianza factorial 4 X 7, considerando el nivel de deshidratación y la aplicación de metabolitos como los efectos principales. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tuckey al 0.05 de significancia.

TIEMPO DE GERMINACION: El tiempo de germinación se define como "el intervalo de tiempo que transcurre desde el momento en que se inicia la germinación en una muestra de semillas, hasta que la última semilla viable ha germinado".

GERMINACION EN EL CAMPO: El análisis de las diferencias en la germinación de las semillas de las especies estudiadas en condiciones de campo se realizó por medio de un análisis de varianza aglutinando los datos de las siete especies en cada sitio, considerando como factores principales las especies y los sitios.

CAPITULO 9
RESULTADOS Y DISCUSION

Para una exposición más clara de los resultados, primero se presenta un análisis de la variación en el contenido de humedad y en la velocidad de deshidratación en las siete especies estudiadas. Posteriormente se analiza para cada especie la influencia de los factores principales (deshidratación y aplicación de soluciones de metabolitos compatibles) por separado y la interacción entre ambos sobre la germinación de las semillas y la conductividad del agua de inmersión de las mismas; y se analiza el efecto de la deshidratación sobre la tasa respiratoria y sobre la rehidratación de las semillas.

9.1 CONTENIDO DE HUMEDAD

Las semillas de las especies estudiadas son dispersadas con contenidos de humedad diferentes, los cuales van desde 38.6% en P. armata hasta 49.7% en D. digyna. Estos contenidos de humedad son relativamente altos comparados con los que se reportan en semillas ortodoxas, de 20% o menos, de acuerdo con la definición de Roberts (1973b).

TABLA 1. CONTENIDO DE HUMEDAD Y PESO FRESCO Y SECO POR ESPECIE (MEDIA \pm DESVIACION ESTANDAR) n=100.

ESPECIE	PESO FRESCO (g)	PESO SECO (g)	CONTENIDO DE HUMEDAD (%)	GRUPOS HOMOG.
<u>P. armata</u>	0.15 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	38.60 \pm 3.71	*
<u>C. tepejilote</u>	0.29 \pm 0.12	0.17 \pm 0.07	40.08 \pm 4.75	*
<u>S. donnell-smithii</u>	0.09 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	40.26 \pm 6.24	*
<u>C. dentata</u>	0.26 \pm 0.03	0.15 \pm 0.02	44.00 \pm 4.72	**
<u>C. baillonii</u>	0.53 \pm 0.07	0.29 \pm 0.05	45.02 \pm 7.06	**
<u>R. edulis</u>	4.88 \pm 1.30	2.67 \pm 0.76	45.63 \pm 3.26	**
<u>D. digyna</u>	2.09 \pm 0.27	1.06 \pm 0.11	49.74 \pm 6.47	***

Se encontró que el contenido de humedad inicial difiere significativamente ($F=91.18$, $gl=6,692$, $P<0.00001$) entre especies, formándose 3 grupos homogéneos (marcados con uno, dos y tres asteriscos en la tabla 1). Como se puede observar, la variación en peso fresco y en peso seco entre especies es mayor que la variación en contenido de humedad (a pesar de las diferencias estadísticas), ya que en dos especies (*R. edulis* y *D. digyna*) el peso varía en dos órdenes de magnitud con respecto a las demás especies. Esto quiere decir, que la proporción de agua que contienen las semillas de estas especies con respecto a su biomasa es un parámetro más constante que la biomasa misma. Esto sugiere que el contenido de humedad es independiente del tamaño de las semillas (si éste es expresado en peso fresco), ya que las diferencias en peso no se reflejan en la variación del contenido de humedad. Harper et al. (1970), Roberts (1973b), Tompsett (1985) y Foster (1986) afirman que las semillas más grandes son liberadas con contenidos de humedad mayores que las semillas más pequeñas; de tal forma se esperaría que existiera una relación directa entre el tamaño de la semilla y su contenido de humedad; sin embargo, los datos indican que no se cumple esta relación en las especies estudiadas.

9.2 DESHIDRATAACION

En la tabla 2 se muestra el contenido de humedad real de cada especie correspondiente a los niveles de deshidratación. Como se puede notar, el contenido de humedad real de semillas deshidratadas 60% es menor de 20% para todas las especies; este 20% es

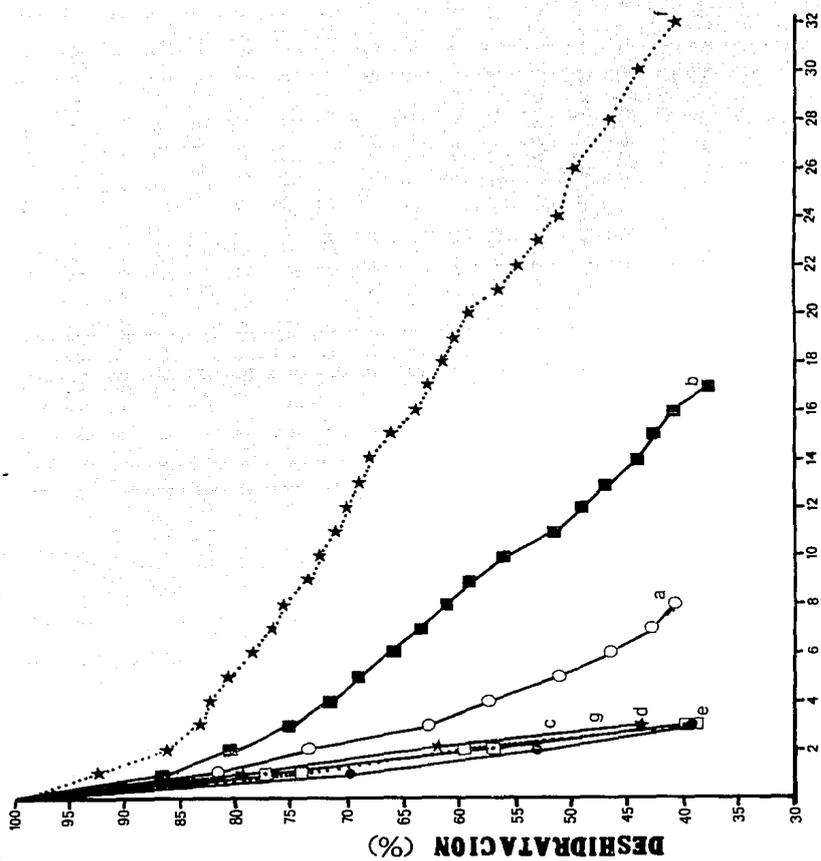
considerado como el contenido de humedad por debajo del cual las semillas recalcitrantes sufren daños irreversibles por desecación.

Se encontró que la velocidad de deshidratación difiere significativamente ($F=450.15$, $gl=6,41$, $P<0.0001$) entre especies (tabla 3, figura 6). Las semillas de S. donnell-smithii, C. tepejilote y P. armata, mostraron las mayores velocidades de deshidratación, las cuales varían entre -19.36 y -18.53%, pero la prueba de comparación múltiple indicó que esta variación no es significativa. Lo cual quiere decir que las semillas de estas tres

TABLA 2: CONTENIDO DE HUMEDAD REAL (%) DE CADA ESPECIE.
(MEDIA \pm DESVIACION ESTANDAR) $n=100$.

ESPECIE	NIVEL DE DESHIDRATACION			
	0%	20%	40%	60%
<u>D. digyna</u>	49.74	39.79	29.84	19.89
<u>C. dentata</u>	44.00	35.20	26.40	17.60
<u>C. baillonii</u>	45.02	30.02	27.01	18.01
<u>P. armata</u>	38.60	30.88	23.16	15.44
<u>C. tepejilote</u>	40.08	32.06	24.05	16.03
<u>R. edulis</u>	45.63	36.50	27.38	18.25
<u>S. donnell-smithii</u>	40.26	32.21	24.16	16.10

especies se deshidratan aproximadamente a la misma velocidad. Estas especies mostraron las mayores velocidades de deshidratación debido probablemente a las características de retención de agua de las semillas, como mencionan Nellist y Hughes (1973), es decir, a la combinación de un tamaño pequeño (relación superficie/volumen grande) y una cubierta delgada (tabla 3). La semillas de C. baillonii, mostraron una velocidad de deshidratación intermedia (-15.37), lo cual puede deberse a que estas semillas presentan un



TIEMPO (días)

Figura 6. Deshidratación promedio en semillas de (a) *Diospyros dignyna*, (b) *Cupania dentata*, (c) *Cymbopetalum baillonii*, (d) *Poulisia armata*, (e) *Chamaedorea tepejilote*, (f) *Rheedea edulis* y (g) *Stemmadenia donnell-smithii*.

tamaño relativamente mayor y cubierta gruesa (leñosa), sin embargo, el endospermo muestra surcos o pliegues que incrementan la relación superficie/volumen, lo cual probablemente sea la causa de una alta velocidad de deshidratación a pesar de su tamaño.

Las especies que mostraron las menores velocidades de deshidratación en orden progresivo fueron *D. digyna*, *C. dentata* y *R. edulis*, aunque las dos últimas no son diferentes estadísticamente. La menor velocidad de deshidratación que mostraron estas especies puede deberse a una combinación de factores, por una parte, al tamaño de las semillas (relación superficie/volumen pequeña) y a las características de la

TABLA 3: VELOCIDAD DE DESHIDRATACION (%) DE CADA ESPECIE Y SU RELACION CON ALGUNAS PROPIEDADES DE LAS SEMILLAS (Basadas en Niembro, 1988; 1989). r =Coef. Correlación.

ESPECIE	VELOCIDAD	r	CUBIERTA	RESERVAS
<i>S. donnell-s.</i>	-19.36	-0.99	delgada, membranosa.	lípidos.
<i>C. tepejilote</i>	-19.20	-0.93	delgada, fibrosa.	lípidos
<i>P. armata</i>	-18.52	-0.99	delgada, lisa.	lípidos.
<i>C. baillonii</i>	-15.37	-0.97	leñosa, lisa.	lípidos y galactomananas.
<i>D. digyna</i>	- 6.87	-0.96	gruesa, ósea.	lípidos y hemicelulosa.
<i>C. dentata</i>	- 3.23	-0.98	delgada, leñosa, lisa.	lípidos y almidón.
<i>R. edulis</i>	- 1.59	-0.99	deldaga, dura, lisa.	lípidos, almidón y resinas.

cubierta (tabla 3), (aunque no se hicieron determinaciones de permeabilidad de la cubierta, podemos suponer que presentan una menor permeabilidad a la salida de agua); y por otra parte a la presencia de carbohidratos en sus reservas, principalmente almidones. Nellist y Hughes (1973), Bass (179) y Simon (1984), mencionan que las semillas que almacenan principalmente proteínas y almidón retienen el agua con mayor fuerza que las que almacenan

y almidón retienen el agua con mayor fuerza que las que almacenan lípidos, debido a que los primeros son más higroscópicos y los últimos son más bien hidrofóbicos. Esta podría ser otra de las razones por las cuales existe una diferencia en las velocidades de deshidratación entre estas especies. Es decir, el primer grupo de especies (las primeras tres en la tabla 3) que mostraron mayores velocidades de deshidratación, contienen lípidos como principal fuente de reservas; C. bailloni que mostró una velocidad intermedia, además de lípidos almacena galactomananas; y las tres restantes, las que presentaron menores velocidades de deshidratación, además de almacenar lípidos almacenan almidón.

A continuación se detallan los resultados obtenidos en cada una de las especies estudiadas.

9.3 Diospyros digyna

Al analizar el efecto general de la deshidratación impuesta en semillas de D. digyna recién colectadas sobre su capacidad de germinación, se encontró que únicamente las semillas más deshidratadas mostraron una disminución significativa ($F=102.52$, $gl=3,56$, $P<0.00001$) en el porcentaje de germinación final con respecto a las semillas no deshidratadas (figura 7). Lo anterior indica que sólo una severa deshidratación afecta la capacidad germinativa en semillas de D. digyna; sin embargo, no hay una pérdida total de viabilidad, como sería lo esperado para una semilla recalcitrante. Es decir, de acuerdo con Owen (1988), se produce una pérdida total de la viabilidad y muerte en semillas recalcitrantes cuando su contenido de humedad se reduce por debajo de algún punto crítico relativamente alto. Esto nos conduce a formular dos hipótesis, una es que las semillas de esta especie no son recalcitrantes típicas, y la otra que sí lo son, pero que el máximo nivel de deshidratación al que fueron sometidas no es tan crítico para ellas.

La germinación es el resultado de una serie de procesos y eventos que tienen lugar dentro de las semillas. Estos procesos pueden verse afectados tanto por las condiciones externas (factores ambientales) como por las condiciones internas (estado de maduración, edad, estado de salud, etc.). De tal forma que, si mantenemos las condiciones externas en un nivel óptimo constante, entonces las variaciones en la respuesta germinativa podrán atribuirse únicamente a los cambios en las condiciones internas de las semillas.

Así, encontramos que la disminución en el porcentaje de germinación observada en las semillas de D. digyna más deshidratadas podría atribuirse a cambios en sus condiciones internas, por ejemplo, en el estado de sus membranas. Esto si aceptáramos la hipótesis de que la deshidratación provoca alteraciones en la estructura de las membranas (Bewley y Black, 1978; Priestley, 1986; Koster y Leopold, 1988), y la hipótesis de que estas alteraciones parecen estar asociadas con la pérdida de

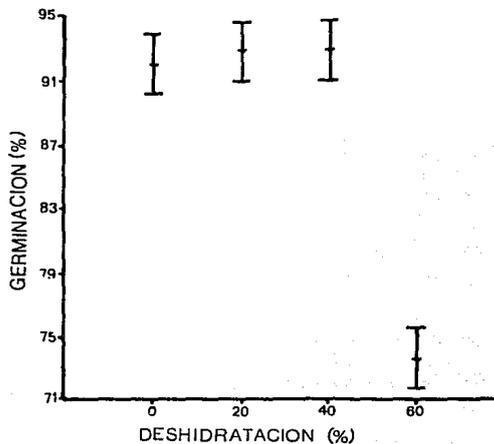


Figura 7. Efecto de la deshidratación sobre la germinación (%) promedio de semillas de *D. digyna* ($n=1050$; Tukey al 0.05%).

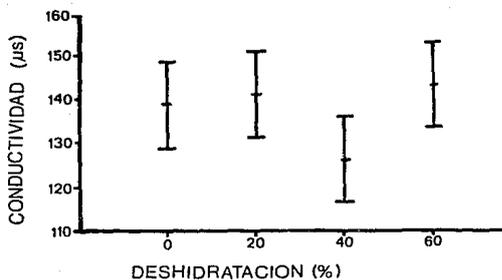


Figura 8. Efecto de la deshidratación sobre la conductividad promedio de semillas de *D. digyna* ($n=280$; Tukey al 0.05%).

viabilidad (Roberts, 1973b; Hamabata y Martínez, 1980; Gosh, et al., 1981; Berjak et al., 1984; Nautiyal y Purohit, 1985b; Priestley, 1986). Sin embargo, se encontró que no se produjeron cambios ($F=2.23$, $gl=3,252$, $P>0.05$) en la conductividad del medio de inmersión conforme incrementó la deshidratación (figura 8). Si aceptamos la hipótesis de que un incremento en la conductividad del medio es el reflejo de cambios en la estructura de las membranas (Abdul-Baki y Anderson, 1972; Gosh et al., 1981); entonces se deduce que la deshidratación no produce alteraciones en la estructura de las membranas en las semillas de *D. digyna*. Por lo tanto, la hipótesis de que la capacidad de germinación está relacionada con la pérdida de integridad de membranas y su consecuente pérdida de solutos conforme las semillas pierden agua, no se aplica en las semillas de *D. digyna*.

Existe la posibilidad de que se haya producido daño en la estructura de las membranas, pero que éste no se refleje en la salida de solutos, sino en algún otro evento asociado con las membranas. Ya que de acuerdo con Bewley (1979) y King y Roberts (1980a) existe la posibilidad de que las membranas recuperen su estructura original pero que no recuperen totalmente su funcionalidad, debido probablemente a la presencia de mecanismos de reparación ineficientes (Bewley y Black, 1978; Roberts, 1980b; Bernal-Lugo, 1987).

Por otra parte, se ha propuesto (capítulo 6) que la aplicación externa de un gran número de metabolitos compatibles ayuda a estabilizar la integridad celular en situaciones de estrés hídrico. Los resultados indicaron que la aplicación de agua, prolina, glicina y ABA redujo significativamente ($F=9.79$, $gl=6,252$, $P<0.00001$) la salida de solutos con respecto a las semillas control, cuando se separa del efecto de la deshidratación. Por el contrario, la aplicación de calcio y sacarosa no mostró efectos sobre la salida de solutos (figura 9). Estos resultados sugieren que los metabolitos prolina y glicina-betaína mejoran las condiciones internas en estas semillas con respecto a las no tratadas, lo mismo que la aplicación de ABA y el pretratamiento con

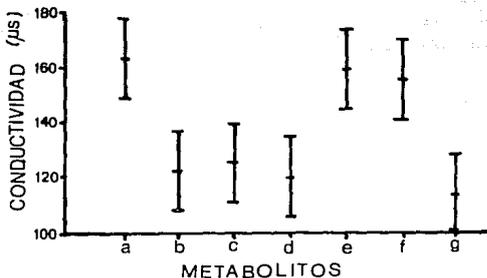


Figura 9. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *D. digna* (n=280; Tukey al 0.05%. Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

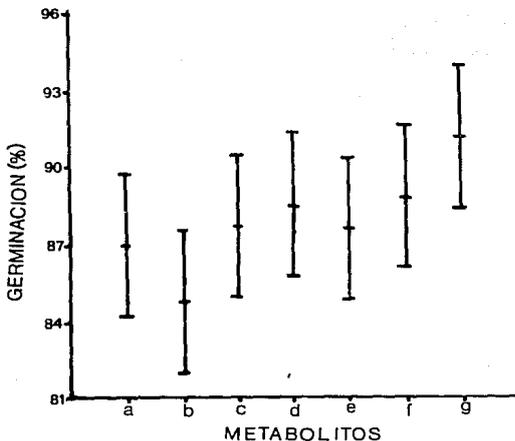


Figura 10. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *D. digna* (n=1050; Tukey al 0.05%. Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

agua desionizada.

Se sabe que la salida de solutos es un fenómeno al parecer normal en semillas viables ortodoxas (Bewley, 1979). Si la salida de solutos fuera un fenómeno normal en cualquier tipo de semillas viables, esto explicaría el porqué las semillas de *D. digyna* no tratadas (es decir, en una condición natural) mostraron valores de conductividad altos. Lo cual sugiere, que la integridad de las membranas es incompleta en semillas de *D. digyna* viables, de acuerdo con Bewley y Black (1978), por lo menos en los primeros minutos de imbibición.

El hecho de que algunas semillas tratadas con metabolitos mostraran conductividades menores que las semillas no tratadas sugiere que el pretatamiento con esos metabolitos reestablece la supuesta "incompleta" integridad de las membranas. Aun así esta respuesta pudo deberse más bien a un efecto "priming" (capítulo 8) que a un efecto directo de los metabolitos sobre la estructura de las membranas; es decir, se sabe por una parte, que cuando las semillas son colocadas en una solución, además de solutos absorben agua (Simon, 1984), y por otra parte, que la estructura de las membranas se reestablece durante los primeros minutos de imbibición en semillas ortodoxas (Simon (1984). De tal forma, que las semillas estudiadas debieron absorber agua junto con los metabolitos, la cual pudo ser suficiente para reestablecer la estructura "incompleta" de las membranas. Así, las semillas tratadas pudieron tener alguna "ventaja" por la absorción de agua con respecto a las semillas no tratadas. Los resultados observados en las semillas tratadas con agua desionizada apoyan esta hipótesis, poniendo en duda el papel de los metabolitos como estabilizadores de membranas, ya que no se sabe si la respuesta observada se debió al efecto de los metabolitos per se o al agua que entró con ellos.

De cualquier forma, ya sea por efecto de los metabolitos o por efecto del agua, las semillas tratadas mostraron menor conductividad, sin embargo, este efecto no se refleja en la respuesta germinativa. Es decir, se encontró que el porcentaje de germinación final no difiere significativamente ($F=2.35$, $g_1=6,56$,

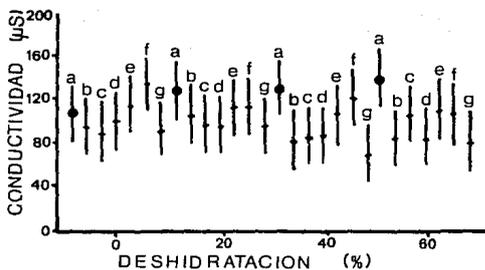


Figura 11. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *D. digyna* ($n=280$; Tukey al 0.05%. Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca^{++} ; f, sacarosa; g, ABA).

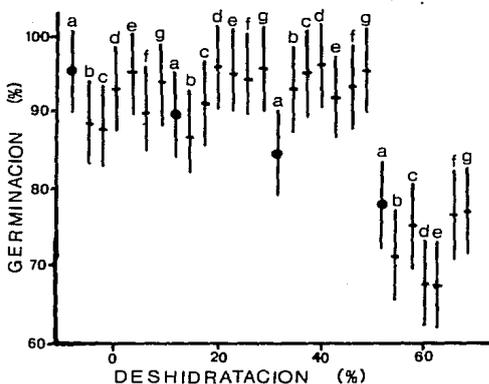


Figura 12. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *D. digyna* ($n=1050$; Tukey al 0.05%. Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca^{++} ; f, sacarosa; g, ABA).

$P > 0.05$) entre los tratamientos y el control, lo cual significa que desde el punto de vista estadístico, la aplicación de tratamientos no modifica la respuesta germinativa de las semillas. No obstante, el hecho de que las semillas tratadas con agua desionizada mostraran una tendencia a reducir la germinación, mientras que las semillas tratadas con metabolitos tendieron a incrementarla (figura 10), sugiere que la respuesta observada en la conductividad debida a la aplicación de metabolitos puede deberse a algún efecto que va más allá del simple efecto "priming" provocado por la absorción de agua.

Por otra parte, al analizar el efecto conjunto de la deshidratación y la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad se encontró que la interacción no fue significativa ($F=1.71$, $gl=18,252$, $P > 0.01$) indicando que el efecto de los metabolitos no cambia cuando cambia el nivel de deshidratación de las semillas (figura 11). Sin embargo, al analizar el efecto combinado de los tratamientos y de la deshidratación sobre la germinación se encontró que la interacción fue significativa ($F=2.75$, $gl=18,56$, $P < 0.005$), indicando que el efecto de los metabolitos cambia cuando cambia el nivel de deshidratación. Es decir, se observa que la germinación de las semillas control tiende a disminuir con la deshidratación, pero la aplicación de soluciones (incluyendo agua) la regresa a la germinación normal en semillas deshidratadas 20 y 40%, pero en las semillas más deshidratadas los metabolitos ya no tienen efecto (figura 12). Si separáramos a las semillas control de las semillas tratadas observamos (aunque sólo es significativa la respuesta entre 0% y 60% de deshidratación) que existe una clara tendencia hacia una disminución lineal ($r=0.99$) en la germinación conforme incrementa la deshidratación, sugiriendo un comportamiento recalcitrante típico en las semillas de esta especie.

