



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

INDICADORES FISIOLÓGICOS DEL DESARROLLO Y DETERIORO DE SEMILLAS DE *Physalis ixocarpa* Brot.

IGNACIO PÉREZ CAMACHO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2008

La presente tesis, titulada: **INDICADORES FISIOLÓGICOS DEL DESARROLLO Y DETERIORO DE SEMILLAS DE *Physalis ixocarpa* Brot.**, realizada por el alumno: **Ignacio Pérez Camacho**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO : _____

DR. OSCAR J. AYALA GARAY

ASESOR: _____

DR. VÍCTOR A. GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: _____

DR. AURELIANO PEÑA LOMELÍ

ASESOR: _____

DR. GABINO GARCIA DE LOS SANTOS

ASESOR: _____

DR. J. ALFREDO CARRILLO SALAZAR

Montecillo, Texcoco, México, Noviembre de 2008

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por ser un guía espiritual y dador de todo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** y al **Colegio de Postgraduados**, por el financiamiento y la aceptación respectivas, que me permitieron realizar los estudios de doctorado.

Al personal académico del Colegio de Postgraduados, especialmente a los de la Especialidad en Producción de Semillas, por permitir que un servidor formara parte de la matrícula de estudiantes y por su amistad.

Mi mas profundo respeto y agradecimiento a los miembros del Consejo Particular: **Dr. Oscar J. Ayala Garay, Dr. Víctor A. González Hernández, Dr. Aureliano Peña Lomeli, Dr. Gabino Garcia De los Santos y Dr. Alfredo Carrillo Salazar**, por su invaluable dirección y asesoría recibida para la planeación, ejecución y culminación de esta investigación; así como a la realización del presente documento.

A la **M.C. Josefina Vazquez Medrano**, de la UNAM-Iztacala quien en todo momento me brindo su apoyo en el laboratorio de fisiotecnia para la realización de una parte de la presente investigación.

DEDICATORIA

A mi padre **Sr. Diego Pérez Alvarez** por su calidad moral, humana, gran sencillez y por su tenacidad para luchar en la vida.

A mi madre Sra. **Pilar Camacho Cruz** por darme el don de la vida, por darme ese gran amor de madre a hijo, por su calidad moral, humana, gran sencillez y por preocuparse siempre por dar lo mejor a sus hijos.

A mis **hermanos** por ser una motivación para mi superación, por su gran sencillez, su excelente calidad humana y por su apoyo incondicional.

A mi esposa **Elia Cruz Crespo** por el apoyo, espiritualidad y por compartir conmigo su experiencia.

A mi hija **Sara Daniela Pérez Cruz** por incentivar me en todo momento. Por darme comprensión, compañía y tantas alegrías.

A mis **compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados**, que me proporcionaron su apoyo desinteresado y sin esperar nada a cambio me han brindado su gran apoyo y su amistad.

A mis **sobrinos, a mis tíos y primos.**

Con especial afecto a mis amigos de ayer, de hoy y de siempre.

Sinceramente Ignacio.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	I
LISTA DE FIGURAS	II
RESUMEN	IV
SUMMARY	V
ÍNTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Antecedentes.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Hipótesis.....	3
4. Revisión de literatura.....	4
5. Literatura citada.....	35
CAPITULO 1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CONTENIDO DE SACAROSA DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA DE <i>Physalis ixocarpa</i> Brot....	41
1.1. Introducción.....	42
1.2. Materiales y métodos.....	44
1.3. Resultados y discusión.....	49
1.4. Conclusiones.....	55
1.5. Literatura citada.....	56
CAPITULO 2. EFECTO DEL DESARROLLO Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS DE TOMATE DE CÁSCARA EN VARIABLES FISIOLÓGICAS	59
2.1. Introducción.....	60

2.2. Materiales y métodos.....	62
2.3. Resultados y discusión.....	65
2.4. Conclusiones.....	71
2.5. Literatura citada.....	72
CAPITULO 3. INDICADORES MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS DEL DETERIORO DE SEMILLAS DE TOMATE DE CÁSCARA.....	74
3.1. Introducción.....	75
3.2. Materiales y métodos.....	76
3.3. Resultados y discusión.....	80
3.4. Conclusiones.....	90
3.5. Literatura citada.....	90
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.....	94
1. Conclusiones.....	94
2. Recomendaciones.....	96
ANEXOS.....	97

LISTA DE CUADROS

	Página
<u>CAPITULO 1</u>	
Cuadro 1. Análisis de correlación entre indicadores de germinación, vigor, contenido de carbohidratos y actividad enzimática..	54
<u>CAPITULO 2</u>	
Cuadro 1. Condiciones de temperatura y humedad relativa de los ambientes de almacenamiento evaluados en semillas de tomate de cáscara.....	63
Cuadro 2. Ambientes de almacenamiento (temperatura y humedad relativa) evaluados en semillas de tomate de cáscara.....	67
Cuadro 3. Efecto del estado de desarrollo (45, 55 y 65 DPP) de la semilla de tomate de cáscara.....	68
Cuadro 4. Efecto de tiempo de almacenamiento (0, 4 y 8 meses) de la semilla de tomate de cáscara.....	69
Cuadro 5. Interacción entre ambientes y tiempo de almacenamiento	70
<u>CAPITULO 3</u>	
Cuadro 1. Tasa anual de reducción y valor estimado al momento de cosecha de las variables de calidad fisiológica de semilla de tomate de cáscara.....	82