Un evento importante en la germinación que puede reflejar cambios en el estado de las semillas es su metabolismo, el cual puede ser estimado por medio de la tasa de intercambio gaseoso. Los resultados mostrados en la figura 13a indican que la tasa de

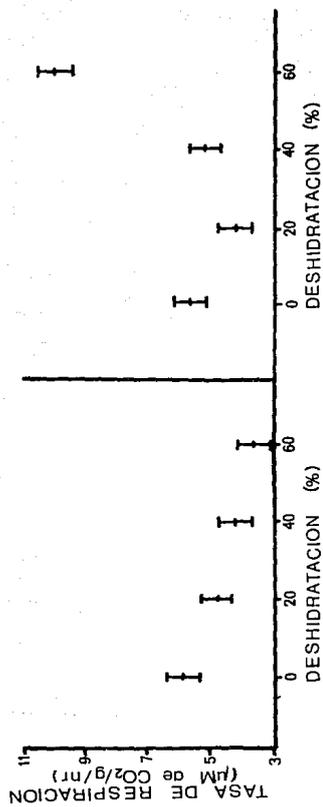


Figura 13. Efecto de la deshidratación sobre la tasa de respiración promedio en semillas de *D. oligoma* antes (a) y después (b) de la imbibición. ($n=200$; t -test al 0.05).

respiración ($\mu\text{M CO}_2$ /gr/hr) en semillas de D. digyna antes de la imbibición decrece proporcionalmente conforme progresa la deshidratación; es decir, el metabolismo de las semillas disminuye conforme pierden agua. Los análisis estadísticos muestran que las diferencias encontradas en la tasa inicial de producción de bióxido de carbono son significativas ($F=26.09$, $gl=3,56$, $P<0.0001$) entre semillas sin deshidratar y semillas con cualquier grado de deshidratación. Se sabe que las semillas "secas" (ortodoxas) muestran una tasa metabólica baja, lo cual es probablemente una consecuencia de la carencia de agua (Roberts, 1973b; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Garwood y Lighton, 1990). De tal forma que, la disminución observada en la producción de CO_2 en D. digyna puede deberse precisamente a la pérdida de agua. Esta disminución en el metabolismo puede deberse a que los sustratos y enzimas de la respiración no puedan moverse de un centro de metabolismo a otro por la falta de agua suficiente (Berjak et al., 1984).

Una vez que las semillas han absorbido agua y justo cuando han completado las fases I y II de imbibición, la tasa (final) de producción de bióxido de carbono muestra un incremento significativo ($F=126.34$, $gl=3,56$, $P<0.00001$) en las semillas más deshidratadas con respecto a las no deshidratadas (figura 13b). Las semillas deshidratadas 20% mostraron una disminución significativa en la tasa de respiración final con respecto a las semillas no deshidratadas; mientras que las semillas deshidratadas 40% no mostraron diferencias estadísticas con respecto a las no deshidratadas. Sin embargo, una mayor deshidratación (60%) provoca un incremento significativo en la tasa de respiración final con respecto a las demás semillas.

Comparando las figuras 13a y 13b se observa que las semillas no deshidratadas y las deshidratadas 20% y 40% no mostraron un incremento en la tasa de respiración final con respecto a la inicial; sólo se observa un incremento significativo ($F=90.14$, $gl=1, 130$, $P<0.00001$) en las semillas deshidratadas 60% en la respiración final con respecto a la inicial. Esto sugiere que no requieren incrementar la tasa de producción de energía (ATP)

después de la imbibición, para la síntesis de proteínas y otros compuestos necesarios para la germinación. Por otra parte, la mayor tasa de respiración final observada en las semillas más deshidratadas sugiere que éstas mantienen funcional su maquinaria respiratoria (a pesar de la deshidratación). Pero quizá esa mayor tasa de respiración se deba a que necesitan producir una mayor cantidad de energía para compensar la menor producción inicial, y para llevar a cabo las reacciones de degradación de reservas y síntesis de nuevos componentes, pero que todo el esfuerzo es insuficiente para mantener íntegra la viabilidad, ya que mostraron el menor porcentaje de germinación.

El primer evento necesario y quizá por lo mismo más importante para la germinación de las semillas es la absorción de agua. En la figura 14 se analiza el efecto de la deshidratación inicial sobre la capacidad de rehidratación de las semillas por medio de las curvas de hidratación (porcentaje de agua absorbida). Se puede apreciar que la cantidad total de agua absorbida por las semillas, necesaria para su germinación aumentó ($F=1000$, $g_1=3,252$, $P<0.0001$) mientras mayor fue la deshidratación. En la tabla 4 se observa que la deshidratación no afecta la duración de las fases de hidratación; sin embargo, modifica la pendiente de la primera fase de hidratación, la cual incrementa conforme progresa la deshidratación, indicando que la hidratación es más rápida en semillas más deshidratadas. En otras palabras, tanto la cantidad como la velocidad (en la primera fase) con la que las semillas absorben agua es proporcional al nivel de deshidratación de la semilla, es decir, dependen del contenido de humedad inicial de las semillas (Ching, 1972; Hamabata y Martínez, 1980; Priestley, 1986). Esto puede deberse a una mayor diferencia en los potenciales hídricos dentro y fuera de las semillas, en las más deshidratadas con respecto a las no deshidratadas.

En la tabla 4 se observa que el tiempo de germinación en las semillas más deshidratadas fue el más corto. Esto puede atribuirse a la entrada más rápida de agua durante la fase I, lo cual probablemente ocasionó que se aceleraran algunos procesos

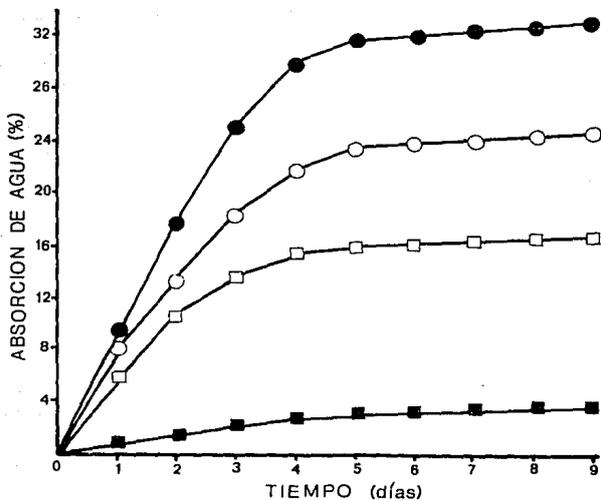


Figura 14. Curvas de hidratación de semillas de *P. digyna* con diferente nivel de deshidratación inicial (■) 0%, (□) 20%, (○) 40%, (●) 50%.

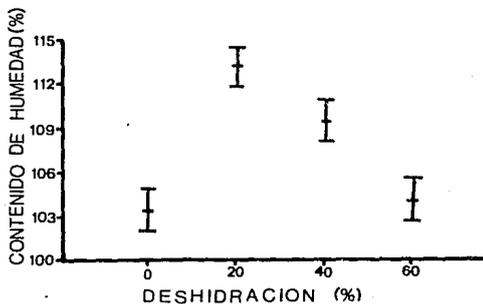


Figura 15. Efecto de la deshidratación sobre el contenido de humedad promedio que alcanzaron las semillas de *P. digyna* al momento de la germinación.

metabólicos, por ejemplo, la respiración (figura 13b), acelerando

TABLA 4. FASES DE HIDRACION EN SEMILLAS DE *D. digyna* CON DIFERENTE NIVEL DE DESHIDRACION INICIAL.

DESH (%)	FASE I		FASE II		FASE III	
	VELOCIDAD (PENDIENTE)	DURACION (DIAS)	DURACION (DIAS)	INICIO (DIAS DESPUES DE LA SIEMBRA)	TIEMPO DE GERMINACION (DIAS)	
0	0.57	4	5	9	71	
20	3.09	4	5	9	71	
40	4.59	4	5	9	71	
60	7.50	4	5	9	56	

así la germinación de las semillas viables en la muestra. Sin embargo, se sabe que la entrada rápida de agua en semillas ortodoxas desecadas puede producir daño y reducir la germinación (Roberts y Ellis, 1989). Es evidente que si se produjo algún tipo de daño, éste no se detectó por medio de la salida de solutos, como lo demuestran los valores de conductividad obtenidos.

Las semillas no deshidratadas y las deshidratadas 20% y 40% además de mostrar un porcentaje de germinación similar (figura 7), mostraron el mismo tiempo de germinación, lo cual indica que estos niveles de deshidratación no modifican la respuesta germinativa. Sin embargo, el contenido de humedad que alcanzaron las semillas cuando comenzó la protrusión de la radícula (figura 15) aumentó ($F=40.71$, $g_1=3,252$, $P<0.00001$) en las semillas que se deshidrataron 20% y 40%, con respecto a las no deshidratadas; pero las semillas más deshidratadas no mostraron diferencias con respecto a las no deshidratadas. En esta figura se observa que una ligera deshidratación (20%) provocó que las semillas obtuvieran un contenido de humedad mayor al momento de la germinación que las no deshidratadas; pero si la deshidratación continúa, éste disminuye progresivamente hasta ser igual al de las semillas no deshidratadas. Esto sugiere que quizá la cantidad extra de agua que absorbieron las semillas deshidratadas 20% y 40% pudiera ser un

factor clave en las respuestas observadas en estas semillas. Ya que la entrada de agua más rápida que en las semillas no deshidratadas al parecer no fue perjudicial, como lo demuestran los valores de conductividad y de germinación.

En la figura 15 se observa que el contenido de humedad que alcanzaron las semillas fue superior al 100%, independientemente del nivel de deshidratación inicial. Es decir, que recuperaron el agua perdida y absorbieron una cantidad extra para germinar, indicando que la capacidad de absorción de agua no se altera por efecto de la deshidratación.

9.4 Cupania dentata

Se encontró que el porcentaje de germinación incrementó significativamente ($F=63.82$, $gl=3,56$, $P<0.0001$) cuando las semillas perdieron 20% del contenido de humedad con el que son liberadas, indicando que una ligera deshidratación favorece su capacidad de germinación (en condiciones de laboratorio); sin embargo, una mayor reducción en el contenido de humedad redujo gradualmente esa capacidad de germinación (figura 16). Las semillas deshidratadas 40% no mostraron diferencias en el porcentaje de germinación con respecto a las semillas no deshidratadas y las semillas deshidratadas 60% mostraron una germinación significativamente ($P<0.00001$) menor que el resto de las semillas, indicando que una deshidratación profunda es perjudicial para su capacidad de germinación, reduciéndola hasta 15.5%. Los resultados anteriores indican que las semillas de C. dentata muestran un comportamiento de tipo recalcitrante cuando la deshidratación es severa. Si nos basamos en las dos hipótesis alternativas enunciadas por Villiers (1972, citado por King y Roberts, 1980b) sobre el daño por desecación en semillas recalcitrantes (capítulo 4), encontramos que las semillas de esta especie se ajustan a la hipótesis del contenido de humedad no crítico; es decir, se produce una disminución gradual de la viabilidad conforme disminuye el contenido de humedad de las semillas. Sólo que esta hipótesis se cumple después que las semillas han perdido 20% de su contenido de

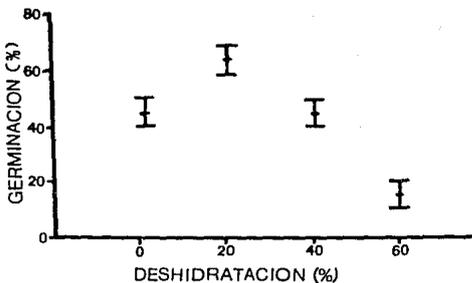


Figura 16. Efecto de la deshidratación sobre la germinación promedio de semillas de *C. dentata* (n=1050; Tukey al 0.05).

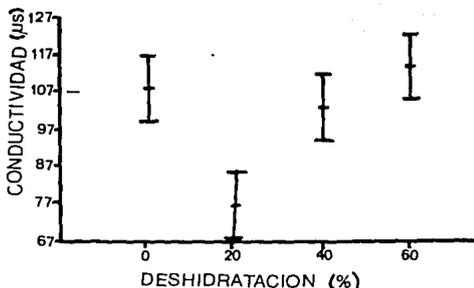


Figura 17. Efecto de la deshidratación sobre la conductividad promedio de semillas de *C. dentata* (n=286; Tukey al 0.05).

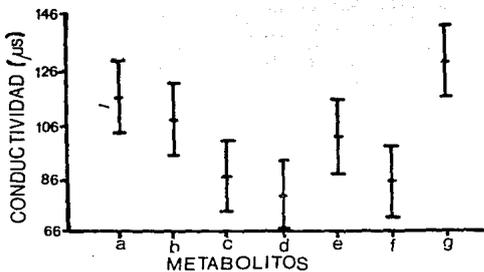


Figura 18. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *C. dentata* (n=289; Tukey al 0.05). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

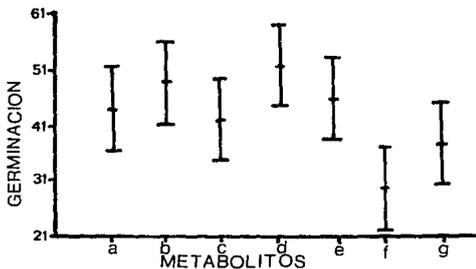


Figura 19. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *C. dentata* (n=1950; Tukey al 0.05). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

humedad inicial.

Es importante notar que las semillas de esta especie son liberadas en la época de sequía, con una baja viabilidad a pesar de ser liberadas con un contenido de humedad relativamente alto ($44.0\% \pm 4.72$). Al parecer una ligera deshidratación (20%) es benéfica en lugar de ser perjudicial, lo cual sugiere que requieren un pequeño período de sequía para germinar con mayor éxito (o están adaptadas a ese pequeño período de relativa sequía). Resulta curioso que a pesar de su tamaño (expresado en peso fresco) es menor (0.26 g) que el de las semillas de D. digyna (2.09 g), muestren una respuesta más cercana a la descrita para semillas recalcitrantes, aún considerando que una ligera deshidratación les es favorable.

Siguiendo el mismo esquema de análisis que en la respuesta de las semillas de D. digyna, encontramos que la deshidratación en semillas de C. dentata no provoca incrementos significativos en la conductividad del agua de inmersión (figura 17). Si los incrementos en conductividad se relacionan con cambios en la estructura de las membranas (Abdul-Baki y Anderson, 1972; Gosh et al., 1981), entonces al no producirse incrementos en la conductividad provocados por la deshidratación, se deduce que la deshidratación no provoca alteraciones en la estructura de las membranas en las semillas de esta especie.

En la figura 17 se observa que la conductividad del medio disminuyó significativamente ($F=13.02$, $gl=3,252$, $P<0.0001$) cuando las semillas perdieron 20% del contenido de humedad inicial con respecto a las semillas no deshidratadas. Esto sugiere que una ligera deshidratación favorece el estado de salud de las semillas, lo cual puede explicar el mayor porcentaje de germinación que se observa en estas semillas (figura 16) y apoya la idea de que las semillas de C. dentata están adaptadas a un breve período de sequía que las favorece.

Se puede notar que la conductividad se relaciona de manera inversa con el porcentaje de germinación, es decir, las semillas que mostraron los menores valores de conductividad mostraron el mayor porcentaje de germinación y viceversa. Lo cual sugiere que la

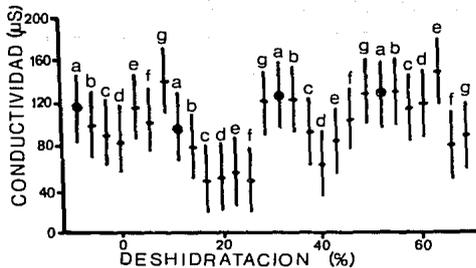


Figura 20. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *C. dentata* (n=280; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

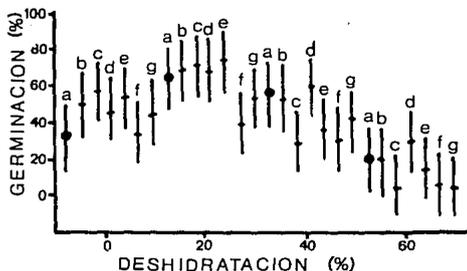


Figura 21. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *C. dentata* (n=1050; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

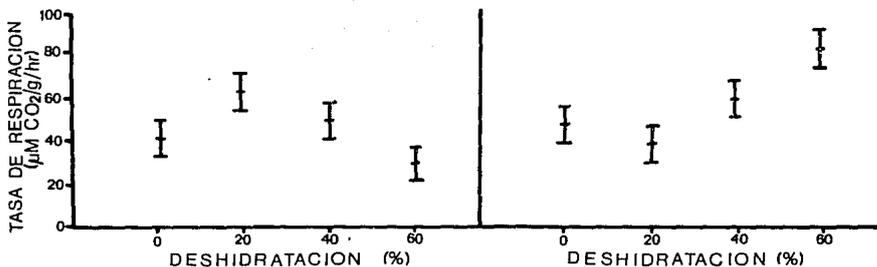


Figura 22. Efecto de la deshidratación sobre la tasa de respiración promedio en semillas de *C. dentata* antes (a) y después (b) de la imbibición. (n=280; Tukey al 0.05%).

salida de solutos, puede ser un indicador de los niveles de viabilidad, aunque no esté relacionado con la deshidratación. Los altos valores de conductividad observados en las semillas no deshidratadas indican que la integridad de las membranas es incompleta al momento de su liberación. Esto si aceptamos la hipótesis de altos niveles de conductividad son el reflejo de alteraciones en la estructura de las membranas.

Por otra parte, se encontró que la aplicación de metabolitos produjo diferencias significativas ($F=8.67$, $gl=3,252$, $P<0.00001$) en la conductividad del agua de inmersión. En particular, la aplicación de prolina, glicina betaína y sacarosa disminuyó significativamente la salida de solutos con respecto a las semillas control (figura 18); lo cual sugiere que estos metabolitos cumplen con su función como estabilizadores de la estructura y función de membranas en esta especie. Los demás metabolitos no modificaron la conductividad del medio de inmersión. Sin embargo, se encontró que la aplicación de sacarosa redujo significativamente ($P<0.0005$) el porcentaje de germinación con respecto a las semillas no deshidratadas, mientras que los demás metabolitos no tuvieron efecto (figura 19). Probablemente la sacarosa redujo el porcentaje de germinación debido a la alta concentración a la que fue aplicada, lo cual pudo producir un efecto osmótico negativo.

Por otra parte, la interacción entre la deshidratación y la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad resultó significativa ($F=3.18$, $gl=18,252$, $P<0.0000$), indicando que el efecto de la aplicación de metabolitos cambia cuando cambia el nivel de deshidratación. Se observó que la aplicación de cualquier metabolito compatible (excepto ABA) tiende a reducir la salida de solutos con respecto al control en semillas sin deshidratar y deshidratadas 20% y 40%, pero cuando las semillas se deshidrataron 60%, el efecto de los metabolitos fue indistinguible (figura 20). La interacción de la deshidratación y la aplicación de metabolitos fue no significativa ($F=1.76$, $gl=18,56$, $P>0.05$) sobre el porcentaje de germinación (figura 21).

Por otra parte, se encontró que la tasa de respiración antes

de la imbibición incrementó significativamente ($F=12.88$, $gl=3,56$, $P<0.0001$), cuando las semillas se deshidrataron 20%, sugiriendo que una ligera deshidratación acelera el metabolismo respiratorio. Sin embargo, cuando la deshidratación incrementó hasta 40% y 60%, se produjo una disminución gradual en la tasa de respiración hasta alcanzar valores que no difieren significativamente con los de las semillas no deshidratadas, o sea, al nivel normal (figura 22a).

Los resultados anteriores sugieren que las semillas de C. dentata alcanzan una mejor condición cuando se deshidratan ligeramente. Esto es sugerido por la relación directa que se observa entre la tasa de respiración inicial (figura 22a) y el porcentaje final de germinación (figura 16) y la relación inversa entre la tasa de respiración y los niveles de conductividad (figura 17). Es decir, las semillas deshidratadas 20%, las cuales mostraron la mayor tasa de respiración inicial, mostraron la menor salida de solutos y el mayor porcentaje de germinación. Lo cual sugiere que la mayor germinación observada en las semillas ligeramente deshidratadas puede deberse a la mayor actividad metabólica y a la menor salida de solutos observados en estas semillas.

Una vez que las semillas se han imbibido, la tasa de respiración muestra un comportamiento inverso al que se presenta antes de la imbibición. Es decir, la deshidratación de 20% redujo (aunque no significativamente) la tasa de respiración con respecto a la de las semillas no deshidratadas, pero conforme incrementó el nivel de deshidratación se produjo un incremento (significativo $F=15.78$, $gl=3,56$, $P<0.00001$, sólo en las semillas deshidratadas 60%) progresivo en la tasa de respiración; siendo las semillas sin deshidratar las que presentaron la menor tasa de respiración final y las más deshidratadas la mayor tasa de respiración, (figura 22b). Garwood y Lighton (1990) afirman que la respiración final en semillas de varias especies tropicales incrementa más en semillas con respiración inicial baja que en las semillas con respiración inicial alta; en otras palabras, la relación entre la tasa de respiración inicial y final es inversamente proporcional. Los resultados encontrados en este estudio muestran que se presenta la

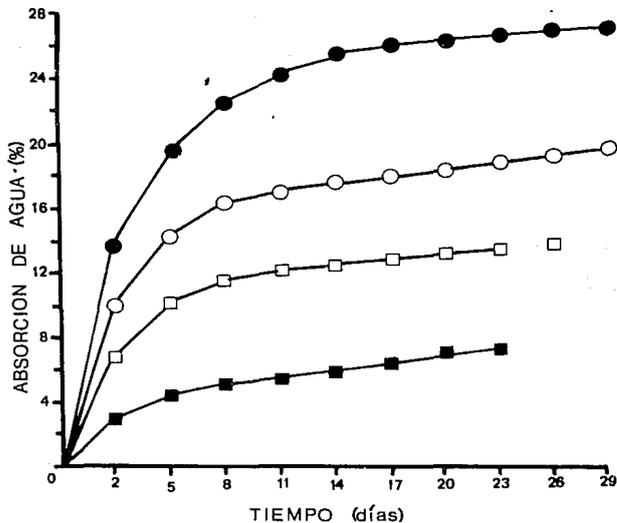


Figura 23. Curvas de hidratación de semillas de *C. dentata* con diferente nivel de deshidratación inicial (■) 0%, (□) 20%, (○) 40%, (●) 60%.

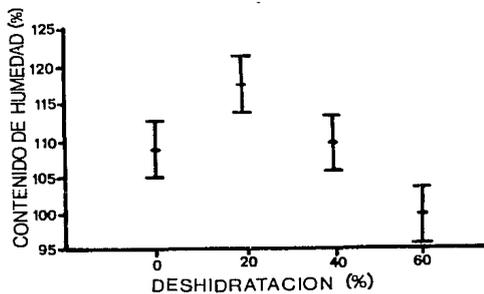


Figura 24. Efecto de la deshidratación sobre el contenido de humedad promedio que alcanzaron las semillas de *C. dentata* al momento de la germinación.

misma relación ($r=-0.97$).

La menor tasa de respiración final observada en las semillas deshidratadas 20% sugiere que no requieren incrementar la tasa de producción de energía para la síntesis de nuevos compuestos a partir de las reservas, y dado que la salida de solutos fue menor en estas semillas, probablemente no requieran energía extra para "echar a andar" algún mecanismo de reparación. Por el contrario, al parecer las semillas más deshidratadas requieren producir más energía para compensar la menor producción inicial, o para restablecer la estructura de las membranas, la cual se piensa es incompleta por los mayores niveles de conductividad observados. Sin embargo, al parecer todo el esfuerzo realizado por las semillas más deshidratadas es insuficiente para mantener la viabilidad.

En la figura 23 se muestran las curvas de hidratación de las semillas con diferente nivel de deshidratación inicial. Se observa que la duración de las fases I y II es diferente para semillas con diferente nivel de deshidratación, consecuentemente el inicio de la fase III también es diferente (tabla 5). También se encontró que tanto la cantidad total de agua absorbida como la velocidad de la primera fase de hidratación incrementan conforme progresa la deshidratación, indicando que las semillas más deshidratadas se rehidratan más rápido, debido a la mayor diferencia de potenciales, como se mencionó anteriormente.

TABLA 5. FASES DE HIDRATAACION EN SEMILLAS DE C. dentata CON DIFERENTE NIVEL DE DESHIDRATAACION INICIAL.

DESH (%)	FASE I VELOCIDAD (PENDIENTE)	FASE I DURACION (DIAS)	FASE II DURACION (DIAS)	FASE III INICIO (DIAS DESPUES DE LA SIEMBRA)	TIEMPO DE GERMINACION (DIAS)
0	0.49	11	12	23	41
20	1.08	11	15	26	38
40	1.54	11	18	29	35
60	1.61	14	15	29	35

Las semillas deshidratadas 40% y 60% mostraron tiempos de germinación más cortos que las semillas no deshidratadas y deshidratadas 20%, lo cual sugiere que la germinación de las semillas viables se acelera por efecto de la velocidad de absorción de agua, la cual explica el 99% de la variación en el tiempo de germinación. Esta mayor velocidad de absorción de agua durante la fase I en las semillas más deshidratadas probablemente ocasionó un incremento en la actividad de algún proceso metabólico, por ejemplo síntesis de proteínas y respiración, acortando el tiempo de germinación de las semillas viables en la muestra.

A pesar de que la cantidad de agua absorbida es proporcional al nivel de deshidratación, se observa que el contenido de humedad final que alcanzaron las semillas cuando comenzó la protrusión de la radícula incrementó significativamente ($F=13.81$, $gl=3,252$, $P<0.00001$) cuando las semillas se deshidrataron 20% (figura 24); pero cuando incrementó la deshidratación, disminuyó progresivamente el contenido de humedad final a partir de este nivel de deshidratación. Las semillas deshidratadas 40% alcanzaron un contenido de humedad similar que las semillas no deshidratadas y las más deshidratadas alcanzaron un contenido de humedad significativamente menor que estas últimas. Esto significa que en las semillas de esta especie, una ligera deshidratación provoca que obtengan un contenido de humedad mayor al momento de la germinación que las no deshidratadas, pero si la deshidratación continúa, disminuye progresivamente hasta ser igual o menor que en las semillas no deshidratadas.

Al parecer, por los resultados obtenidos, la rehidratación y en particular, el contenido de humedad que alcanzan las semillas al germinar es un factor muy importante, ya que tanto la respiración inicial como la germinación se relacionan directamente con el contenido de humedad final y la conductividad se relaciona de manera inversa con estas respuestas. Estos resultados apoyan la idea de que las semillas de C. dentata se benefician con una ligera

deshidratación.

En la figura 24 se observa que el contenido de humedad que alcanzaron las semillas fue superior al 100% independientemente del nivel de deshidratación inicial, indicando que recuperan el agua perdida; pero en el caso de las semillas más deshidratadas, esa recuperación no es suficiente para mantener la viabilidad de las semillas.

9.5 Cymbopetalum baillonii

Se encontró que al igual que en las semillas de C. dentata, el porcentaje de germinación incrementó significativamente ($F=20.93$, $gl=3,56$, $P<0.0001$) cuando las semillas perdieron 20% del contenido de humedad con el que son liberadas (figura 25), indicando que una ligera deshidratación favorece su capacidad de germinación. Sin embargo, una mayor reducción en el contenido de humedad redujo gradualmente esa capacidad, pero la disminución fue no significativa con respecto a las semillas deshidratadas 20%. Estos resultados sugieren que cualquier nivel de deshidratación impuesto en las semillas recién colectadas favorece su capacidad de germinación. Incluso, parece ser que el máximo grado de deshidratación impuesto no fue suficiente como para reducir su capacidad de germinación con respecto a las no deshidratadas, por lo que podemos considerar que no muestran un comportamiento recalitrante típico en condiciones de laboratorio.

Las semillas de C. baillonii muestran un comportamiento similar al de las semillas de C. dentata en lo que respecta a su respuesta fisiológica (germinación) en condiciones de laboratorio; la única diferencia es que la deshidratación provocó una disminución significativa en la germinabilidad de C. dentata y no significativa en C. baillonii, cuando la deshidratación es superior al 20%.

Las semillas de C. baillonii tienen una viabilidad aún más baja que las semillas de C. dentata cuando son dispersadas, a pesar de que su contenido de humedad es relativamente alto ($45.02\% \pm 7.04$). También son liberadas en la época de sequía y al parecer



Figura 25. Efecto de la deshidratación sobre la germinación promedio de semillas de *C. baillonii* (n=1050; Tukey al 0.05).

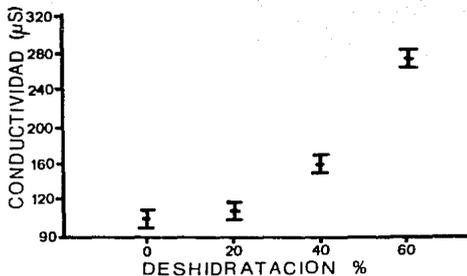


Figura 26. Efecto de la deshidratación sobre la conductividad promedio de semillas de *C. baillonii* (n=280; Tukey al 0.05).

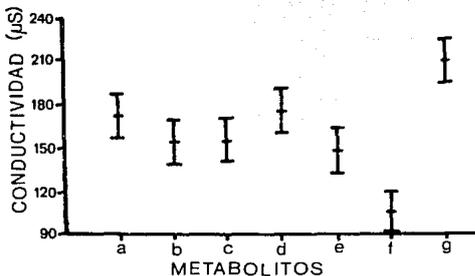


Figura 27. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *C. baillonii* (n=280; Tukey al 0.05 . Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

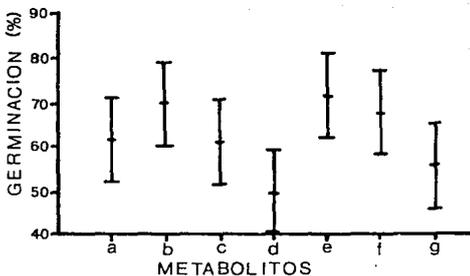


Figura 28. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *C. baillonii* (n=1050; Tukey al 0.05 . Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

están adaptadas a este período de relativa sequía, ya que una ligera deshidratación (20%) incrementa su capacidad de germinación en lugar de reducirla.

Resulta interesante que a pesar de que la deshidratación incrementa su capacidad de germinación, también produce un incremento en los valores de conductividad. Se encontró que una ligera deshidratación (20%) no modificó la salida de solutos con respecto a las semillas no deshidratadas, pero cuando incrementó el nivel de deshidratación se produjo un incremento significativo ($F=229, g1=3,252, P<0.00001$) gradual en la conductividad del agua de inmersión (figura 26), sugiriendo pérdida en la integridad de las membranas provocada por la deshidratación. Esto si aceptamos la hipótesis de Abdul-Baki y Anderson (1972) y de Gosh et al. (1981) de que el incremento en la conductividad es el reflejo de cambios en la estructura de las membranas. Sin embargo, la capacidad de germinación al parecer no está relacionada con la salida de solutos conforme las semillas pierden agua, ya que las semillas que mostraron la menor salida de solutos (no deshidratadas) en lugar de observar un mayor porcentaje de germinación mostraron el valor más bajo, y las semillas con mayor salida de solutos mostraron una mayor capacidad de germinación. Esto sugiere que en las semillas de C. baillonii la salida de solutos no es un buen indicador de la viabilidad.

Se encontró que la aplicación de metabolitos produjo diferencias significativas ($F=19.71, g1=6,252, P<0.00001$) en la conductividad del agua de inmersión. En particular, la aplicación de sacarosa redujo significativamente la salida de solutos con respecto a las semillas no tratadas, y la aplicación de ABA produjo el efecto contrario (figura 27). Los demás metabolitos no modificaron la conductividad del medio de inmersión. Estos resultados no se reflejaron en la respuesta germinativa, ya que ningún metabolito modificó ($F=2.12, g1=6,56, P>0.05$) la respuesta germinativa (figura 28).

Por otra parte, la interacción entre la deshidratación y la aplicación de metabolitos compatibles resultó estadísticamente

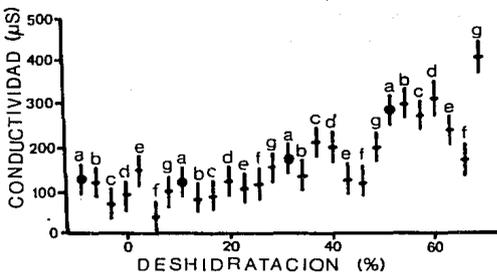


Figura 29. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *C. baillonii* ($n=280$; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

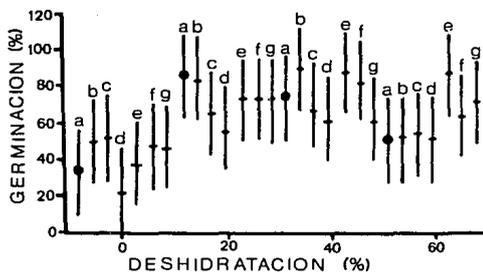


Figura 30. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *C. baillonii* ($n=1050$; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

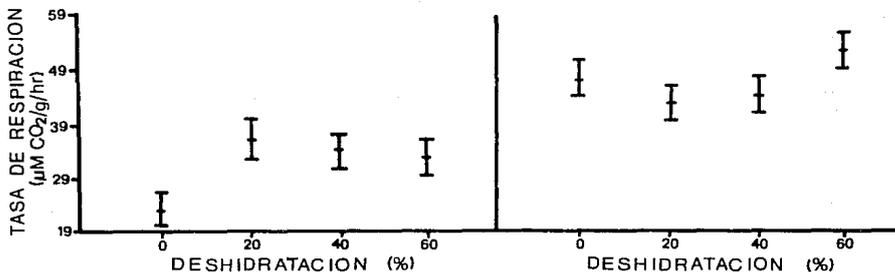


Figura 31. Efecto de la deshidratación sobre la tasa de respiración promedio en semillas de *C. baillonii* antes (a) y después (b) de la imbibición. ($n=280$; Tukey al 0.05%).

significativa ($F=7.93$, $gl=18,252$, $P<0.0000$), indicando que el cambio en el nivel de deshidratación de las semillas corresponde al cambio en el efecto de la aplicación de metabolitos. La aplicación de sacarosa redujo la conductividad del agua de inmersión en semillas no deshidratadas y en semillas deshidratadas 60%; por otra parte, la aplicación de ABA provocó un incremento en la conductividad en las semillas más deshidratadas (figura 29). Estas diferencias explican las diferencias que se observan al analizar el efecto global de los metabolitos. La interacción entre deshidratación y metabolitos resultó no significativa ($F=1.65$, $gl=18,56$, $P>0.05$) en la respuesta germinativa (figura 30), indicando que la respuesta de las semillas a la aplicación de los metabolitos no se modifica con la deshidratación.

Por otra parte, se encontró que la tasa de respiración antes de la imbibición incrementó significativamente ($F=9.88$, $gl=3,56$, $P<0.0001$) cuando las semillas se deshidrataron 20%, sugiriendo que una ligera deshidratación acelera el metabolismo respiratorio; pero cuando la deshidratación incrementó hasta 40% y 60%, se produjo una disminución gradual en la tasa de respiración a partir de este nivel de deshidratación. Sin embargo, no obstante esa disminución, la tasa de respiración en semillas con cualquier nivel de deshidratación fue significativamente mayor que en las semillas no deshidratadas (figura 31a). Esto sugiere que cualquier nivel de deshidratación provoca un incremento en el metabolismo respiratorio antes de la imbibición. Esta respuesta se relaciona con el comportamiento germinativo de las semillas (figura 25), sugiriendo que la germinación depende de las condiciones metabólicas reflejadas en tasa de respiración inicial.

Una vez que las semillas se han imbibido, la tasa de respiración muestra un comportamiento inverso al que se presenta antes de la imbibición. Es decir, la deshidratación de 20% redujo (aunque no significativamente) la tasa de respiración con respecto a la de las semillas no deshidratadas, pero conforme incrementó el nivel de deshidratación se produjo un incremento progresivo en la tasa de respiración; siendo las semillas más deshidratadas las que

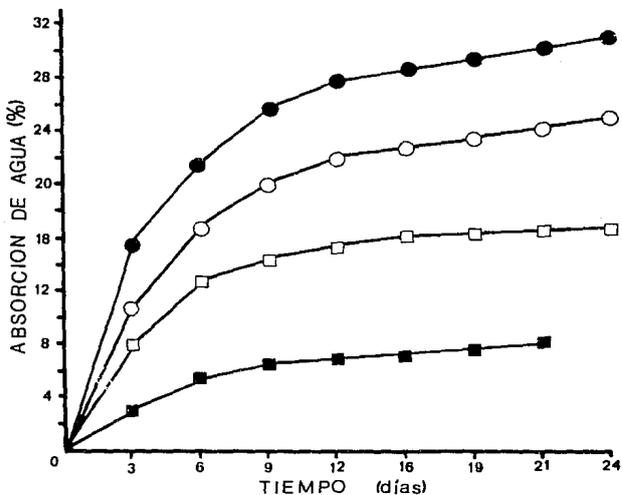


Figura 32. Curvas de hidratación de semillas de *C. baillonii* con diferente nivel de deshidratación inicial (■) 0%, (□) 20%, (○) 40%, (●) 60%.

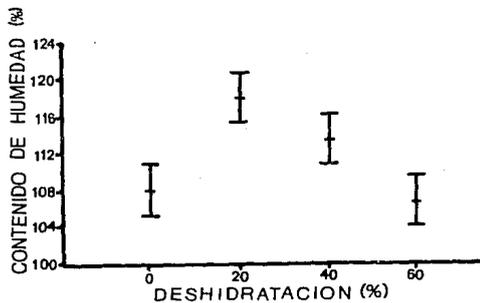


Figura 33. Efecto de la deshidratación sobre el contenido de humedad promedio que alcanzaron las semillas de *C. baillonii* al momento de la germinación.

mostraron la mayor ($F=12.87$, $gl=3,56$, $P<0.00001$) tasa de respiración (figura 31b). Comparando las figuras 31a y 31b se puede apreciar que la tasa de respiración final es mayor ($F=213.68$, $gl=1,130$, $P<0.00001$) que la tasa de respiración inicial independientemente del nivel de deshidratación inicial. Lo cual sugiere que las semillas de esta especie requieren producir una mayor cantidad de energía para llevar a cabo los procesos de síntesis de componentes necesarios para la germinación.

En la figura 32 se muestran las curvas de hidratación de las semillas. Se encontró que tanto la cantidad total de agua absorbida como la velocidad de la primera fase de hidratación incrementan conforme progresa la deshidratación (tabla 6), indicando que las semillas más deshidratadas se rehidratan más rápido, debido a la mayor diferencia de potenciales.

TABLA 6. FASES DE HIDRATAACION EN SEMILLAS DE C. baillonii CON DIFERENTE NIVEL DE DESHIDRATAACION INICIAL.

DESH (%)	FASE I		FASE II	FASE II	TIEMPO
	VELOCIDAD (PENDIENTE)	DURACION (DIAS)	DURACION (DIAS)	INICIO (DIAS DESPUES DE LA SIEMBRA)	DE GERMINACION (DIAS)
0	0.47	12	10	22	41
20	1.22	12	13	25	38
40	1.75	12	13	25	38
60	2.18	12	13	25	38

Se puede observar que el tiempo de germinación es menor al deshidratar las semillas en cualquier nivel. Probablemente la mayor velocidad en la absorción de agua provoca que se aceleren algunos procesos metabólicos acelerando así la germinación de las semillas viables en la muestra.

Como en el caso de las especies anteriores, el contenido de humedad final que alcanzaron las semillas de C. baillonii cuando comenzó la protrusión de la radícula, incrementó significativamente

($F=14.05$, $gl=3,252$, $P<0.00001$) cuando las semillas se deshidrataron 20%, pero cuando incrementó la deshidratación, disminuyó progresivamente el contenido de humedad a partir de este punto (figura 33). Las semillas más deshidratadas alcanzaron el mismo contenido de humedad que las semillas no deshidratadas. Esto significa que en las semillas de esta especie, una ligera deshidratación provoca que obtengan un contenido de humedad mayor al momento de germinar que las no deshidratadas, pero si la deshidratación continúa, disminuye progresivamente hasta ser igual o menor que en las semillas no deshidratadas.

En la figura 33 se observa que el contenido de humedad que alcanzaron las semillas fue superior al 100% independientemente del nivel de deshidratación inicial.

9.6 Poulsenia armata

Los resultados muestran que hay una disminución gradual en el porcentaje de germinación conforme incrementa el nivel de deshidratación; sin embargo, la reducción fue significativa ($F=7.35$, $gl=3,56$, $P<0.0005$) sólo cuando las semillas se deshidraron 60% (figura 34). Estos resultados indican que las semillas de P. armata muestran un comportamiento recalcitrante cuando la deshidratación es severa. Basándonos en las hipótesis alternativas enunciadas por Villiers (1972, citado por King y Roberts, 1980b) sobre el daño por desecación en semillas recalcitrantes, encontramos que las semillas de esta especie se ajustan a la hipótesis del contenido de humedad no crítico; es decir, se produce una reducción gradual de la viabilidad conforme disminuye el contenido de humedad de las semillas. Sin embargo, no hay una pérdida total de viabilidad, como sería lo esperado para semillas recalcitrantes (Owen, 1988).

Las semillas de P. armata son producidas al inicio de la época de lluvias, con un contenido de humedad relativamente alto ($38.60\% \pm 3.71$). Su comportamiento frente a la deshidratación en condiciones de laboratorio sugiere que es una especie relativamente tolerante a la desecación, ya que su capacidad germinativa se redujo significativamente sólo cuando la desecación fue severa.

Las semillas de P. armata, como se puede apreciar en la figura 35, sufren un incremento gradual significativo ($F=50.88$, $gl=3,252$, $P<0.00001$) en la salida de solutos conforme incrementa el nivel de deshidratación; sugiriendo que la integridad de sus sistemas de membranas se ve afectada por la deshidratación, si aceptamos la hipótesis de que un incremento en la conductividad es el reflejo de cambios en la estructura de las membranas (Abdul-Baki y Anderson, 1972; Gosh et al., 1981). A diferencia de las especies anteriores, los cambios en la conductividad observados en P. armata parecen estar relacionados con la reducción en la viabilidad (Roberts, 1973b; Hamabata y Martínez, 1980; Gosh et al., 1981; Berjak et al., 1984; Nautiyal y Purohit, 1985b; Priestley, 1986). Por lo que la hipótesis de que la capacidad de germinación está relacionada con

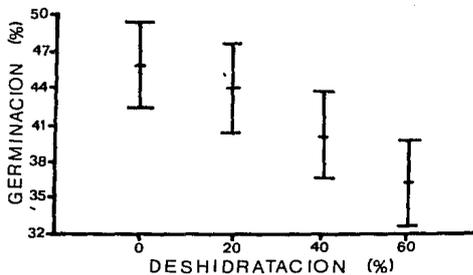


Figura 34. Efecto de la deshidratación sobre la germinación promedio de semillas de *P. armata* (n=1050; Tukey al 0.05%).

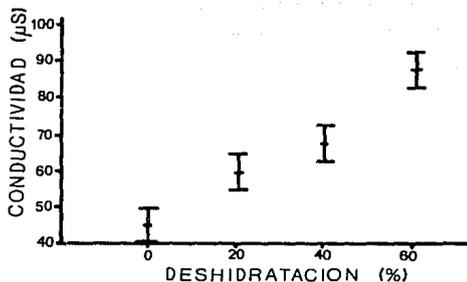


Figura 35. Efecto de la deshidratación sobre la conductividad promedio de semillas de *P. armata* (n=280; Tukey al 0.05%).

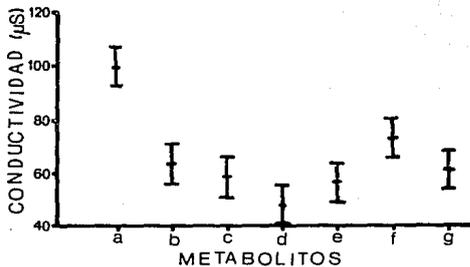


Figura 36. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *P. armata* (n=280; Tukey al 0.05%. Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

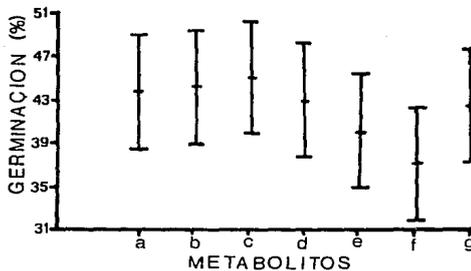


Figura 37. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *P. armata* (n=1050; Tukey al 0.05%. Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

la salida de solutos conforme las semillas pierden agua si se cumple en las semillas de P. armata.

Al analizar el efecto de la aplicación de metabolitos compatibles se encontró que cualquier metabolito (incluyendo el tratamiento con agua) disminuye significativamente ($F=24.56$, $gl=6,252$, $P<0.00001$) la cantidad de solutos en el medio de inmersión (figura 36) con respecto a las semillas control. Estos resultados sugieren que los tratamientos mejoran las condiciones internas de las semillas de esta especie con respecto a las no deshidratadas, ya sea por el efecto directo de los metabolitos mejorando el estado de las membranas o por la entrada de agua ("priming"). Sin embargo, esta reducción en la salida de solutos por efecto de los tratamientos no se refleja en la respuesta germinativa; en la figura 37, se observa que no existen diferencias significativas ($F=1.35$, $gl=6,56$, $P>0.05$) en el porcentaje de germinación entre los tratamientos y el control.

La interacción entre la deshidratación y la aplicación de los metabolitos sobre la conductividad del medio resultó significativa ($F=4.12$, $gl=18,252$, $P<0.00001$), indicando que el efecto de los metabolitos cambia cuando cambia el nivel de deshidratación. En los resultados mostrados en la figura 38 se observa que existe dos tendencias claras, una es el incremento en la conductividad conforme incrementa el nivel de deshidratación, y la otra, en el sentido de que los metabolitos reducen la salida de solutos con respecto a las semillas control independientemente del nivel de deshidratación (aunque no significativa en todos los casos). Esto sugiere que los metabolitos actúan protegiendo la estabilidad de las membranas en contra de la deshidratación, ya que los incrementos en la conductividad del agua de inmersión en semillas tratadas son menores con respecto a los incrementos en las semillas control conforme disminuye el contenido de humedad. La interacción entre la deshidratación y la aplicación de metabolitos resultó no significativa ($F=0.84$, $gl=18,56$, $P>0.05$) sobre el porcentaje de germinación (figura 39).

Por otra parte, la deshidratación en semillas de P. armata

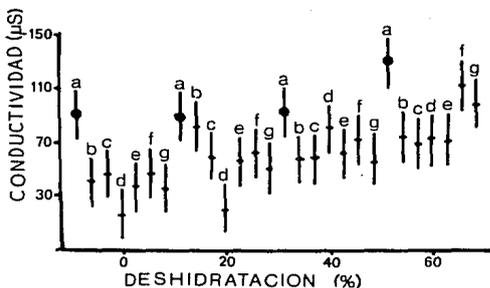


Figura 38. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *P. arata* ($n=280$; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca^{++} ; f, sacarosa; g, ABA).



Figura 39. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *P. arata* ($n=1050$; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca^{++} ; f, sacarosa; g, ABA).

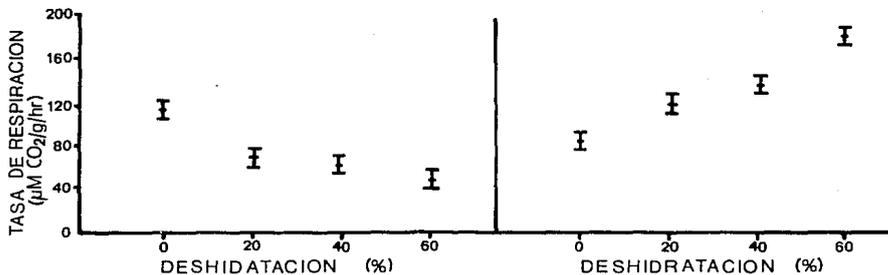


Figura 40. Efecto de la deshidratación sobre la tasa de respiración promedio en semillas de *P. arata* antes (a) y después (b) de la imbibición. ($n=280$; Tukey al 0.05%).

reduce progresivamente la tasa inicial de respiración (figura 40a); sin embargo, los análisis estadísticos muestran que una deshidratación de 20% fue suficiente para producir una diferencia significativa ($F=60.21$, $gl=3,56$, $P<0.0001$) con respecto a las semillas no deshidratadas. En otras palabras, una ligera deshidratación reduce el metabolismo respiratorio en las semillas de P. armata, antes de la imbibición. Esta reducción puede ser una consecuencia de la carencia de agua (Roberts, 1973b; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Garwood y Lighton, 1990), ya que, como se mencionó antes, probablemente las moléculas no se pueden mover de un centro de metabolismo a otro por falta de agua (Berjak et al., 1984).

Sin embargo, una vez que las semillas han absorbido agua, la tasa de respiración presenta un comportamiento inverso; es decir, después de la imbibición la tasa de respiración incrementa significativamente ($F=134.63$, $gl=3,56$, $P<0.00001$) conforme progresa la deshidratación (figura 40b). De tal forma que las semillas que se sometieron a una mayor deshidratación son las que muestran la mayor tasa de respiración, indicando que requieren producir más energía para compensar la menor producción inicial, y probablemente para sostener algún mecanismo de reparación; sin embargo, al parecer este esfuerzo es insuficiente para mantener la viabilidad. En la figura 40 se observa que la tasa de respiración final en semillas no deshidratadas es significativamente menor ($F=509.86$, $gl=1,130$, $P<0.00001$) que la tasa de respiración inicial en las mismas semillas, sugiriendo que requieren un menor gasto energético para su germinación.

Se puede observar que el incremento en la conductividad del medio de inmersión provocado por la deshidratación (figura 35), se relaciona en forma inversa ($r=-0.92$) con la tasa de respiración inicial (figura 40a) y con la germinación ($r=-0.91$) (figura 34). Bewley y Black (1978) y Priestley (1986) reportan que las membranas en general, proporcionan un mecanismo de control del metabolismo intermediario, proporcionando una estructura dinámica para que se realicen numerosas reacciones enzimáticas, incluso

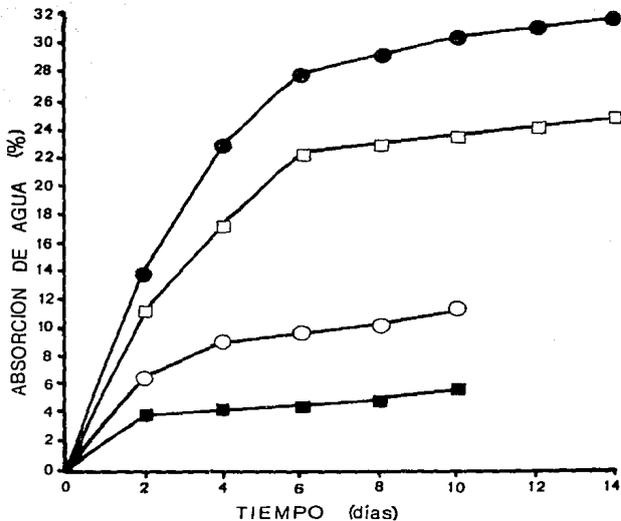


Figura 41. Curvas de hidratación de semillas de *C. argata* con diferente nivel de deshidratación inicial (■) 0%, (□) 20%, (○) 40%, (●) 60%.

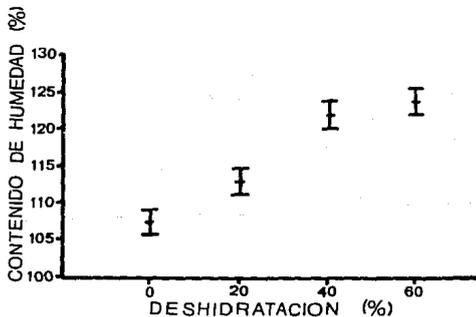


Figura 42. Efecto de la deshidratación sobre el contenido de humedad promedio que alcanzaron las semillas de *P. argata* al momento de la germinación.

algunas enzimas respiratorias están asociadas con las membranas mitocondriales; de tal forma que, cualquier perturbación en el sistema de membranas tendrá consecuencias inmediatas en la fisiología celular, lo cual puede contribuir en diferente grado al deterioro y reducción de la viabilidad.

En las figura 41 se muestran las curvas de hidratación de las semillas de P. armata con diferente nivel de deshidratación. En esta figura se puede apreciar que la duración de las fases es diferente cuando las semillas son sometidas a diferentes niveles de deshidratación (tabla 7). La pendiente de la fase I incrementó conforme incrementa el nivel de deshidratación, indicando que las semillas más deshidratadas absorben agua más rápido que las semillas no deshidratadas.

TABLA 7. FASES DE HIDRATACION EN SEMILLAS DE P. armata CON DIFERENTE NIVEL DE DESHIDRATACION INICIAL.

DESH (%)	FASE I		FASE II DURACION (DIAS)	FASE III INICIO (DIAS DESPUES DE LA SIEMBRA)	TIEMPO DE GERMINACION (DIAS)
	VELOCIDAD (PENDIENTE)	DURACION (DIAS)			
0	1.05	4	5	9	19
20	2.24	4	5	9	19
40	3.62	6	8	14	14
60	4.61	6	8	14	10

El tiempo de germinación se acorta conforme progresa la deshidratación, lo cual puede deberse al incremento en la velocidad de entrada de agua. Esta mayor velocidad de hidratación probablemente acelera el metabolismo acelerando la germinación de las semillas viables en la muestra.

Por otra parte, a diferencia de las especies anteriores, el contenido de humedad final que alcanzan las semillas al momento de la germinación incrementó significativamente ($F=68.93$, $gl=3,252$,

$P < 0.00001$) conforme incrementó la deshidratación, aunque entre los mayores niveles de deshidratación (40% y 60%) no hay diferencias significativas (figura 42). Esta respuesta resulta interesante, ya que indica que las semillas más deshidratadas no sólo recuperan el agua perdida sino que necesitaron absorber una cantidad extra mayor que las menos deshidratadas. La deshidratación inicial impuesta en las semillas de *P. armata* ejerce un efecto importante en su respuesta fisiológica.

9.7 Chamaedorea tepejilote

Los resultados obtenidos en esta especie incluyen únicamente 2 niveles de deshidratación (semillas no deshidratadas, y semillas deshidratadas 40% y 60%) debido a que la cantidad de semillas colectadas fue insuficiente para ensayar los mismos niveles que en el resto de las especies.

Se encontró que el porcentaje de germinación en semillas de Ch. tepejilote disminuyó significativamente ($F=121.88$, $gl=2,42$, $P<.0001$) y en forma gradual conforme incrementó el nivel de deshidratación (figura 43); en otras palabras, la deshidratación provoca una disminución en la capacidad de germinación en las semillas de esta especie, sugiriendo un comportamiento recalcitrante típico. Su respuesta se ajusta a la hipótesis del contenido de humedad no crítico mencionada anteriormente.

Las semillas de esta especie son producidas durante la época de lluvias, su comportamiento frente a la deshidratación en condiciones de laboratorio sugiere que no son tolerantes a la deshidratación, ya que su germinación se redujo sensiblemente.

La disminución en la capacidad de germinación no se explica por la salida de solutos conforme las semillas pierden agua, debido a que se produjo una disminución significativa ($F=16.1$, $gl=2,189$, $P<0.00001$) en la conductividad del medio de inmersión en semillas de Ch. tepejilote deshidratadas 40%. Mientras que una mayor deshidratación (60%) regresa los niveles de conductividad a los de las semillas no deshidratadas (figura 44), sugiriendo que la deshidratación no afecta el estado de salud en las semillas de esta especie y, por lo tanto, no existe una relación directa entre salida de solutos y germinación.

El hecho de que las semillas no deshidratadas muestren una mayor conductividad que las semillas deshidratadas 20% sugiere que la integridad de las membranas es incompleta cuando las semillas son liberadas. Pero la aplicación de cualquier metabolito ayuda a restablecer la integridad. En la figura 45, se observa este efecto, es decir la aplicación de tratamientos redujo significativamente ($F=10.13$, $gl=6,189$, $P<0.00001$) la salida de solutos con respecto a

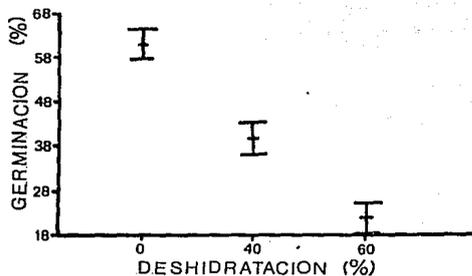


Figura 43. Efecto de la deshidratación sobre la germinación promedio de semillas de *C. tepejilote* (n=1050; Tukey al 0.05%).

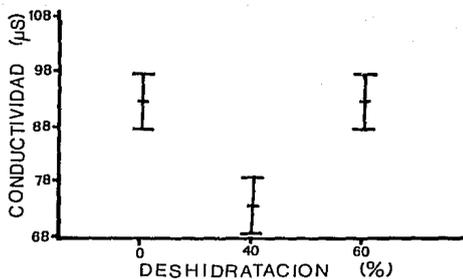


Figura 44. Efecto de la deshidratación sobre la conductividad promedio de semillas de *C. tepejilote* (n=280; Tukey al 0.05%).

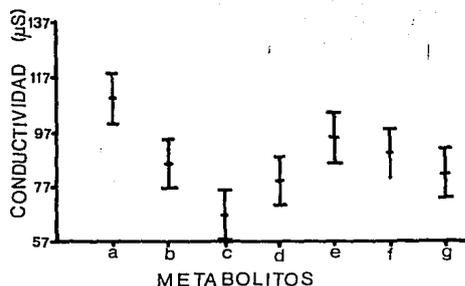


Figura 45. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *C. tepejilote* (n=280; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca++; f, sacarosa; g, ABA).

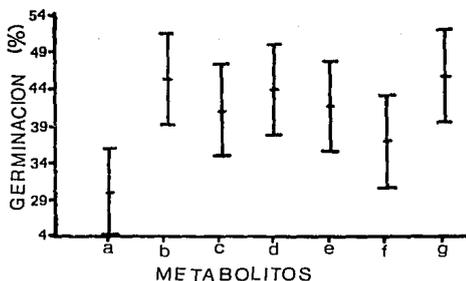


Figura 46. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *C. tepejilote* (n=1050; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca++; f, sacarosa; g, ABA).

las semillas control. A diferencia de las especies analizadas anteriormente, la respuesta observada en la conductividad con la aplicación de metabolitos se refleja en la germinación. Es decir, la aplicación de metabolitos incrementó significativamente ($F=4.05$, $gl=6,42$, $P<0.005$) la capacidad de germinación con respecto a las semillas no tratadas (figura 46), sugiriendo que el efecto de los metabolitos sobre las condiciones de salud de las semillas es muy importante para mejorar la respuesta germinativa. Aunque existe la posibilidad de que la respuesta observada se deba al efecto "priming", ya que las semillas tratadas con agua respondieron de la misma forma que las semillas tratadas con las soluciones.

La interacción entre la deshidratación y la aplicación de metabolitos resulto significativa ($F=4.78$, $gl=12,189$, $P<0.00001$) sobre la conductividad (figura 47), indicando que el efecto de los metabolitos cambia cuando cambia el nivel de deshidratación de las semillas; pero fue no significativa ($F=1.39$, $gl=12,62$, $P>0.05$) en la respuesta germinativa (figura 48).

Al analizar el efecto de la deshidratación sobre la respiración antes de la imbibición de las semillas se encontró que la tasa de respiración inicial decrece significativamente ($F=154.03$, $gl=2,42$, $P<0.00001$) conforme progresa la deshidratación en las semillas (figura 49a). Sin embargo, una vez que las semillas se han imbibido se produce un efecto contrario, es decir, se produce un incremento significativo ($F=125.06$, $gl=2,42$, $P<0.00001$) en la tasa de respiración final conforme incrementa el nivel de deshidratación (figura 49b). La interpretación de estos resultados es la misma que en las semillas de P. armata (pág. 92).

En la figura 50 se muestran las curvas de hidratación expresadas en porcentaje de agua absorbida, en donde se aprecia que la pendiente de la primera fase de hidratación incrementa conforme incrementa el nivel de deshidratación de las semillas (tabla 8), indicando que las semillas más deshidratadas absorben agua a una mayor velocidad que las semillas no deshidratadas. La duración de la fase I incrementa en las semillas más deshidratadas, indicando que a pesar de que la velocidad de absorción es mayor, les toma más

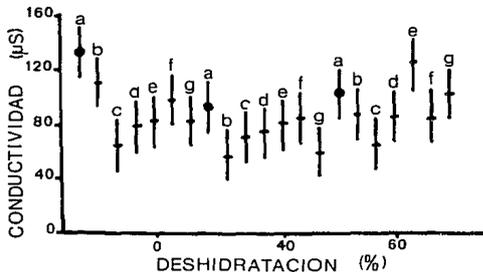


Figura 47. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *C. tepejilote* (n=280; Tukey al 0.05%. Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

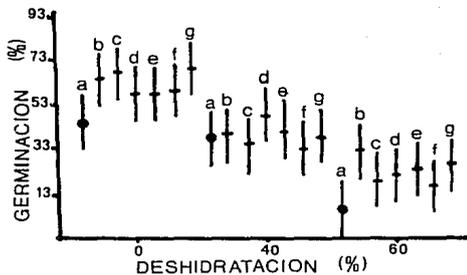


Figura 48. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *C. tepejilote* (n=1050; Tukey al 0.05%. Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

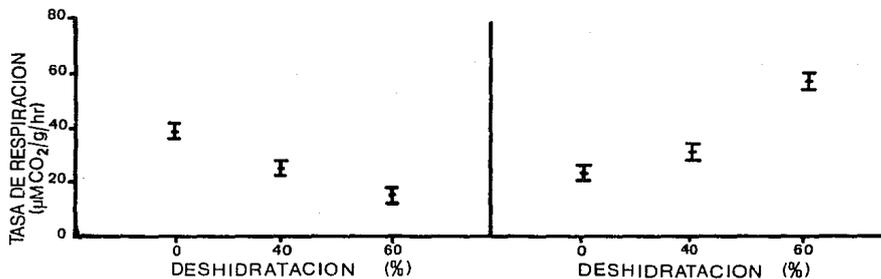


Figura 49. Efecto de la deshidratación sobre la tasa de respiración promedio en semillas de *C. tepejilote* antes (a) y después (b) de la imbibición. (n=280; Tukey al 0.05%).

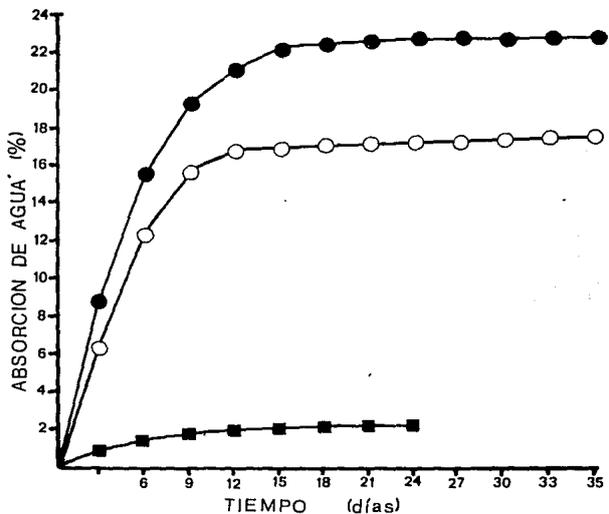


Figura 50. Curvas de hidratación de semillas de *C. tepejilote* con diferente nivel de deshidratación inicial (■) 0%, (□) 20%, (○) 40%, (●) 60%.

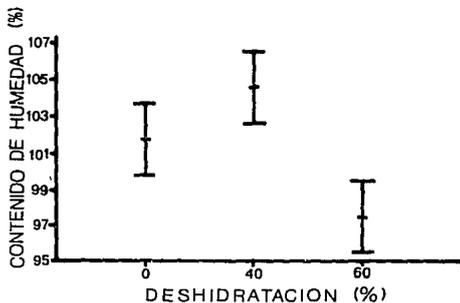


Figura 51. Efecto de la deshidratación sobre el contenido de humedad promedio que alcanzaron las semillas de *C. tepejilote* al momento de la germinación.

tiempo a las semillas recuperar el agua perdida; probablemente por esta razón, la germinación (en la muestra) en las semillas más deshidratadas inicia más tarde que TABLA 8. FASES DE HIDRATACION EN SEMILLAS DE Ch. tepejilote CON DIFERENTE NIVEL DE DESHIDRATACION INICIAL.

DESH (%)	FASE I VELOCIDAD (PENDIENTE)	DURACION (DIAS)	FASE II DURACION (DIAS)	FASE II INICIO (DIAS DEPUES DE LA SIEMBRA)	TIEMPO DE GERMINACION (DIAS)
0	0.16	12	13	25	175
40	1.43	12	24	36	164
60	1.87	15	21	36	164

en las no deshidratadas, pero se acorta el tiempo de germinación de las semillas viables. Esto sugiere que la mayor velocidad en la entrada de agua incrementa la actividad metabólica (figura 49b), acelerando así la germinación de las semillas viables; pero este esfuerzo es insuficiente para mantener la viabilidad (figura 43).

Por otra parte, a pesar de que las semillas más deshidratadas absorbieron una mayor cantidad de agua que las semillas no deshidratadas, el contenido de humedad final que alcanzaron al momento de la germinación fue significativamente ($F=10.94$, $gl=2,189$, $P<0.00001$) menor que en las semillas no deshidratadas (figura 51). Esto pudo deberse a que parte de las semillas de la muestra (las no viables) no entraron en la fase II de hidratación, y por lo tanto, reducen el valor promedio obtenido en este ensayo.

Se sabe que la rápida entrada de agua en semillas ortodoxas desecadas puede producir daños y reducir la germinación (Roberts y Ellis, 1989). Los resultados de germinación obtenidos en las semillas de esta especie, sugieren que existe daño, el cual se corrobora por de la salida de solutos observada; sin embargo, no se puede saber si este daño fue ocasionado por la deshidratación o por la mayor velocidad de entrada de agua.

9.8 Rheedia edulis

Los resultados muestran que la germinación en semillas de R. edulis se ve afectada significativamente ($F=392.36$, $gl=3,56$, $P<0.0001$) por la deshidratación, ya que el porcentaje de germinación disminuyó proporcionalmente ($r=0.98$) conforme incrementó el nivel de deshidratación inicial de las semillas (figura 52). Esta pérdida de viabilidad observada es casi total en las semillas más deshidratadas, lo cual implica que las semillas de esta especie muestran una conducta recalcitrante típica, ajustándose a la hipótesis del contenido de humedad no crítico enunciada por Villiers.

La hipótesis de que la capacidad de germinación está relacionada con la pérdida de solutos conforme las semillas pierden agua, no se aplica a las semillas de esta especie. Esto es sugerido por los valores de conductividad observados, los cuales no muestran un cambio significativo ($F=1.82$, $gl=3,252$, $P>0.05$) conforme progresa la deshidratación (figura 53); en esta figura se observa que, los valores de conductividad registrados son muy bajos comparados con los que se observan en las demás especies estudiadas. Estas respuestas pueden deberse a varias razones: 1) a que la estructura de las membranas no se ve afectada por la deshidratación; 2) que se haya producido daño en la estructura de las membranas, pero que éste no se refleje en la salida de solutos; ó 3) que la cubierta de las semillas sea poco permeable a la salida de partículas con carga (iones). Esta última idea es apoyada por la lenta deshidratación observada en estas semillas (figura 6), la cual sugiere que la cubierta es poco permeable al paso del agua. Simon (1984) sugiere que la testa puede actuar como una "barrera" que regula el paso del agua, pero que al parecer puede actuar en otras formas, p. ej., como barrera a la salida de solutos.

Por otra parte, se encontró que la aplicación de sacarosa produjo un incremento significativo ($F=280.58$, $gl=6,252$, $P<0.0001$) y dramático en la conductividad del agua de inmersión independientemente del contenido de humedad de las semillas (figuras 54 y 56); lo cual podría deberse a que la sacarosa no haya

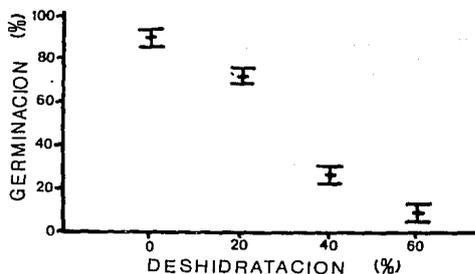


Figura 52. Efecto de la deshidratación sobre la germinación promedio de semillas de *R. edulis* (n=1050; Tukey al 0.05%).

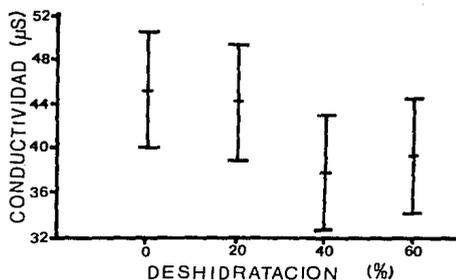


Figura 53. Efecto de la deshidratación sobre la conductividad promedio de semillas de *R. edulis* (n=280; Tukey al 0.05%).

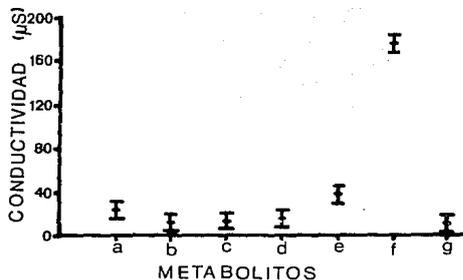


Figura 54. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *R. edulis* (n=280; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

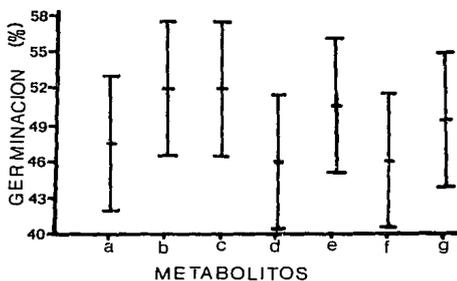


Figura 55. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *R. edulis* (n=1050; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

penetrado totalmente a las células, sino que haya quedado en los espacios intersticiales o incluso en la testa; de tal forma que al colocar a las semillas en agua, se removiera la sacarosa (la cual fue aplicada a una alta concentración), incrementando los niveles de conductividad. Por el contrario, los demás metabolitos no produjeron un efecto significativo con respecto al control; ya sea porque no producen ningún efecto en la estructura de las membranas, ó a que probablemente no penetraron en las semillas debido a que la hidratación es muy lenta (tabla 9), así que el tiempo de imbibición de los tratamientos pudo no ser suficiente para las semillas de R. edulis. El efecto producido por la sacarosa sobre la conductividad no se refleja en la germinación de las semillas (figura 55), ya que no se encontraron diferencias significativas ($F=1.11$, $gl=6,56$, $P>0.05$) entre el control y los tratamientos, indicando que el incremento en la conductividad provocada por la sacarosa no se debe a daños en las semillas; por el contrario, apoyan la idea de que los metabolitos no penetraron en las semillas de esta especie.

La interacción entre el efecto de la deshidratación y la aplicación de metabolitos resultó no significativa ($F=0.84$, $gl=18,252$, $P>0.05$) tanto en la conductividad (figura 56) como en la germinación ($F=1.75$, $gl=18,56$, $P>0.05$) (figura 57), indicando que el efecto de los metabolitos no cambia cuando cambia el nivel de deshidratación de las semillas. Esto quiere decir que el incremento observado en la conductividad, provocada por la aplicación de sacarosa, se mantiene constante conforme cambia el nivel de deshidratación, y que los metabolitos no modifican la germinación en ningún nivel de hidratación.

Por otra parte, la tasa de respiración antes de la imbibición no se modifica significativamente ($F=1.59$, $gl=3,56$, $P>0.05$) por efecto de la deshidratación (figura 58a). Esto sugiere la posibilidad de que la testa además de regular el paso del agua (Simon, 1984) y de solutos, también sea relativamente impermeable al paso de los gases; esta idea es apoyada por los bajos valores observados en la tasa de respiración con respecto a la de las demás especies. Esta baja tasa respiratoria indica que el metabolismo en

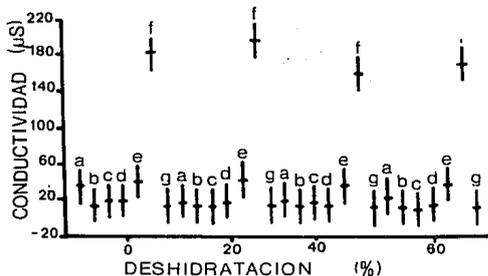


Figura 56. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *R. edulis* ($n=280$; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

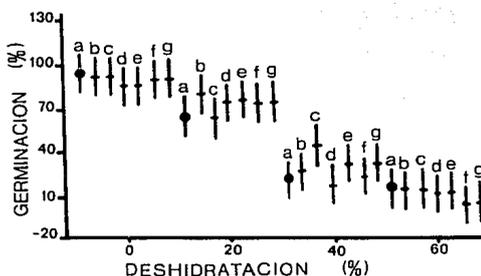


Figura 57. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *R. edulis* ($n=1050$; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

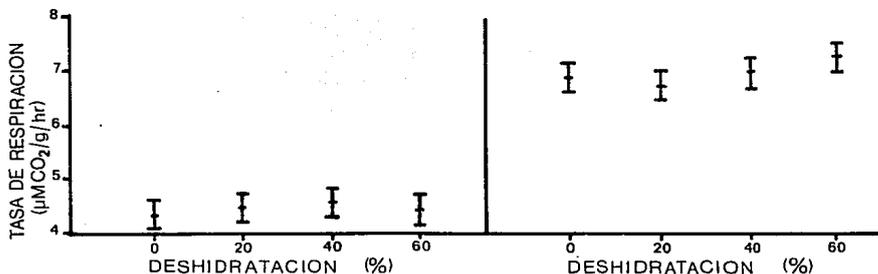


Figura 58. Efecto de la deshidratación sobre la tasa de respiración promedio en semillas de *R. edulis* antes (a) y después (b) de la imbibición. ($n=280$; Tukey al 0.05%).

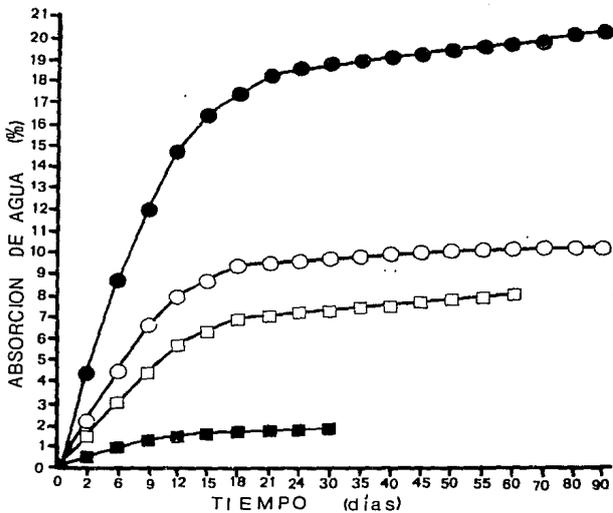


Figura 59. Curvas de hidratación de semillas de *R. edulis* con diferente nivel de deshidratación inicial (■) 0%, (□) 20%, (○) 40%, (●) 60%.

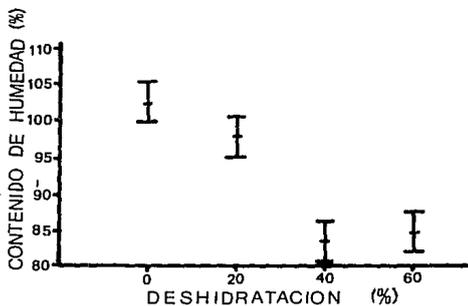


Figura 60. Efecto de la deshidratación sobre el contenido de humedad promedio que alcanzaron las semillas de *R. edulis* al momento de la germinación.

estas semillas es muy lento (a pesar del alto contenido de humedad con el que son liberadas), tanto, que no pueda reducirse más por efecto de la deshidratación, ya que probablemente los valores observados correspondan a la tasa metabólica mínima necesaria para que las semillas se mantengan vivas, lo cual sugeriría que se encuentran en un estado de latencia.

Después de la imbibición, se observa un incremento general en la tasa de respiración final con respecto a la inicial ($F=649.54$, $gl=1,130$, $P<0.00001$), indicando que se reactiva el metabolismo de las semillas (figura 58b). Sin embargo, la deshidratación no modificó ($F=1.85$, $gl=6,56$, $P>0.05$) la tasa de respiración final.

En la figura 59 se observa que la hidratación en las semillas de esta especie toma mucho tiempo con respecto a lo que se observa en las demás especies; sobre todo, se observa que la fase II es muy larga y que su duración incrementa con la deshidratación (tabla 9). En la figura 59 se observa que la velocidad de hidratación en la fase I incrementa conforme incrementa el nivel de deshidratación, indicando que la hidratación es más rápida en las semillas más deshidratadas; su duración aumenta conforme incrementa el nivel de deshidratación, indicando que a pesar de que la absorción de agua es más rápida en las semillas más deshidratadas, les toma más tiempo recuperar

TABLA 9. FASES DE HIDRATAACION EN SEMILLAS DE R. edulis CON DIFERENTE NIVEL DE DESHIDRATAACION INICIAL.

DESH (%)	FASE I		FASE II	FASEIII	TIEMPO DE GERMINACION (DIAS)
	VELOCIDAD (PENDIENTE)	DURACION (DIAS)	DURACION (DIAS)	INICIO (DIAS DESPUES DE LA SIEMBRA)	
0	0.11	15	15	30	330
20	0.39	18	43	61	300
40	0.46	18	56	74	270
60	0.87	21	69	90	210

el agua perdida. Probablemente por esta razón, la germinación inicia más tarde en las semillas más deshidratadas, pero se acorta el tiempo de germinación de las semillas viables.

A pesar de que las semillas más deshidratadas (40 y 60%) absorbieron una mayor cantidad de agua que las no deshidratadas, el contenido de humedad final que alcanzaron al momento de la germinación fue significativamente menor ($F=46.09$, $g1=3,252$, $P<0.00001$) que en las no deshidratadas (figura 60), incluso su contenido de humedad fue menor al 100%. Esto pudo deberse a que las semillas no viables de la muestra que no entraron en la fase III (Hamabata y Martínez, 1980; Pehap, 1987) redujeron el valor promedio obtenido.

El retardo en el inicio de la germinación de las muestras (independientemente de la deshidratación), comparada con las demás especies estudiadas, puede deberse a que el embrión se encuentre en un estado inmaduro (latencia endógena); esta idea es apoyada por los bajos valores en la tasa de respiración inicial observados. Además el tiempo de germinación en las semillas de esta especie es el más largo, comparado con las demás especies.

La cubierta en estas semillas, al parecer por los resultados obtenidos, es poco permeable al paso del agua, ya que tanto la deshidratación como la rehidratación fue más lenta que en las demás especies. Aunque otro factor muy importante que puede haber contribuido en la lenta rehidratación es el tamaño grande de las semillas, el cual reduce la relación superficie volumen, provocando que la hidratación sea lenta, sobre todo de las células interiores incluyendo el embrión. Ya que se sabe que la hidratación se realiza de la periferia hacia el interior hidratándose primero los tejidos de reserva y después el embrión (Ching, 1972; Hamabata y Martínez, 1980; Simon, 1984; Priestley, 1986; Pehap, 1987). Quizá por esta razón sea lenta la reactivación del metabolismo, cuyo bajo nivel puede contribuir además a que la síntesis de compuestos necesarios para la germinación sea lenta, alargando así la fase II de hidratación.

La disminución en la viabilidad de las semillas de *R. edulis*

por efecto de la deshidratación, no se relaciona con la salida de solutos ni con la tasa de respiración inicial y final, lo cual sugiere que no son las causas de la pérdida de viabilidad; incluso tampoco se puede pensar en daños ocasionados por una rápida hidratación, ya que ésta fue muy lenta comparada con otras especies. De tal forma que la reducción en la viabilidad pudo ser ocasionada por alteraciones en algún otro proceso, ya que la germinación es el resultado de una serie de procesos, no sólo hidratación, daño en membranas y respiración.

9.9 Stemmadenia donnell-smithii

La deshidratación en las semillas de S. donnell-smithii, a diferencia de las demás especies, no modifica el porcentaje de germinación ($F=1.32$, $gl=3,56$, $P>0.01$); lo cual indica que estas semillas no muestran un comportamiento recalcitrante, a pesar de liberadas con un alto contenido de humedad ($40.26\% \pm 6.24$); además la viabilidad es muy alta aún en las semillas más deshidratadas (figura 61).

Por otra parte los valores de conductividad obtenidos son los más bajos, comparados con los obtenidos en las demás especies estudiadas, y no muestran cambios significativos ($F=1.07$, $gl=3,252$, $P>0.05$) provocados por la deshidratación (figura 62). Lo anterior indica que las membranas no sufren alteraciones provocadas por la deshidratación, si aceptamos la hipótesis de que la conductividad es el reflejo de cambios en la estructura de las membranas (Abdul-Baki y Anderson, 1972; Gosh et al., 1981). Sin embargo, la aplicación de metabolitos (incluyendo el tratamiento con agua), reduce significativamente ($F=51.28$, $gl=6,252$, $P<0.00001$) la conductividad del medio de inmersión, indicando que la integridad de las membranas es incompleta cuando son liberadas las semillas, y que la aplicación de soluciones mejora las condiciones iniciales de las membranas; ya sea por efecto "priming" o por la acción de los metabolitos (como se mencionó anteriormente, pág. 73).

El efecto producido por las soluciones de metabolitos sobre la conductividad del medio de inmersión, no se refleja en la respuesta germinativa; es decir, la capacidad de germinación no se modifica significativamente por la aplicación de metabolitos (figura 64).

Por otra parte se encontró que la interacción entre deshidratación y la aplicación de metabolitos resultó no significativa, tanto en la conductividad ($F=2.52$, $gl=18,252$, $P>0.05$, figura 65) como en la respuesta germinativa ($F=1.42$, $gl=18,56$, $P>0.05$, figura 66). Indicando que el efecto de los metabolitos se mantiene independiente de la deshidratación.

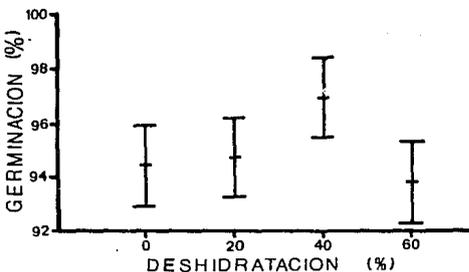


Figura 61. Efecto de la deshidratación sobre la germinación promedio de semillas de *S. donnell-smithii* (n=1050; Tukey al 0.05%).

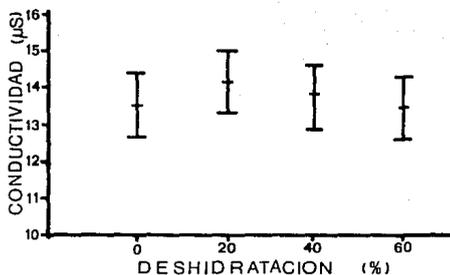


Figura 62. Efecto de la deshidratación sobre la conductividad promedio de semillas de *S. donnell-smithii* (n=280; Tukey al 0.05%).

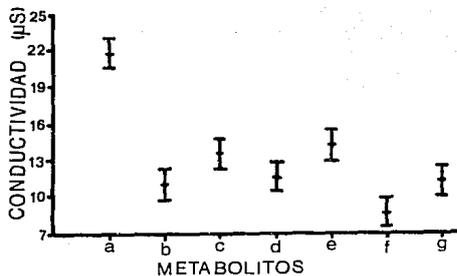


Figura 63. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *S. donnell-smithii* (n=280; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

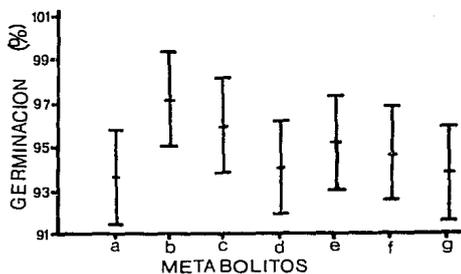


Figura 64. Efecto de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *S. donnell-smithii* (n=1050; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaína; e, Ca⁺⁺; f, sacarosa; g, ABA).

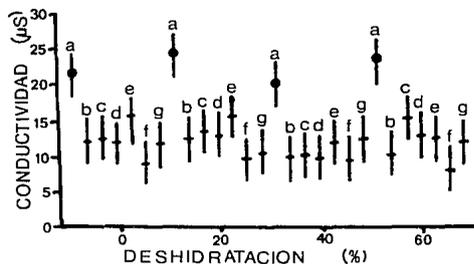


Figura 65. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la conductividad promedio de semillas de *S. donnell-smithii* ($n=280$; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca^{++} ; f, sacarosa; g, ABA).

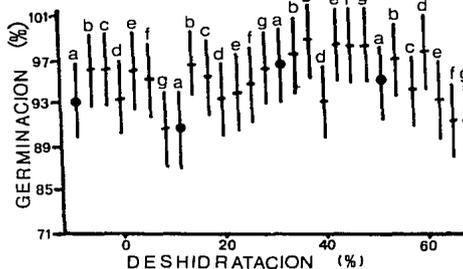


Figura 66. Interacción de los efectos de la deshidratación y de la aplicación de metabolitos compatibles sobre la germinación promedio de semillas de *S. donnell-smithii* ($n=1050$; Tukey al 0.05%). Metabolitos: a, control; b, agua desionizada; c, prolina; d, glicina-betaina; e, Ca^{++} ; f, sacarosa; g, ABA).

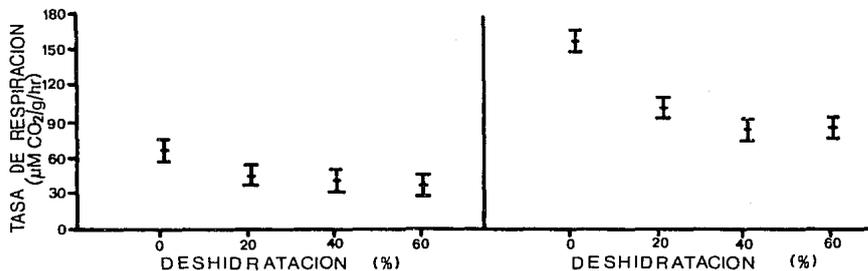


Figura 67. Efecto de la deshidratación sobre la tasa de respiración promedio en semillas de *S. donnell-smithii* antes (a) y después (b) de la imbibición. ($n=280$; Tukey al 0.05%).

La tasa de respiración inicial muestra una relación directamente proporcional ($r=0.90$) con el contenido de humedad de las semillas, es decir, conforme disminuye el contenido de humedad disminuye la tasa de producción de CO_2 ; sin embargo, las diferencias son significativas ($F=28.65$, $gl=3,56$, $P<0.00001$) únicamente cuando las semillas pierden 20% del contenido de humedad inicial, a partir del cual la disminución ya no es significativa (figura 67a).

La tasa de respiración final en las semillas de esta especie muestra un comportamiento diferente al que presentan las demás especies; es decir, en las otras especies la tasa de respiración final es inversa a la inicial, pero en S. donnell-smithii, el incremento en la respiración final es directamente proporcional al comportamiento a la inicial. En otras palabras, las semillas que mostraron la mayor tasa inicial muestran también la mayor tasa final. Los análisis estadísticos muestran que al igual que en la respiración inicial, una reducción de 20% en el contenido de humedad produce una reducción significativa ($F=51.46$, $gl=3,56$, $P<0.00001$), pero conforme la deshidratación progresa, la disminución es no significativa (figura 67b). Sin embargo, esta respuesta no se refleja en la germinación,

TABLA 10: FASES DE HIDRATACION EN SEMILLAS DE S. donnell-smithii CON DIFERENTE NIVEL DE DESHIDRATACION INICIAL.

DESH (%)	FASE I		FASE II		FASE III		TIEMPO DE GERMINACION (DIAS)
	VELOCIDAD (PENDIENTE)	DURACION (DIAS)	DURACION (DIAS)	DURACION (DIAS)	(DIAS DESPUES DE LA SIEMBRA)		
0	5.64	2	4	6	8		
20	9.76	2	4	6	8		
40	10.90	2	4	6	8		
60	20.61	2	4	6	8		

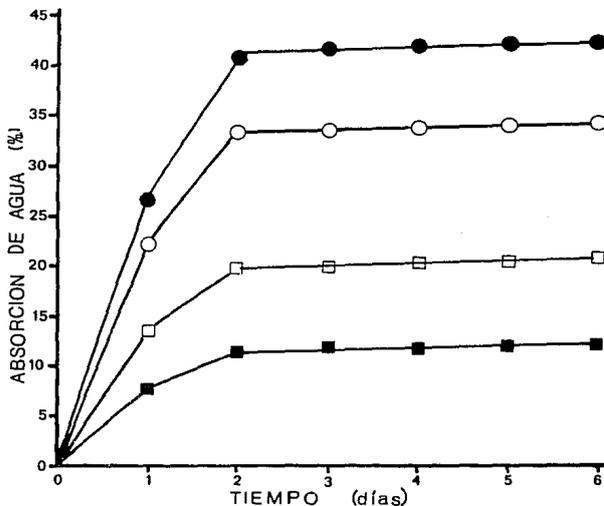


Figura 69. Curvas de hidratación de semillas de *S. donnell-smithii* con diferente nivel de deshidratación inicial (■) 0%, (□) 20%, (○) 40%, (●) 60%.

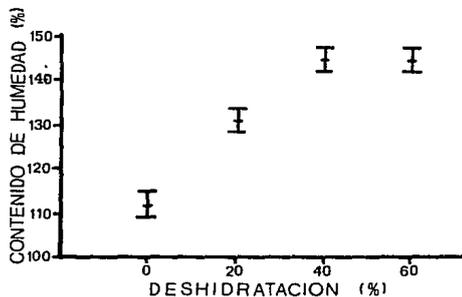


Figura 69. Efecto de la deshidratación sobre el contenido de humedad promedio que alcanzaron las semillas de *S. donnell-smithii* al momento de la germinación.

En la figura 68 se muestran las curvas de hidratación de S. donnell-smithii en las que se observa que la velocidad de hidratación en la fase I incrementa conforme disminuye el contenido de humedad (tabla 10), indicando que las semillas más deshidratadas absorben agua más rápido que las semillas sin deshidratar. El tiempo de germinación se mantuvo constante, independientemente del contenido de humedad inicial de las semillas.

A diferencia de las demás especies estudiadas, el contenido de humedad que alcanzaron las semillas al momento de la germinación incrementó significativamente ($F=114.37$, $gl=3,252$, $P<0.00001$) conforme incrementó el nivel de deshidratación (figura 69).

9.10 GERMINACION EN CAMPO

La germinación de las semillas estudiadas fue significativamente ($F=1000$, $gl=2,231$, $P<0.00001$) mayor en el interior de la selva que en el claro y en el sitio abierto (tabla 11), independientemente de la época de su producción, de su tamaño y su contenido de humedad al momento de la liberación. Esta respuesta puede deberse a que las condiciones de humedad del suelo y del aire son más favorables debajo del dosel, y a que la fluctuación de la temperatura del aire y del suelo es mucho mayor en los sitios fuera del dosel (tabla 12). Independientemente de la época del año se observa un incremento en la temperatura promedio del aire y del suelo en el claro y el sitio abierto con respecto al interior de la selva; además, las temperaturas máxima y mínima son más extremas en estos sitios. Los factores que al parecer son determinantes de las diferencias en la respuesta germinativa de las semillas son la humedad del aire y, sobre todo, la humedad del suelo, ya que son los factores que muestran una mayor variación entre sitios. Tanto la humedad del aire como del suelo se reducen drásticamente en el claro y en el sitio abierto y, como es lógico, durante el período de sequía son menores que durante los períodos de lluvias y nortes.

Se sabe que la capacidad de una semilla para absorber suficiente agua para su germinación depende tanto de las características de la semilla (tamaño e hidratabilidad), como de las condiciones del ambiente, incluyendo la humedad del suelo y su potencial hídrico (Bewley y Black, 1978; Harper *et al.*, 1970; Foster, 1986). De tal forma, la mayor disponibilidad de agua en el interior de la selva puede ser una de las causas principales de los mayores porcentajes de germinación observados en este sitio, pero las diferencias entre especies se pueden deberse principalmente a las características de las semillas. Una semilla debe absorber agua en la interfase suelo-semilla más rápido de lo que la pierde a la atmósfera para poder germinar (Bewley y Black, 1978). Por lo que la

TABLA 11. GERMINACION EN EL CAMPO EN TRES SITIOS DIFERENTES: INTERIOR DE LA SELVA, CLARO Y ABIERTO, DE SIETE ESPECIES DE LA VEGETACION DE LOS TUXTLAS, VER.

ESPECIE	SELVA X±SD	CLARO X±SD	ABIERTO X±SD
<i>D. digyna</i>	86.67±8.06	3.17±3.66	1.17±1.99
<i>C. baillonii</i>	88.33±5.48	6.00±3.07	1.83±1.99
<i>C. dentata</i>	43.42±18.0	3.17±1.62	0.83±1.34
<i>C. tepeilote</i>	76.67±8.16	19.67±18.3	3.99±1.86
<i>E. armata</i>	88.33±6.49	2.00±0.95	0.33±0.07
<i>R. edulis</i>	96.17±3.76	19.67±9.89	5.33±1.34
<i>S. donnell-smithii</i>	86.17±0.09	44.17±14.41	13.00±5.22

TABLA 12. COMPARACION DE LAS CONDICIONES MICROCLIMATICAS PROMEDIO DE LOS TRES SITIOS (SELVA, CLARO Y ABIERTO) REGISTRADAS DURANTE UN DIA, EN EL PERIODO DE DISPERSION DE LAS SEMILLAS.

	TEMPERATURA			HUMEDAD		
	AIRE X ± sd	min.	máx.	SUELO X ± sd	AIRE X ± sd	SUELO X ± sd
<u>EPOCA DE SEQUIA (marzo-abril)</u>						
SELVA	25.1±.39	22.5	25.5	24.4±.54	88.0±1.3	19.5±2.4
CLARO	27.2±1.5	22.0	31.0	26.3±1.2	73.1±1.5	14.6±1.5
ABIERTO	29.2±3.6	20.0	38.0	31.1±3.6	58.3±1.4	9.7±.91
<u>INICIO DE LLUVIAS (mayo-junio)</u>						
SELVA	24.1±.35	21.0	24.5	23.9±.57	99.2±1.8	22.9±2.4
CLARO	24.7±.50	20.0	25.5	25.9±.58	92.0±1.8	15.8±2.3
ABIERTO	26.6±1.7	19.0	29.0	26.9±1.2	79.2±2.6	12.9±1.3
<u>EPOCA DE LLUVIAS (agosto)</u>						
SELVA	25.1±.35	24.0	27.0	24.7±.29	99.5±2.5	29.8±1.9
CLARO	27.3±.59	23.0	32.0	27.5±.49	92.4±4.2	25.9±2.9
ABIERTO	29.5±1.7	22.0	35.0	29.5±1.6	81.3±2.7	18.3±1.4
<u>EPOCA DE NORTES (enero)</u>						
SELVA	22.4±.53	19.0	23.5	21.8±.25	89.3±1.6	24.7±1.6
CLARO	23.6±1.1	19.5	25.5	22.6±1.2	85.6±4.4	17.3±1.3
ABIERTO	24.6±1.8	15.5	27.5	23.0±1.4	79.7±1.3	13.5±1.4

entrada y salida de agua en las semillas (cantidad y velocidad) al parecer juega un papel muy importante en su respuesta fisiológica.

Los resultados obtenidos en el laboratorio indican que las semillas de S. donnell-smithii tepejilote, P. armata y C. baillonii se deshidratan con mayor facilidad que las semillas de D. digyna, C. dentata y R. edulis (figura 6), debido a que poseen cubiertas más delgadas y a que sus reservas están compuestas principalmente de lípidos (excepto C. baillonii como se explicó anteriormente), los cuales son hidrofóbicos (Nellis y Hughes, 1973; Bass, 1979). Sin embargo, la capacidad de rehidratación de las semillas difiere de su capacidad de deshidratación (histéresis ¹); es decir, en general las semillas estudiadas se deshidratan más rápido de lo que se rehidratan, particularmente las semillas de R. edulis, C. tepejilote y C. dentata (figura 70, tabla 13). Lo cual implicaría que en las semillas de esta últimas tres especies su rehidratación y, por lo tanto su germinación, fuera casi imposible en sitios con baja humedad como los claros y sitios abiertos, y que las especies restantes mantuvieran su capacidad de germinación en estos sitios. Sin embargo, las semillas de R. edulis, las cuales muestran la mayor diferencia entre las velocidades de deshidratación-rehidratación mostraron una menor reducción de su capacidad germinativa tanto en el claro como en el sitio abierto que las de

¹ La histéresis, un fenómeno conocido desde hace más de 40 años (Nellis y Hughes, 1973), se refiere a la diferencia que existe entre las curvas de adsorción-desorción de agua en sistemas orgánicos, cuando se calcula el contenido de humedad en equilibrio con la humedad relativa de la atmósfera (Nellis y Hughes, 1973; Harrington, 1975; Roberts, 1975; Bass, 1979). En el presente estudio no se determinó el contenido de humedad en equilibrio con la humedad relativa, debido a que existen considerables dificultades técnicas para su determinación (Nellis y Hughes, 1973). Sin embargo, aunque las curvas de hidratación-deshidratación se analizan en función del tiempo, se observa el mismo fenómeno, a pesar de que ambos procesos se aceleraron de manera artificial; es decir, la deshidratación se realizó por flujo de aire y la rehidratación sumergiendo a las semillas en agua, por lo que el grado al que ocurre esta aceleración depende de las características de retención de humedad y su movimiento en una semilla particular (Nellis y Hughes, 1973).

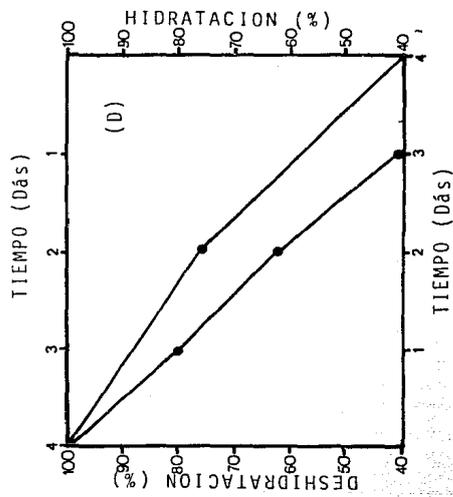
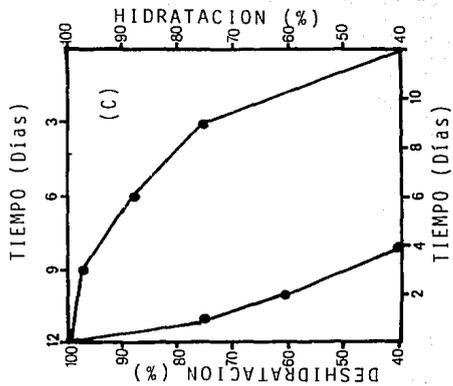
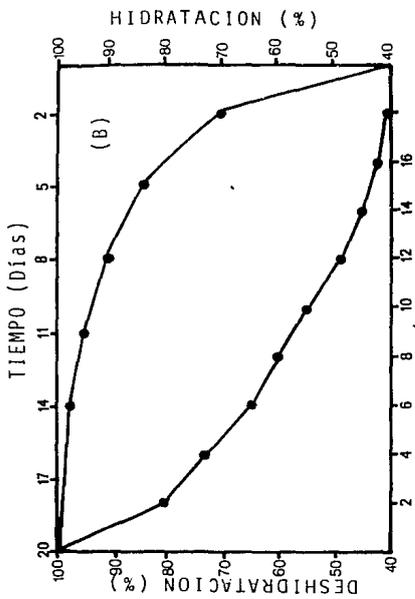
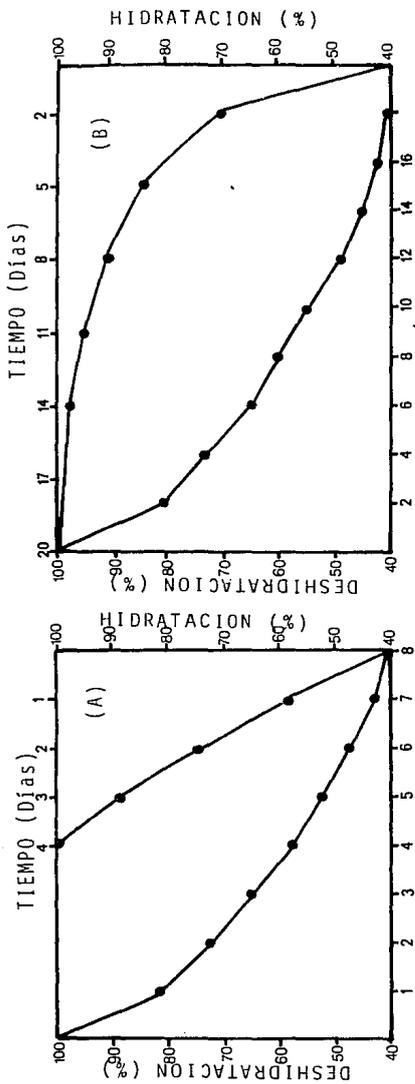


Figura 70a. Curvas de deshidratación-rehidratación de semillas de (A) Diospyros digyna, (B) Cupania dentata, (C) Cymbopetalum baillonii, (D) Poulseña armata.

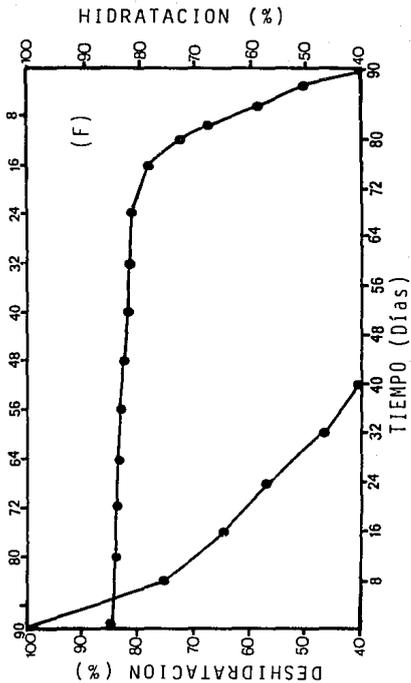
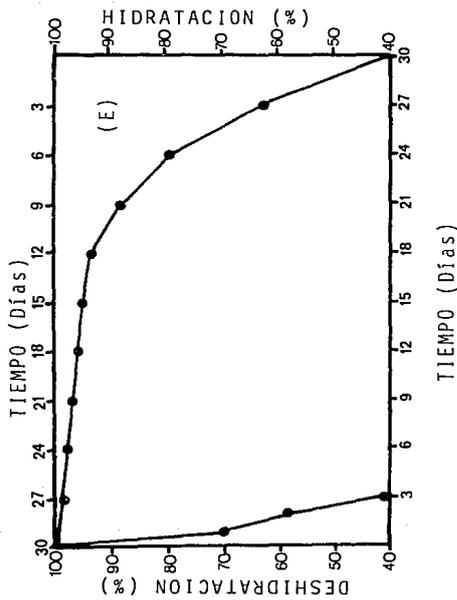


Figura 70b. Curvas de deshidratación-rehidratación en semillas de (E) *Chamadorea tepejilote*, y (F) *Rheedia edulis*.

C. tepejilote y C. dentata, a pesar de que en estos sitios la disponibilidad de agua es menor que en el interior de la selva. Así mismo, las semillas de D. digyna, E. armata y C. baillonii perdieron casi por completo su capacidad germinativa en el sitio abierto, a pesar de que la diferencia entre la velocidad de deshidratación y rehidratación es menor.

Si a lo anterior agregamos la influencia del tamaño de las semillas en su capacidad de absorción de agua, es de esperarse que las semillas más grandes absorban menos agua que las pequeñas. Grime (1979, citado por Foster, 1986) afirma que conforme incrementa el tamaño de las semillas disminuye su relación superficie/volumen, de tal forma que las semillas grandes pueden ser incapaces de absorber suficiente agua en suelos secos aun favorables para la germinación de semillas pequeñas. En la figura 69 se observa que la cantidad de agua que absorbe una semilla por gramo de tejido disminuye conforme incrementa el tamaño de la misma; lo cual implica que para una semilla grande es más difícil absorber agua que para una semilla más pequeña. Teóricamente, en las semillas más pequeñas (S. donnell-smithii, P. armata, C. dentata y C. tepejilote) su mayor capacidad para absorber agua por unidad de peso que las semillas más grandes (D. digyna y R. edulis) les permitiría germinar en sitios donde la disponibilidad de agua no fuera muy adecuada, como los claros y sitios abiertos. Sin embargo, pierden casi por completo su capacidad de germinación en estos sitios (aunque S. donnell-smithii mantiene su germinación en un nivel ligeramente mayor que las demás especies); por el contrario, las semillas de R. edulis, que son más grandes, absorben mucho menos agua por unidad de peso y más lentamente (en condiciones de laboratorio) dada su pequeña relación superficie/volumen, pero también la pierden más lentamente, sugiriendo que su cubierta es poco permeable al paso del agua. Esta podría ser la razón por la cual su capacidad de germinación se mantuvo ligeramente por arriba que la de las otras especies pequeñas, tanto en el claro como en el sitio abierto (excepto C. tepejilote y S. donnell-smithii). King y Roberts (1980b) mencionan

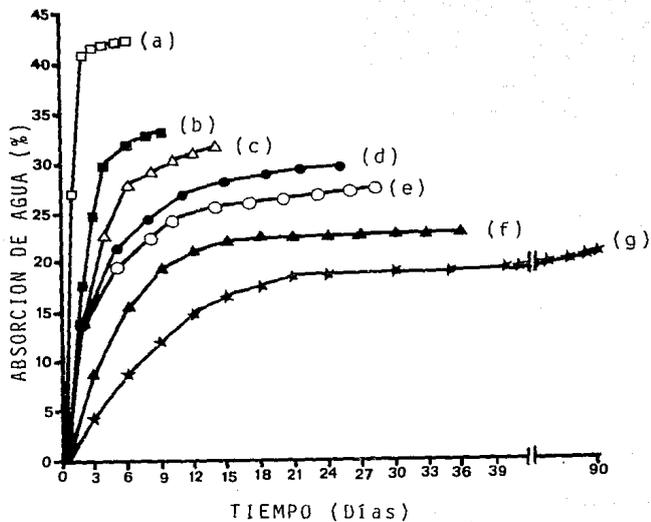


Figura 71. Curvas de hidratación promedio de semillas de (a) Stemmadenia donnell-smithii, (b) Diospyros digyna, (c) Poulsenia armata, (d) Cymbopetalum baillonii, (e) Cupania dentata, (f) Chamaedorea tepejilote y (g) Rheedia edulis.

que muchas semillas recalcitrantes tienen cubiertas relativamente impermeables al agua (p. ej. Michelina champaca y Citrus spp), lo cual puede servir para proteger a la semilla de la deshidratación, pero también puede impedir una rápida imbibición y como consecuencia retardar la germinación, como en el caso de R. edulis. Esto indica que la velocidad de absorción podría ser un factor más limitante que la velocidad de deshidratación, por lo menos para las semillas de esta especie.

En la tabla 13 se compara la velocidad de hidratación y el porcentaje de agua absorbida en semillas de las siete especies deshidratadas 60% en el laboratorio. Se puede apreciar que mientras mayor es la velocidad de hidratación es mayor el porcentaje de agua absorbida (figura 71), lo cual probablemente sea la causa de que el inicio de la germinación (fase III) en condiciones de laboratorio sea más rápida en semillas con mayor velocidad de hidratación (también se observa un incremento en la duración de las fases I y II provocada por la hidratación más lenta). Estos resultados implicarían que en los sitios con menor disponibilidad de agua (y con mayor evaporación), las semillas que tienen la capacidad de hidratarse a una mayor velocidad absorban agua rápidamente una vez que se hidrate el suelo, pero también está sujetas a una mayor pérdida de agua dada la mayor facilidad con que se deshidratan. Así su estatus hídrico depende de las condiciones de humedad del sitio, y sólo podrán germinar cuando su balance hídrico sea positivo (en equilibrio con la humedad del suelo y de la atmósfera). Dado que la humedad relativa y la humedad del suelo son menores tanto en el claro como en el sitio abierto, la pérdida de agua en las semillas más pequeñas puede ser el factor limitante para su germinación exitosa, más bien que la facilidad con la que son capaces de absorber agua.

Otro factor importante en la hidratación de las semillas es la forma en la que se realiza la absorción de agua; es decir, ésta se realiza de la periferia hacia el interior siguiendo la secuencia de una, dos y luego múltiples capas de agua que rodean a los tejidos, hidratándose primero la cubierta, después los

NO HAY PING

142

tejidos de reserva y por último el embrión (dependiendo de su posición anatómica). En este sentido, mientras más pequeño sea el

TABLA 13. HIDRATACION DE SEMILLAS DESHIDRATADAS 60% DE LAS 7 ESPECIES ESTUDIADAS.

ESPECIE	CH FINAL RELATIVO (%)	HIDRATACION					
		AGUA (%)	VEL	FI DURACION (DIAS)	FII	FASE III INICIO (DIAS)	
<u>S. d-smithii</u>	123.40	42.23	20.61	2	4	6	
<u>D. digyna</u>	107.53	31.98	7.50	5	4	9	
<u>P. armata</u>	110.24	31.64	4.61	6	8	14	
<u>C. baillonii</u>	102.26	30.09	2.18	12	13	25	
<u>C. dentata</u>	100.40	25.71	1.61	14	14	28	
<u>C. tepejilote</u>	99.8	23.03	1.44	15	21	36	
<u>R. edulis</u>	88.72		20.35	0.87	21	69	90

embrión en relación con el tamaño total de la semilla, más tardará en hidratarse y, por lo tanto, será más lenta la respuesta de la semilla. Este hecho puede ser relevante para las semillas grandes, además de su lenta absorción de agua. Estos dos factores producirán una lenta reactivación de macromoléculas y reacciones metabólicas, si además de lo anterior agregamos un desarrollo incompleto del embrión. Este parece ser el caso de las semillas de R. edulis, las cuales además de una lenta hidratación, mostraron una tasa de respiración baja, comparada con las semillas de las demás especies, y una germinación muy lenta, la cual sugiere un desarrollo incompleto del embrión.

Tomando en cuenta lo anterior y que las especies tolerantes pueden ser incapaces de germinar en sitios perturbados (como los claros o sitios abiertos), resulta sorprendente que las semillas de R. edulis y Ch. tepejilote, las cuales son consideradas como especies tolerantes, mantengan una mayor capacidad de germinación

Por otra parte, las semillas de S. donnell-smithii mostraron una mayor capacidad de germinación tanto en el claro como en el sitio abierto, que el resto de las especies. Esto puede deberse a que dado su menor tamaño, presentan una relación superficie/volumen mayor, y son capaces de absorber más agua (Figura 62), que las semillas más grandes. Además, las semillas de esta especie son ecológicamente distintas por ejemplo de C. tepejilote y P. armata, mientras esta últimas son más hacia el extremo de tolerantes, S. donnell-smithii es más demandante de claros.

CAPITULO 10

DISCUSION GENERAL

Los investigadores que se dedican al estudio de las posibilidades de almacenamiento de semillas para la conservación de germoplasma (Roberts, 1973c; Ng, 1976; Chin et al., 1981; Yap, 1981; Berjak et al., 1984; Tompsett, 1985, 1987; Cunha et al., 1989; Ferraz, 1989; Ferraz et al., 1989; Probert y Longley, 1989; Berjak et al., 1990; Fu et al., 1990, entre otros) comparten la idea de que los niveles de humedad de las semillas y la resistencia de las mismas ante la deshidratación (además de su resistencia a las bajas temperaturas) son las características fundamentales que determinan su capacidad de mantenerse viables en almacenamiento bajo condiciones convencionales.

No todas las semillas responden de igual manera a la reducción de su contenido de humedad, ya que algunas pierden viabilidad por efecto de la desecación y otras por el contrario incrementan su longevidad (Ellis y Roberts, 1980a; Ellis et al., 1990b). Esta diferencia, al parecer es de vital importancia para el éxito en la conservación de germoplasma, incluso en ella se basa fundamentalmente la clasificación de Roberts (1973c).

Tomando en cuenta los términos en los que Roberts (1973c) define a las semillas recalcitrantes, y analizando las características generales de las semillas estudiadas, encontramos que cinco de las siete especies (D. digyna, C. dentata, P. armata, C. tepejilote y R. edulis) son recalcitrantes por definición. Es decir, son liberadas con contenidos de humedad relativamente altos; muestran altas tasas de respiración al momento de ser liberadas, que van desde 4.36 hasta 105.26 μM de bióxido de carbono/g/hr en R. edulis y P. armata respectivamente [en comparación Garwood y Lighton, encontraron tasas de respiración de 4 a 101.6 μl de bióxido de carbono/g/hr en semillas recalcitrantes y de 0.3 a 2 μl de bióxido de carbono/g/hr en ortodoxas (datos no publicados)];

germinan relativamente rápido después de ser liberadas (excepto R. edulis); y por último, mostraron una reducción significativa en la capacidad de germinación cuando su contenido de humedad relativo se redujo hasta 40% (contenido de humedad real menor al 20%). Las semillas de G. baillonii y S. donnell-smithii poseen todas las características de semillas recalcitrantes excepto la reducción en la viabilidad por deshidratación, por lo que no concuerdan totalmente con la definición de semillas recalcitrantes.

King y Roberts (1980b) afirman que no se ha investigado completamente la relación entre viabilidad de las semillas y su contenido de humedad. En la presente investigación se encontró que no existe una relación clara entre el contenido de humedad inicial y el "grado" en la respuesta a la deshidratación (grado de "recalcitrancia") en condiciones de laboratorio (concretamente con la pérdida de viabilidad), ya que si existiera una relación directa entre contenido de humedad y pérdida de viabilidad, las semillas de D. digyna que tienen el contenido de humedad más alto deberían haber mostrado la mayor reducción en la viabilidad, y las semillas de P. armata que presentan el menor contenido de humedad deberían haber presentado la menor reducción, y sin embargo, no ocurrió así. Además ninguna especie mostró una pérdida total de viabilidad, lo cual sugiere que el máximo nivel de deshidratación impuesto no llegó al punto crítico (es decir, para observar pérdida total de viabilidad debieron probarse niveles de deshidratación más severos), o que las especies estudiadas se ajustan más bien a la hipótesis del contenido de humedad no crítico expuesta por Villiers. De cualquier manera, para determinar si existe o no un punto crítico por debajo del cual se produzca una pérdida total de viabilidad, sugiero que en posteriores investigaciones se realice un estudio imponiendo niveles de deshidratación mayores.

Por otra parte, Harper et al. (1970), Roberts (1973c), Tompsett (1985) y Foster (1986) afirman que las semillas más grandes son liberadas con contenidos de humedad mayores que las semillas más pequeñas (es decir, que el contenido de humedad está en función del tamaño de las semillas); de tal forma, se esperaría

que existiera una relación directa entre el tamaño de las semillas estudiadas y su contenido de humedad. Sin embargo, no se encontró esta relación en las especies estudiadas, ya que semillas tan pequeñas como S. donnell-smithii (0.09 g) y semillas tan grandes como R. edulis (4.88 g) son liberadas con contenidos de humedad mayores al 40% (en base fresca). Esto indica que no se puede generalizar o que se necesita estudiar un número mucho mayor de especies para encontrar esta relación. Además el contenido de agua de las semillas parece ser un parámetro más constante que su biomasa, ya que la variación en contenido de humedad es mucho menor que la variación en peso seco.

En la literatura (Sasaki, 1976; Berjak et al., 1984; King y Roberts, 1980a; Chin et al., 1981; Berjak et al., 1984; 1985; Nautiyal y Purohit, 1985a; 1985b; 1985c; Farrant et al., 1988; Dood et al., 1980b; Fu et al., 1990) se reporta que la deshidratación produce cambios irreversibles, que se traducen como daño o deterioro de las funciones de una semilla. Estos cambios se pueden producir a nivel fisiológico (reducción y retardo en la germinación), a nivel bioquímico (respiración) y a nivel citológico (estructura de membranas).

En cuanto al deterioro a nivel fisiológico se encontró que las semillas de todas las especies mostraron un retardo en el inicio de la germinación provocado por una deshidratación severa (60% del contenido de humedad inicial), y una reducción en el porcentaje de germinación. Aunque las semillas que se conservaron viables a pesar de la deshidratación, mostraron un tiempo de germinación más corto, lo cual al parecer es provocado por las diferencias en la velocidad de rehidratación que a su vez depende del nivel de deshidratación. El retardo en la germinación y la reducción en la viabilidad observada apoyan la hipótesis de deterioro a nivel fisiológico provocado por deshidratación (excepto en C. baillonii y S. donnell-smithii como se mencionó anteriormente).

La cinética del movimiento de agua en las semillas, ya sea entrada o salida de agua, conforme cambia su nivel de hidratación juega un papel muy importante en la respuesta fisiológica, no sólo

modificando el inicio de la germinación y su porcentaje, sino también la duración de las fases de hidratación. Hasta la fecha en ningún trabajo publicado se hace un análisis de la duración de las fases de hidratación en semillas con diferente nivel de hidratación inicial y su efecto en los procesos que dan lugar a la germinación. Tampoco se han analizado si las diferencias en la duración de las fases modifican la respuesta germinativa (porcentaje de germinación o tiempo de germinación). La modificación en la duración de las fases, sobre todo de la fase II, puede afectar la velocidad de algunos procesos metabólicos (como síntesis de proteínas y enzimas) y la velocidad de reactivación de otras moléculas y organelos, transporte de sustratos de un sitio a otro, etc., contribuyendo a las modificaciones de la respuesta fisiológica de las semillas. En las especies estudiadas se observó que en general la duración de las fase I y II incrementa conforme incrementa el nivel de deshidratación inicial de las semillas; esto indica que les toma más tiempo recuperar el agua perdida (fase I) y que necesitan un mayor tiempo para llevar a cabo los principales eventos metabólicos que preparan a las semillas para germinar (fase II).

En cuanto al deterioro a nivel bioquímico se encontró que en general, la deshidratación provoca una disminución en la tasa de respiración de las semillas antes de la imbibición (excepto en C. baillonii y R. edulis). Esta disminución puede deberse a la baja movilidad de moléculas (sustratos y enzimas) de un sitio de metabolismo a otro, la cual disminuye cuando disminuye el contenido de humedad de las semillas (Berjak et al., 1984). Después de la imbibición, la tasa de respiración incrementa en las semillas de todas las especies sugiriendo una reactivación del metabolismo respiratorio, lo cual indica que la funcionalidad metabólica no se ve afectada por la deshidratación. Incluso, las semillas más deshidratadas mostraron una mayor tasa de respiración final, lo cual, como se discutió anteriormente al analizar cada especie, indica que necesitan producir una mayor cantidad de energía para compensar la menor producción inicial, pero los resultados de germinación indican que todo el esfuerzo es insuficiente para

mantener la viabilidad (excepto en S. donnell-smithii, la cual no mostró disminución en viabilidad). Lo anterior implica que en las especies estudiadas no se produce deterioro a nivel bioquímico provocado por la deshidratación.

Por otra parte, en cuanto al deterioro a nivel citológico, Roberts (1973b), Hamabata y Martínez (1980), Gosh et al. (1981), Berjak et al. (1984), Nautiyal y Purohit (1985) y Priestley (1986) afirman que el mantenimiento de la estructura de membranas, es un factor importante en el mantenimiento de la viabilidad; de acuerdo con estos autores, la pérdida de integridad de membranas es uno de los primeros eventos relacionados con la pérdida de viabilidad en semillas desecadas. Por otra parte, Abdul-Baki y Anderson (1972), Roberts (1973b), Bewley y Black (1979), Gosh et al. (1981), Simon (1984) y Priestley (1986), afirman que la conductividad del agua en la que se encuentra inmerso un tejido incrementa cuando se producen cambios en la permeabilidad de las membranas. En el presente trabajo se encontró que la conductividad del medio de inmersión no está relacionada con la disminución de la viabilidad conforme incrementa la deshidratación en cinco de las siete especies estudiadas (D. digyna, C. baillonii, C. tepejilote, R. edulis y S. donnell-smithii). Por lo que la conductividad (o salida de solutos) no puede considerarse como un índice seguro de daños a nivel de membranas y de pérdida de viabilidad conforme se desecan las semillas en estas especies. En otras palabras, no podemos generalizar la hipótesis de que la deshidratación conduce a daños irreversibles en la estructura de las membranas, los cuales se traducen en una pérdida de viabilidad. Algunos investigadores exponen dudas acerca de la relación entre salida de solutos (daño en membranas) y pérdida de viabilidad en semillas. Por ejemplo, Abdul-Baki y Anderson (1970), Coolbeur et al. (1984), Halder y Gupta (1980, 1981) y Perl et al. (1978), encontraron poca o ninguna relación ó incluso relaciones positivas entre salida de solutos y viabilidad. Gosh et al. (1981) afirman que la salida de solutos no puede ser usada como prueba definitiva de pérdida de viabilidad debido a que semillas de arroz no viables almacenadas durante 5, 7

y 9 años mostraron incremento en la salida de solutos con la edad y afirman que sus resultados son buena evidencia de una creciente y continua pérdida de integridad de membranas aún después de que se ha perdido la viabilidad (a lo que ellos llaman "síndrome de más muerto que muerto"). Las diferencias en criterio pueden deberse a los métodos utilizados, diferencias entre especies utilizadas, y a la interpretación de los resultados.

La disminución observada en la viabilidad de las semillas estudiadas puede deberse a que el deterioro se produjo a otros niveles, o incluso, pudo haberse producido deterioro a nivel de membranas que no se reflejó en la salida de solutos. Para poder determinar con exactitud si la deshidratación conduce o no a cambios en la estructura de las membranas sería necesario hacer estudios a un nivel más fino. Por ejemplo, utilizando microscopía electrónica para conocer el verdadero estado de las membranas en tejidos secos; sin embargo los resultados obtenidos a través de estos métodos no han sido muy satisfactorios hasta la fecha. La técnica de microscopía electrónica se realiza utilizando fijaciones acuosas, lo cual puede producir resultados erróneos debido a que el tejido estudiado puede hidratarse antes de que sea fijado (Bewley, 1979; Gaff, 1980; Simon, 1984; Priestley, 1986). En contraste, la técnica fractura por congelación parece ser mas aceptable, ya que no da oportunidad de que el tejido desecado se hidrate (Simon, 1984).

Por otra parte, se sabe que la salida de solutos es un fenómeno transitorio y al parecer normal en semillas ortodoxas viables y, que por lo general, dura poco tiempo (dependiendo de la especie) después de la absorción de agua, sugiriendo que la integridad de las membranas en semillas viables es incompleta por lo menos al inicio de la imbibición. Este fenómeno puede parecer hasta cierto punto lógico, si pensamos que las semillas ortodoxas sufren un período de secado en la maduración, durante el cual sus membranas sufren cambios estructurales ordenados, de tal forma que la salida de solutos se realiza mientras las membranas recuperan su estructura original. Pero en semillas recalcitrantes que, al

parecer por los reportes en literatura (Berjak et al., 1984), no sufren secado en la maduración, y cuyas membranas por lo tanto no sufren rearrreglos estructurales antes de la dispersión, no hay razones para que se produzca una salida de solutos y sin embargo, también se produce. Lo cierto es que, al igual que en semillas ortodoxas, la salida de solutos parece ser un fenómeno normal, e incluso podríamos suponer que es universal, ya que todas las especies estudiadas mostraron salida de solutos incluso antes de ser deshidratadas en el laboratorio. Sugiriendo que también se desecan durante la maduración, aunque quizá no en el mismo grado que las ortodoxas típicas y, por lo tanto, la integridad de sus membranas es incompleta cuando son liberadas. Para saber con exactitud si este tipo de semillas sufren o no secado en la maduración, sugiero estudiar qué cambios a nivel estructural y metabólico se producen durante la maduración y antes de que las semillas sean liberadas.

Dado que la hidratación se realiza de la periferia hacia el interior de la semilla, la salida inicial de solutos debe provenir de las células periféricas, y conforme el agua se mueve hacia el interior de la semilla comienzan a hidratarse las células interiores pero lo hacen más lentamente, así que la salida de solutos se vuelve más lenta hasta que se detiene la imbibición (Simon, 1984). De tal forma, que la desigualdad en la distribución de la humedad dentro de las semillas puede influenciar la relación entre salida de solutos y tamaño de las semillas. Esto podría explicar, porqué las semillas de R. edulis y de D. digyna que son más grandes, mostraron una menor salida de solutos con respecto las semillas más pequeñas.

Por otra parte, Abdul-Baki y Anderson (1972) especulan que: los solutos que salen de las semillas deterioradas son pequeñas moléculas, y su movimiento a través de la membrana de un medio altamente concentrado a uno de baja concentración, en lugar de en contra de un gradiente de concentración, no necesariamente implica cambios en la permeabilidad de las membranas. Por lo tanto, antes de atribuir la salida de solutos a cambios en las membranas y

correlacionar esto con el deterioro de las semillas, sería necesario determinar de qué parte de la semilla provienen los solutos, y qué membrana en particular sufre cambios, es decir, saber si los solutos provienen del embrión en lugar de la semilla completa. Priestley (1986) afirma que la salida de solutos está influenciada por la condición de los tejidos no embrionarios, aunque tanto los tejidos embrionarios como los no embrionarios son importantes para la evaluación del nivel del deterioro. También habría que determinar la naturaleza química de los solutos que salen para comprobar si se trata o no de moléculas pequeñas.

Por otra parte, Bewley (1979) y Priestley (1986) afirman que cualquier perturbación en el sistema de membranas tendrá consecuencias inmediatas en la fisiología celular. Por lo que existe la posibilidad de que los cambios producidos a nivel de membranas provocados por deshidratación, se reflejen a nivel metabólico. Incluso Bewley (1979), Bewley y Black (1978), King y Roberts (1980b) y Villiers (1975) afirman que el deterioro de las membranas y la consecuente descompartmentalización de las células podría provocar la liberación de enzimas hidrolíticas y hacer entrar en contacto compuestos celulares tóxicos o no que normalmente se encuentran aislados. No se sabe si este deterioro en la fisiología celular incluye también un deterioro en el metabolismo respiratorio, ya que algunas de las enzimas que intervienen en la respiración están asociadas a las membranas mitocondriales. En el presente estudio se encontró que en general no existe una relación directa entre conductividad y tasa de respiración, lo cual sugiere que los cambios en la permeabilidad de membranas no están asociados con los cambios metabólicos.

Por otra parte, en cuanto a la aplicación de metabolitos compatibles, se sabe que un gran número de compuestos podrían actuar como metabolitos compatibles, por lo menos en teoría, para realizar funciones de osmorregulación, estabilización de la estructura y función de proteínas y membranas; sin embargo, un determinado organismo sólo puede utilizar uno o algunos de ellos

para cubrir esta necesidad (LeRudulier, 1984). Por esta razón, se aplicaron algunos metabolitos en las semillas cada especie para saber si alguno de ellos podría ejercer las funciones descritas. Hasta la fecha no se han publicado trabajos en los que se hayan aplicado este tipo de metabolitos en semillas para prevenir la salida de solutos y para ayudar a mantener la viabilidad. Los resultados mostraron que no todos los metabolitos produjeron una disminución significativa en la conductividad del agua de inmersión en las 7 especies estudiadas. Por ejemplo, solamente en semillas de C. tepejilote, P. armata y S. donnell-smithii, todos los metabolitos produjeron una reducción de la conductividad; en las demás especies sólo algunos metabolitos redujeron la conductividad; y dos casos excepcionales fueron la respuesta en semillas de R. edulis a la aplicación de sacarosa y de C. baillonii a la aplicación de ABA, los cuales en lugar de reducir la conductividad la incrementaron.

Dado que estos metabolitos ayudan a estabilizar las membranas, las cuales son uno de los primeros y principales sitios dañados por desecación, sería lógico esperar que los metabolitos que redujeron la salida de solutos ayudaran a mantener la viabilidad de las semillas; sin embargo, este efecto se observó únicamente en semillas de Ch. tepejilote, en las cuales todos los metabolitos redujeron la conductividad e incrementaron la germinación con respecto a los controles. En las demás especies en las que no se produjo este efecto, cabe la posibilidad de que la concentración a la que se aplicaron los metabolitos no fuera suficiente como para provocar un efecto notable sobre la viabilidad; o que el tiempo de absorción (48 horas) no fuera suficiente.

Por otra parte, desde el punto de vista ecológico, las especies estudiadas tienen un período de fructificación relativamente corto y definido en el año (aunque hay variaciones fenológicas y en ocasiones el período de fructificación se adelanta o se atrasa, dependiendo de las variaciones climáticas). Los períodos de fructificación se pueden separar de acuerdo con los períodos de lluvias; de tal forma tenemos a las especies C. dentata

y C. baillonii, las cuales durante fueron producidas durante la época de relativa sequía (marzo-abril) en los años que se recolectaron, P. armata y S. donnell-smithii que fueron producidas al inicio de la estación de lluvias (mayo-junio), C. tepejilote y R. edulis que fueron producidas durante la época de lluvias (julio-septiembre), y por último D. digyna, la cual fue producida durante la época de nortes (noviembre-febrero). Los resultados obtenidos sugieren que existe una relación entre la época que fueron liberadas las semillas y su tolerancia a la deshidratación en condiciones de laboratorio, ya que las semillas producidas durante la época de sequía mostraron una mayor tolerancia a la deshidratación que las semillas producidas durante la época de lluvias. En otras palabras, las semillas producidas durante la época húmeda presentaron un comportamiento más recalcitrante que las que fueron producidas ya sea durante la sequía o durante la época de nortes. Aunque dada la variación fenológica que existe, sería necesario determinar si este comportamiento se mantiene a pesar de esta variación.

Además de una distribución temporal (estacionalidad), la distribución espacial (geográfica) de las comunidades vegetales tropicales podría determinar y restringir la localización de las especies con semillas más recalcitrantes. Toledo (1982), afirma que las regiones de selva alta perennifolia (en México) se encuentran rodeadas por un complejo mosaico de diversos tipos de vegetación característica de climas más secos. En algunas de estas comunidades, como por ejemplo selva baja caducifolia y subcaducifolia, se localizan algunas especies dominantes y abundantes de la selva alta perennifolia, lo cual indica una tolerancia de estas especies a condiciones más secas. De tal forma, podría pensarse que algunas de las especies más representativas de la selva alta perennifolia probablemente no presenten una conducta recalcitrante como podría pensarse en un principio pues podrían proceder originalmente de comunidades más secas. Además, de acuerdo con Toledo (1982), esta tolerancia a condiciones de sequía de algunas especies puede ser una consecuencia de un pasado más seco

en las áreas actualmente cubiertas por selvas lluviosas y las áreas en las que se distribuyen especies intolerantes a sequía pueden considerarse como refugios primarios y secundarios o zonas relicto, donde probablemente se encuentren más especies con semillas recalcitrantes.

Es importante discutir el papel de los bancos de germoplasma en la conservación de especies silvestres. En México, a pesar de la gran diversidad de especies vasculares no existen programas destinados a preservar la riqueza de especies a través de la conservación de germoplasma, como son los bancos de semillas. La únicas instituciones que en algún momento se han dedicado a la colecta y almacén de semillas, como por ejemplo PRONASE (Productora Nacional de Semillas) e INIF (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales). Desafortunadamente su contribución se restringe al manejo de especies de interés agronómico-forestal, pero no al manejo de especies silvestres. En el Jardín Botánico de la UNAM se cuenta con arboretos y pinetos que ayudan a preservar algunos ejemplares de especies silvestres, y un pequeño banco de semillas incompletamente equipado para complementar la conservación. Uno de los ejemplos más impactantes del efecto de la carencia de bancos de semillas y las funciones asociadas a ellos (conservación y mejoramiento genético, investigación, reforestación) es el caso de Pinus radiata citado por Vázquez-Yanes y Orozco-Segovia (1989). Este pino es ampliamente utilizado para la reforestación de grandes áreas montañosas del centro de México debido a que la importación de sus semillas es más fácil que establecer programas de recolección de semillas de especies nativas y establecimiento de viveros. Este problema se evitaría fácilmente si en lugar de importar semillas se contara con un banco de semillas destinado a la reforestación y mejoramiento genético de las especies nativas de México. Por estas razones, es importante iniciar o promover la creación de un banco de semillas de especies ortodoxas y continuar con las investigaciones sobre las posibilidades de almacenamiento de especies de corta longevidad.

Finalmente queda por discutir las posibilidades de

almacenamiento de las especies estudiadas. A partir de los resultados obtenidos en este estudio, cuyo principal objetivo fue conocer la respuesta de las semillas ante la deshidratación (deterioro fisiológico, metabólico y citológico) antes de proceder a realizar ensayos de almacenamiento, se deduce que las especies C. dentata, P. armata, C. tepejilote y R. edulis tienen poca esperanza de almacenarse con éxito, debido a que de inicio pierden gran parte de su capacidad de germinación provocado por la deshidratación. Mientras que el resto de las especies, es decir, D. digyna, C. bailloni y S. donnell-smithii, tienen una mayor esperanza de almacenamiento; debido a que su capacidad de germinación no se modificó con la deshidratación en S. donnell-smithii, la reducción en la capacidad de germinación en D. digyna no fue muy severa, y en C. bailloni se produjo un incremento en su capacidad de germinación provocada por la deshidratación. Sin embargo, queda la posibilidad de explorar por otros caminos, por ejemplo, Berjak et al. (1990) han comenzado a explorar la posibilidad de deshidratar semillas de Landolphia kirki (Apocynaceae) por medio de una técnica que denominan "flash drying", la cual consiste en desecar rápidamente a las semillas (hasta 16% en una hora), y a través de esta técnica lograron mantener la viabilidad de las semillas. Sería interesante probar si esta técnica resulta exitosa en semillas del trópico mexicano.

Otra posibilidad de investigación sería profundizar en el estudio del papel de algunos metabolitos compatibles como los utilizados en este trabajo utilizando diferentes concentraciones e incrementando los tiempos de imbibición de las soluciones; intentar aplicar los metabolitos deshidratando ligeramente las semillas antes de colocarlas en solución, en lugar de aplicarlos en las semillas en una condición hidratada, es decir, con la humedad inicial al momento de la dispersión. Esto probablemente facilite e incremente la absorción de los metabolitos, logrando mantener una mayor concentración dentro de las semillas.

Por otra parte, comenzar a realizar ensayos de almacenamiento en semillas tratadas con estos compuestos, y determinar si factores

tales como la temperatura y tiempo de almacenamiento modifican las respuestas encontradas en estas especies.

CONCLUSIONES

No hay fórmulas para determinar a priori si una semilla es o no recalcitrante, ya que puede presentar características que la sitúen como tal, pero su comportamiento fisiológico indique que no es tan recalcitrante.

Las semillas de cinco de las siete especies estudiadas (D. digyna, C. dentata, P. armata, C. tepejilote y R. edulis) muestran un comportamiento recalcitrante típico, ya que su viabilidad disminuye conforme disminuye su contenido de humedad, mientras que las semillas de C. baillonii y S. donnell-smithii no se ajustan totalmente a la definición de semillas recalcitrantes.

No existe una relación clara entre el contenido de humedad con el que son liberadas las semillas y el "grado" en la conducta recalcitrante en las especies estudiadas.

No existe una relación entre tamaño de las semillas y el contenido de humedad con el que son liberadas. O sea que el contenido de humedad no está en función del tamaño de las semillas.

Las siete especies estudiadas mostraron un retardo en la germinación provocado por la deshidratación.

La cinética de absorción de agua es muy importante en la respuesta fisiológica de las semillas cuando cambia su nivel de hidratación, ya que provoca variaciones en la velocidad y duración de las fases de hidratación.

La deshidratación provoca una disminución en la tasa de respiración antes de la imbibición de las semillas, pero después de la imbibición se reactiva el metabolismo respiratorio, lo cual indica que hasta cierto punto no se produce deterioro metabólico por deshidratación.

La hipótesis de que la capacidad de germinación está relacionada con la pérdida de integridad de membranas y su consecuente salida de solutos conforme las semillas pierden agua no es consistente en las siete especies estudiadas.

La conductividad no puede considerarse como un índice seguro de daños a nivel de membranas y pérdida de viabilidad conforme se desecan las semillas de estas especies.

La integridad de las membranas en las semillas estudiadas es incompleta cuando son liberadas, sugiriendo que sufren algún grado de secado durante la maduración, aunque quizá en un grado mucho menor que en semillas ortodoxas.

No existe una relación directa entre conductividad y tasa de respiración, indicando que los cambios en la permeabilidad de las membranas no están asociados con cambios a nivel metabólico que puedan detectarse por medio de la tasa respiratoria.

No todos los metabolitos producen la respuesta esperada reduciendo la conductividad y mejorando la respuesta germinativa de las semillas. Sólo en las semillas de C. tepejilote se produce la respuesta esperada.

Las semillas estudiadas pierden casi por completo su capacidad de germinación tanto en el claro como en el sitio abierto. Sugiriendo que estas especies no podrán regenerarse si se elimina la cubierta vegetal (dosel).

Los resultados indican que, cuatro de las especies estudiadas presentarían serias dificultades si se intentara almacenarlas bajo las condiciones convencionales, debido a la reducción de su viabilidad provocada por la deshidratación. Las especies restantes tienen una mayor esperanza, pero sería necesario continuar las investigaciones en este campo antes de proceder a realizar ensayos de almacenamiento.

BIBLIOGRAFIA

- ABDUL-BAKI, A. A. and Anderson, J. D. 1972. Seed deterioration. In: Kozlowski, T. T. (ed.). Seed Biology Volume
- AHMAD, N., WYN JONES, R. G. and Jeschke, W. D. 1987. Effect of exogenous glycinebetaine on Na⁺ transport in barley roots. Jour. of Exp. Bot. 38(191):913-921.
- ANGEVINE, M. W. and CHABOT, B. F. 1979. Seed germination syndromes in higher plants. In: Solbrig, O. T., Jains, S., Johnson, G. B. and Raven, P. H. (eds.) Topics in Plants Population Biology. Columbia University Press. New York.
- ASPINALL, D. 1980. Role of abscisic acid and other hormones in adaptation to water stress. In: Turner, N. C. and Kramer, P. J. (eds.) Adaptation of plants to water and temperature stress. John Wiley & Sons. New York. 482 pp. USA.
- BAKER, H. G. 1972. Seed weight in relation to environmental conditions in California. Ecology 53:(2):997-1010.
- BAZZAZ, F. A. 1984. Dynamycs of wet tropical forest and their species strategies. In: Medina, H. A. y Vázquez-Yanes, C. (eds.) Physiology of Plants of the wet tropics. Dr. W. Junk Publishers. La Haya.
- BERNAL-LUGO, I. 1987. Aspectos bioquímicos de la germinación y el deterioro. En: Curso Almacenamiento, Manejo y Conservación de granos y semillas. Universidad Antonio Narro, del 23-28 Nov.
- BERJAK, P., DINI M. and PAMMENTER, N. W. 1984. Possible mechanism underlying the differing dehydration responses in recalcitrant subcellular changes in propagules of *Avicenia marina*. Seed Science and Technology. 12:365-384.
- BERJAK, P. FARRANT, J. M., MYCOCK, D. J. and Pammenter, N. W. 1990. Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: The enigma of their dessication-sensitivity. Seed Sci & Technol. 18:297-310.
- BEWLEY, J. D. 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. Ann. Rev. Plant Physiol. 30:195-238.
- BEWLEY, J. D. and BLACK, M. 1978. Physiology and Biochemistry

of seeds in relation to germination. I. Development, Germination and Growth. Berlin:Springer-Verlag. 306pp.

-BONNER, F. T. and VOZZO, J. A. 1990. Storing recalcitrant tropical forest tree seeds. Memorias del Seminario-Taller sobre Investigaciones en Semillas Forestales Tropicales. Bogotá, Colombia. Serie Documentación No. 18:139-142.

-CASTRO, A. R. y GUEVARA, S. S. 1983. Viabilidad de semillas en muestras de suelo almacenado de "Los Tuxtlas", Veracruz. En: Gómez-Pompa, A., Vázquez-Yanes, C., Del Amo, S. S. y Butanda, C. A. (eds.). Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México. Cia. Editorial Continental, S.A. de C.V., México. pp. 233-249.

-CHIN, H. F., AZIZ, M., ANG, B. B. and HAMZAH, S. 1981. The effect of moisture and temperature on the ultrastructure and viability of seeds of *Hevea brasiliensis*. Seed Science and Technology . 9:411-422.

-CHIN, H. F., HOR, Y. L. and MOHDASSIM, M. B. 1984. Identification of recalcitrant seeds. Seed Sci, and Technol. 12:429-436.

-CHING, T. M. 1972. Metabolism of germinating seeds. In: Kozlowski, T. T. ed. Seed Biology. Volume II. Germination, Control, Metabolism and Pathology. Academic Press. N. Y. 447pp.

-CHRISTENSEN, C. M. 1978. Moisture and seed decay. In: Kozlowski, T. T. (ed.) Water deficits and plant growth. Academic Press Inc.

-COATES-ESTRADA, R. and ESTRADA, A. 1988. Frugivory and seed dispersal in *Cymbopetalum baillonii* (Annonaceae) at Los Tuxtlas, Mexico. Journal of Tropical Ecology 4:157-172.

-CORBINEAU, F. and COME, D. 1986. Experiments on germination and storage of the seeds of two Dipterocarp: *Shorea roxburghii* and *Hopea odorata*. The Malaysian Forester 49(4):371-381.

-CORBINEAU, F. and COME, D. 1988. Storage of recalcitrant seeds of four tropical species. Seed Sci. & Technol. 16:97-103.

-CUNHA, R. de, CARDOSO, M. A., SANTANA, C.A.F. de E SAMPAIO-PEREIRA, T. 1989. Efeito do dessecação sobre a longevidade de

sementes de Virola surinamensis (Rol.) Warb. En: 2° Simposio Brasileiro sobre tecnologia de sementes forestais. Sesseos técnicas de apresentacao de trabalhos voluntarios. Instituto Forestal Sao Paulo, Brazil.

-CREELMAN, R. A. 1989. Abscisic acid physiology and biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 75:131-136.

-DOOD, M. C., VAN STADEN, J. and SMITH, M. T. 1989. Seed development in Podocarpus henkelii: an ultrastructural and biochemical study. *Annals of Botany* 64:297-310.

-DOOD, M. C., VAN STADEN, J. and SMITH, M. T. 1989. Seed germination in Podocarpus henkelii: an ultrastructural and biochemical study. *Annals of Botany* 64:569-579.

-DAVIES, W. J., MANSFIELD, T. A. and WELLBURN, A. R. 1980. A role for abscisic acid in drought endurance and drought avoidance. In: Skoog, F., ed. Plant growth substance. Sringer-Verlag, Heidelberg, pp 242-253.

-ELLIS, R. H., HONG, T. D. and ROBERTS, E. H. 1990a. An intermediate category of seed storage behavior ? *Jour. of Exp. Bot.* 41(230):1167-1174.

-ELLIS, R. H., HONG, T. D., ROBERTS, E. H. and TAO, K. L. 1990b. Low moisture content limits to relations between seed longevity and moisture. *Annals of Botany* 65:493-504.

-ELLIS, R. H., HONG, T.D. and ROBERTS, E. H.. 1991. Effect of storage and moisture on the germination of papaya seeds. Seed Science Research 1:69-72.

-ELLIS, R. H. and ROBERTS, E. H. 1980a. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Ann. Bot.* 45:13-30.

-ELLIS, R. H. and ROBERTS, E. H. 1980b. The influence of temperature and moisture on seed viability period in barley (Hordeum disticum L.). *Ann. Bot.* 45:31-37.

-ENOCH, S. and GLINKA, Z. 1983. Turgor-dependence membrane permeability in relation to calium level. *Physiol. Plant* 59:203-207.

-EZE, J. M. O., DUMBROFF, E. B. and THOMPSON, J. E. 1983. Effects of temperature and moisture stress on the accumulation of abscisic

acid in bean. *Physiol. Plant.* 58:179-183.

-FARRANT, J. M., BERJAK, P. and PAMMENTER, N. W. 1985. The effect of drying rate on viability retention of recalcitrant propagules of *Avicennia marina*. *S. Afr. J. Bot.* 51(6):432-438.

-FARRANT, J. M., PAMMENTER, N. W. and BERJAK, P. 1986. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* with storage time. *Physiol. Plant* 67:291-298.

-FARRANT, J. M., PAMMENTER, N. W. and BERJAK, P. 1988. Recalcitrance—a current assessment. *Sees Sci.&Technol.* 16:155-166.

-FERRAZ, K. I. D. 1989. Armazenamento e teor de umidade em sementes de Carapa procera D. C. En: 2° Simposio Brasileiro sobre tecnologia de semente florestais. Sesseos técnicas de apresentacao de trabalhos voluntarios. Instituto Forestal, Sao Paulo, Brazil.

-FERRAZ, K. I. D., SILVEIRA, V. N. de e daCOSTA, M. M. 1989. Testes de viabilidade em sementes de Capara procera D. C. (op. cit.).

-FOSTER, S. A. 1986. On the adaptative value of large seeds for tropical moist forest trees: A review and syntesis. The Botanical Review 52(3):260-299.

-FU, J. R., ZHANG, B. Z., WANG, X. P., QIAO, Y. Z. and HUANG, X. L. 1990. Physiological studies on desiccation, wet sotage and cryopreservation of recalcitrant seeds of three fruit species and their excised embryonic axes. *Seed Sci & Technol.* 18:743-754.

-FUKUTARU, Y. and YAMADA, Y. 1984. Sources of proline nitroen in water-stressed soybean (Glicine max). II Fate of ¹⁵N-labelled protein. Physiol Plant. 61:622-628.

-GAFF, D. F. 1980. Protoplasmic tolerance of extreme water stress. In: Turner, N. C. and Kramer, P. J. (eds.) Adaptation of plants to water and temperature stress. John Wiley & Sons. New York. 482 pp. USA.

-GAFF, D. F. and Loveys, B. R. 1984. Abscisic acid content and effects during dehydration of detached leaves of desiccation tolerant plants. *Jour. of Exp. Bot.* 35(158):1350-1358.

-GARRAD, A. 1955 The germination and longevity of seeds in an equatorial climate. *Gardens Bull.* vol. XIV:534-545.

-GARWOOD, N. C. and LIGHTON, J. R. B. 1988. Physiological ecology of seed respiration on some tropical species. *New Phytol* 115:549-558.

-GHOSH, B., ADHIKARY, J. and BANERJEE, N. C. 1981. Changes of some metabolites in rice seeds during ageing. *Seed Sci. & Technol.* 9:469-473.

-GORING, H. and PLESCHER, F. 1986. Proline accumulation induced by weak acids and IAA in coleoptiles of wheat seedlings. *Biologia Plantarum.* 29(6);401-406.

-GRAZIA-GALLI, M. G. and LEVI, M. 1982. Increased drought resistance induced by pretreatment with abscisic acid in germinating embryos of *Haploppapus gracilis*. *Physiol. Plant.* 54:425-430.

-GÓMEZ-POMPA, A. 1971. Posible papel de la vegetación secundaria en la evolución de la flora tropical. *Biotrópica* 3:125-135.

-GÓMEZ-POMPA, A., Vázquez-Yanes, C. y Guevara, S. S. 1972. The tropical rain forest: a nonrenewable resource. *Science* 177:762-765.

-GUEVARA, S. S. y GÓMEZ-POMPA, A. 1983. Determinación del contenido de semillas en muestras de suelo superficial en una selva tropical de Veracruz, México. En: Gómez-Pompa, A., Vázquez-Yanes, C., Del Amo, S. S. y Butanda, A. (eds.). Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México. Cia. Editorial Continental, S.A. de C.V., Mexico, pp. 203-232.

-HAMABATA, A., y MARTINEZ, C. L. 1980. El papel del agua en la germinación de las semillas. En: Saldaña de Delgadillo, Y., Díaz-Zagoya, J. C. y Guzmán-García, J. (eds.) "Mensaje Bioquímico". Trabajos del VII Taller de Actualización Bioquímica. Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Vol. III p. 105-138.

-HARPER, J. L., LOVELL, P. H. and MOORE, K. G. 1970. The shape and size of seeds. Annual Review of Ecology and Systematics 1:327-356.

-HARRINGTON, J. F. 1972. Seed storage and longevity. In: Kozłowski, J. J. (ed.). *Seed biology*. Vol. III. Academic Press, London Inc. 422 pp.

-HIGGINS, T. J. V. 1984. Synthesis and regulation of major

proteins in seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:191-221.

-HINCHA, D. K., HOFNER, R., SCHAMB, K. B., HEBER, U. and SCHMITT, J. M. 1987. Membrane rupture is the common cause of damage to chloroplast membranes in leaves injured by freezing or excessive wilting. *Plant Physiol.* 83:251-253.

-HIRON, P. and WRIGHT, S. T. C. 1973. The role of endogenous abscisic acid in response of plants to stress. *J. Exp. Bot.* 24:769-781.

-IBBARRA, M. G. y SINACA, C. S. 1987. Listados florísticos de México. VII Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz. Universidad Autónoma de México. Instituto de Biología, México.

-IBARRA-CABALLERO, J., VILLANUEVA-VERDUZCO, C., MOLINA-GALAN, J. and SANCHEZ de JIMENEZ, E. 1988. Proline accumulation as a symptom of drought stress in Maize: A tissue differentiation requirement. *Jour. of Exp. Bot.* 39(204):889-897.

-ILAH, I. and DORFFLING, K. 1982. Changes in abscisic acid and proline levels in maize varieties of different drought resistance. *Physiol. Plant.* 55:129-135.

-JANZEN, D. H. 1969. Seed-eaters versus seed size, number, toxicity and dispersal. *Evolution* 23:1-27.

-JANZEN, D. H. 1970. Herbivores and the number of tree species in tropical forest. *Amer. Nat.* 104:501-528.

-KAGEYAMA, P. Y. y MARQUEZ, F. C. M. 1983. Comportamiento de semillas de corta longevidad almacenadas con diferentes contenidos de humedad inicial: Género Yabebuia. En: Reunión sobre problemas en semillas forestales tropicales. Tomo II. SARH. Subsecretaría Forestal. INIF. Publicación Forestal N° 40. septiembre 1983.

-KARDPAL, R. P. and RAO, N. A. 1985. Alterations in the biosynthesis of proteins and nucleic acid in finger millet (Eleusine coracana) seedlings during water stress and the effect of proline on protein biosynthesis. *Plant Science* 40:73-79.

-KERMODE, A. R., OISHI, M. Y. and BEWLEY, J. D. 1989. Regulatory roles for desiccation and abscisic acid in seed development: a comparison of the evidence from whole seeds and isolated embryos. *Dees Moisture, CSSA Special Publication No. 14:23-50. Crop Science*

Society of America.

-KING, M. W. and ROBERTS, E. H. 1980a. Maintenance of recalcitrant seeds in storage. In: Chin, H. F. and Roberts, E. H. (eds.). Recalcitrant Crop Seeds. Tropical Press. Kuala-Lumpur, Malaysia.

-KING, M. W. and ROBERTS, E. H. 1980b. A strategy for future research into the storage of recalcitrant seeds. In: Chin, H. F. and Roberts, E. H. (eds.) Recalcitrant Crop Seeds. Tropical Press. Kuala-Lumpur, Malaysia.

-KING, M. W. and ROBERTS, E. H. 1982. The imbibed storage of cocoa (Theobroma cacao) seeds. Seed Science and Technology. 10:535-540.

-KLEIN, R. R., BURKE, J. J. and WILSON, R. F. 1986. Effect of osmotic stress on ion transport processes and phospholipid composition of wheat (Triticum aestivum L.) mitochondria. Plant Physiol. 82:936-941.

-KOSTER, K. L. and LEOPOLD, A. C. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiol. 88:829-832.

-KOZLOWSKI, T. T. 1972. Seed Biology. Volume I. Importance, development and germination. Academic Press, New York., 416 pp.

-La ROSA, P. Ch., HASEGAWA, P. M., RHODES, D., CLITHERO, J. M., WATAS, A-E. A. and BRESSAN, R. A. 1987. Abscisic acid stimulated osmotic adjustment and its involvement in adaptation of tobacco cells to NaCl. Plant Physiol. 85:174-181.

-LEHNINGER, A. L. 1975. Bioenergética. La base molecular de las transformaciones biológicas en energía. Segunda edición en Español. Fondo Educativo Interamericano, S. A. 242 pp. E.U.A.

-LEHNINGER, A. L. 1978. Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Function. Worth Publishers, INC. Second Edition, 4th printing. New York. 1104 pp. USA.

-Le RUDULIER, D., STROM, A. R., DANDEKAR, A. M., SMITH, L. T. and VALENTINE, R. C. 1984. Molecular Biology of Osmoregulation. Science 224:1064-1068.

-LLOYD, D. G. 1987. Selection of offspring at independence and other size-versus-number strategies. Amer. Nat. 129(6):800-817.

-LONE, M. I., KUEH, J. S. H., WYN JONES, R. G. and BRIGHT, S. W. J. 1987. Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos. *Jour. Of Exp. Bot.* 38(188):479-490.

-LÓPEZ-QUILES, M. y VAZQUEZ-YANES, C. 1983. Estudio sobre germinación de semillas en condiciones naturales controladas. En: Gómez-pompa, A., Vázquez-Yanes, C., Del amo, R. S. y butanda, C. A. (eds.) Investigaciones sobre la Regeneración de Selvas Altas en Veracruz, México. Compañía Editorial Continental. México.

-MacARTHUR, R. H. y WILSON, E. O. 1967. The theory of island biogeography. Princeton University Press.

-MARTÍNEZ-RAMOS, M. 1985. Claros, ciclos vitales de los árboles tropicales y regeneración natural de las selvas altas perennifolias. En: Gómez-Pompa, A. y Del Amo, R. S. (eds.) Investigaciones sobre la Regeneración de Selvas Altas en Veracruz, México. Volumen II. Alhambra Mexicana, México.

-MARTINEZ-RAMOS, M. 1991. Patrones, procesos y mecanismos en la comunidad de plántulas de una selva húmeda Neotropical. Tesis Doctoral. UNAM, México.

-MAYER, A. M. and POLJAKOFF-MAYBER, 1975. The germination of seeds. Second edition. Pergamon Press LTD. London. 192 pp.

-MIZRAHI, Y., SCHERING, S. G., MALISARAD, S. and RICHMOND, A. E. 1974. Aspects of the effect of ABA on the Waterstatus of barley and wheat seedling. Physiol. Plant. 31:44-50.

-MORENO, M. E. 1987a. Hongos en granos y sus derivados. En: Curso Almacenamiento, Manejo y Conservación de granos y semillas. Universidad "Antonio Narro" del 23-28 Nov.

-MORENO, M. E. 1987b. La problemática y la investigación sobre la conservación de granos: El papel de los hongos de almacén en la conservación de granos y semillas. En: Curso Almacenamiento, Manejo y Conservación de granos y semillas. Universidad "Antonio Narro" del 23-28 Nov.

-MORENO-CASASOLA, P. 1983. Viabilidad de semillas de árboles tropicales y templados: Una revisión bibliográfica. En: Gómez-Pompa, A., Vázquez-Yanes, C., Del Amo, S. y Butanda, A. (eds.) Investigaciones sobre la Regeneración de Selvas Altas en Veracruz,

México., México. Compañía Editorial Continental, México.

-MORGAN, J. M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. Ann. Rev. of Plant Physiol. 35:299-319.

-NAUTIYAL, A. R. and PUROHIT, A. N. 1985a. Seed viability in Sal. I. Physiological and biochemical aspects of seed development in Shorea robusta. Seed Science and Technology. 13:59-68.

-NAUTIYAL, A. R. and PUROHIT, A. N. 1985b. Seed viability in Sal. II. Physiological and biochemical aspects of ageing in seeds of Shorea robusta. Seed Science and Technology. 13:69-76.

-NAUTIYAL, A. R. and PUROHIT, A. N. 1985c. Seed viability in Sal. III. Membrane disruption in ageing seeds of Shorea robusta. Seed Science and Technology. 13:77-82.

-NAUTIYAL, A. R., THAPLIYAL, A. P. and PUROHIT, A. N. 1985. Seed viability in Sal. IV. Protein changes accompanying loss of viability in Shorea robusta. Seed Science and Technology. 13:83-86.

-NELLIST, M. E. and HUGHES, M. 1973. Physical and biochemical processes in the drying of seeds. Seed Sci & Technol. 1:613-643.

-NG, F. S. P. 1976. The problems of forest tree seed production with reference to Dipterocarps. Seed Technol. in the Tropics 181-186.*

-NIEMBRO, R. A. 1988. Semillas de Arboles y Arbustos. Ontogenia y estructura. Limusa, 1ª ed. México. 285 pp.

-NIEMBRO, R. A. 1989. Semillas de Plantas Leñosas. Morfología comparada. Limusa, 1ª ed, México, 224 pp.

-OWEN, J. H. 1988. Role of abscisic acid in a Ca⁺⁺ second messenger system. Physiol. Plant 72:637-641.

-OWEN, O. S. y BELTRAN, E. 1977. Conservación de recursos Naturales. Editorial Pax-México, México.

-PALEG, L. G., STEWART, G. R. and BRADBEER, J. W. 1984 Proline and glicine betaine influence in protein solvation. Plant Physiol. 75:974-978.

-PEHAP, A. 1987. Is "Priming" of seeds an activation of enzymes ? Institutionen for Skogsskotsel Arbetsrapporter No. 15:2-43. Sweterland.

- PIANKA, E. R. 1970. On r and k-selection. American Naturalist. 104:592-597.
- PRIESTLEY, D. A. 1986. Seed Aging: Implications for seed storage and persistence in the soil. Comstock Cornell University Press. *
- PROBERT, R. J. and LONGLEY, 1989. Recalcitrant seed storage physiology in three aquatic grasses (Zizania palustris, Spartiana anglica and Porteresia coarctata). Ann. of Bot. :53-63.
- RAISON, J. K., BERRY, J. A., ARMOND, P. A. and PIKE, C. S. 1980. Membranes properties in relation to the adaptations of plants to temperature stress. In: Turner, N. C. and Kramer, P. J. (eds.) Apaptatioos of plants to water and high temperature stress. J. Wiley and Sons. Inc. New York.
- REED, R. H. 1984. Use and abuse of osmo-terminology. Plant Cell and Environment 7:165-170.
- ROBERTS, E. H. 1973a. Loss of viability: Chromosomal and genetical aspects. Seed Sci. & Technol. 1:515-527.
- ROBERTS, E. H. 1973b. Loss of viability: Ultrastructural and physiological aspects. Seed Sci & Technol. 1:529-545.
- ROBERTS, E. H. 1973c. Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology 1:499-514.
- ROBERTS, E. H. 1975. Problems of long-term storage of seed and pollen for genetic resuources conservation. In: Frankel, O. H. (ed.) Crop Genetic Resoureses for Today and Tomorrow. Cambridge University Press p. 269-295.
- ROBERTS, E. H. and ELLIS, R. H. 1989. Water and seed survival. Annals of Bot. 63:39-52.
- ROBERTS, E. H. and KING, M. W. 1980. The characteristics of recalcitrant seeds. In: Ching, H. F. and Roberts, E. H. (eds.) Recalcitrant Crop Seeds. Tropical Press. Kuala-Lumpur, Malaysia.
- ROBERTS, E. H., KING, M. W. and ELLIS, R. H. 1984. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. In: Holden, J. H. W. and Williams, J. T. (eds.) Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation. Allen and UnWin. London pp 38-52.
- SALISBURY, E. J. 1942. The Reproductive Capacity of Plants: Studies in Cuantitative Biology. G. Bell and Sons, London.

- SASAKI, S. 1976. The physiology, storage and germination of timber seeds. Seed Technology in the Tropics. 1:111-115.
- SELINIOTI, E., NIKOLOPOULOS, D. and MANETAS, Y. 1987. Organic cosolutes as stabilisers of phosphoenolpyruvate carboxylase in storage: An interpretation of their action. Aust. J. Plant Physiol. 14:203-210.
- SIMON, E. W. 1984. Early events in germination. In: Murray, R. D. ed. Seed Physiology. Vol 2. Germination and Reserve Mobilization. Academic Press. 295 pp. New York.
- SIMON, E. W. and WIEBE, H. M. 1975. Leakage during imbibition, resistance to damage at low temperature and the water content of peas. New Phytol. 74:407-411.
- STEBBINS, G. L. 1974. Flowering Plants: Evolution above the species level. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 399 pp.
- STEWART, C. R. 1980. The mechanism of abscisic acid-induced proline accumulation in barley leaves. Plant Physiol. 66:230-233.
- STEWART, C. R. and Hanson, A. D. 1980. Proline accumulation as a metabolic response to water stress. In: Turner, N. C. and Kramer, P. J. (eds.) Adaptation of plants to water and high temperature stress. John Wiley & Sons. New York. 482 pp. USA.
- TOLEDO, V. M. 1976. Las estrategias adaptativas de las plantas de selvas tropicales: Una revisión. En: Gómez-Pompa, A., Vázquez-Yanes, c., Del Amo, S. y Butanda, C. A. (eds.) Investigaciones sobre la Regeneración de Selvas Altas en Veracruz, México. Consejo Nacional para la Enseñanza de la Biología, México.
- TOLEDO, V. M. 1982. La diversidad biológica de México. Ciencia y Desarrollo . 81(XIV):17-30.
- TOMPSETT, P. B. 1984. Desiccation studies in relation to the storage of Araucaria seed. Ann. Appl. Biol. 105:581-586.
- TOMPSETT, P. B. 1985. The influence of moisture and storage temperature on the viability of Shorea almon, Shorea robusta and Shorea roxburghii seeds. Can. J. For. Res. 15:1074-1079.
- TOMPSETT, P. B. 1987. Desiccation and storage studies on Dipterocarpus seeds. Ann. Appl. Biol. 110:371-379.

-TRIONE, S. O. and CONY, M. A. 1990. Thermoperiodism and other physiological traits of *Solanum elaeagnifolium* seeds in relation to germination. *Seed Sci. & Technol.* 18:525-539.

-TURNER, N. C. and JONES, M. M. 1980. Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation. In: Turner N. C. and Kramer, P. J. (eds.) Adaptation of plants to water and temperature stress. John Wiley & Sons. New York. 482 pp. USA.

-VÁZQUEZ-YANES, C. 1983. Estudios sobre la ecofisiología de la germinación en una zona cálido-húmeda de México. En: Gómez-Pompa. A., Vázquez-Yanes, C., Del Amo, R. S. y Butanda, C. A. (eds.) Investigaciones sobre la Regeneración de Selvas Altas en Veracruz, México. Compañía Editorial Continental. México.

- VÁZQUEZ-YANES, C. y GUEVARA, S. S. 1985. Caracterización de los grupos ecológicos de árboles de la selva húmeda. En: Gómez-Pompa, A. y Del Amo, R. S. (eds.) Investigaciones sobre la Regeneración de Selvas Altas en Veracruz, México. Volumen II. Alhambra Mexicana, México.

-VÁZQUEZ-YANES, C. 1987. Los bancos de almacenamiento de semillas en la conservación de especies vegetales. *Ciencia* 38:239-246.

-VÁZQUEZ-YANES, C. y OROZCO-SEGOVIA, A. 1984. Ecophysiology of seed germination in the tropical humid forest of the world: A review. In: Medina. E., Mooney H. A. y Vázquez-Yanes, C. (eds.) Physiological Ecology of Plants of the wet Tropics. Task for vegetation Science. 12. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.

-VÁZQUEZ-YANES, C. y OROZCO-SEGOVIA, A. 1987. Fisiología ecológica de semillas en la estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical*. 35(Supl.1):85-96.

-VÁZQUEZ-YANES, C. y TOLEDO, J. R. 1987. El almacenamiento de semillas en la conservación de especies vegetales. Problemas y aplicaciones. Memorias del X Congreso Mexicano de Botánica.

-VILLIERS, T. A. 1975 Genetic Maintenance of seeds in imbibed storage. In: Frankel, O. H. (ed.) Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow. Cambridge University Press. p.297-316.

-WYN JONES, R. G., STOREY, R., LEIGH, R. A., AHMAD, N. and POLLARD, A. 1977. A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. In: Marr^e, E. and Clterri, O. (eds.) Regulation of Cell Membrane Activities in Plants. Elsevier/North-Holland Biochemical Press. Amsterdam. p.121-135.

-YAP, S. K. 1981. Collection, germination and storage of Dipterocarp seeds. *The Malaysian Forester* 44(2) y (3):281-300.