LISTA DE FIGURAS

<u>INTRODUCCION</u>	Página
<u>GENERAL</u>	
Figura 1. Rutas de síntesis, transporte y metabolismo de la sacarosa desde las hojas hasta los frutos inmaduros de tomate.....	10
Figura 2. Relación entre el nivel de hidratación en las semillas y las actividades fisiológicas observadas en función del potencial del agua en la semilla.....	25
Figura 3. Desarrollo y deterioro de la semilla.....	34
 <u>CAPITULO 1</u>	
Figura 1. Efecto de la edad del fruto en formación, en las variables físicas y fisiológicas de la semilla de <i>Physalis ixocarpa</i> Brot.	50
Figura 2. Efecto de la edad del fruto en formación en los contenidos de sacarosa, carbohidratos totales y en las actividades de las enzimas sacarosa sintasa e invertasa acida en semillas de <i>Physalis ixocarpa</i> Brot.....	52
 <u>CAPITULO 3</u>	
Figura 1. Efecto de la edad de la semilla en variables de germinación y de vigor del tomate de cáscara.....	81
Figura 2. Peso de 1000 semillas de tomate de cáscara almacenadas durante 1, 2, 3 y 5 años a 18.2 °C y 41.2% de humedad relativa.....	84

Figura 3.	Cinética respiratoria de semillas de tomate de cáscara almacenadas durante 1, 2, 3 y 5 años a 18.2 °C y 41.2% de humedad relativa, al sexto día del inicio de imbibición.....	85
Figura 4.	Cinética de aparición de radículas de semillas de tomate de cáscara almacenadas durante 1, 2, 3 y 5 años a 18.2 °C y 41.2% de humedad relativa de almacén, durante 8 d.....	86
Figura 5.	Conductividad eléctrica y potencial osmótico de la solución de imbibición durante 24 horas de semillas de tomate de cáscara almacenadas durante 1, 2, 3 y 5 años a 18.2 °C y 41.2% de humedad relativa	87
Figura 6.	Cinética de imbibición de semillas de tomate de cáscara almacenadas durante 1, 2, 3 y 5 años en almacén, durante 6 días de imbibición.....	88
Figura 7.	Observaciones al microscopio electrónico de transmisión de cortes de tejidos seminales de semillas de tomate de cáscara almacenadas durante uno y cinco años a 18.2 °C y 41.2% de humedad relativa...	89

INDICADORES FISIOLÓGICOS DEL DESARROLLO Y DETERIORO DE SEMILLAS DE *Physalis ixocarpa* Brot.

Ignacio Pérez Camacho, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2008

México es centro de origen del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.), el cual ocupa el quinto lugar entre las especies hortícolas. A pesar de su importancia, la investigación que existe en esta especie aún es escasa, particularmente la relacionada con la producción y deterioro de semilla. La presente investigación se llevó a cabo en tres fases. En la primera se estudió la actividad de las enzimas sacarosa sintasa e invertasa ácida durante el desarrollo de la semilla y se correlacionó con la evolución de los parámetros de calidad de semillas. En la segunda se almacenaron semillas cosechadas durante el desarrollo del cultivo en condiciones contrastantes de temperatura (5.3 y 23.8 °C) y humedad relativa (HR) (41.2 y 81.4%) durante 0, 4 y 8 meses, estudiando el efecto del deterioro en la calidad fisiológica de las semillas. Finalmente, en el tercer estudio se analizó el efecto del almacenamiento en bodega durante 5 años sobre parámetros fisiológicos. En la primera fase experimental se encontró que durante el desarrollo de la semilla, el contenido de carbohidratos solubles aumentó de 33 a 118 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco, y el contenido de sacarosa en la semilla se incrementó de 13 a 25 $\mu\text{g g}^{-1}$. En el metabolismo de la sacarosa, la invertasa ácida tuvo sus niveles más altos a los 15 días post-polinización (DPP) y luego fue disminuyendo continuamente para llegar a su mínima actividad a los 55 DPP. En cambio, la sacarosa sintasa resultó indetectable en los primeros 15 DPP, para después incrementar y alcanzar su máxima actividad a los 35 DPP, y luego declinar. Estos resultados evidencian que ambas enzimas están presentes y activas en la semilla de tomate de cáscara, que sirven para metabolizar la sacarosa que se usa en el crecimiento y acumulación de reservas. En la segunda fase se observó que después de ocho meses de almacenamiento, sólo se encontró un deterioro significativo a 23.8 °C y 81.4% HR, ya que causó la disminución de: germinación, de 69.8 a 29.3%; viabilidad, de 81 a 46%; velocidad de emergencia de radícula, de 20.39 a 9.88 radículas.día⁻¹; respiración, 16.13 a 6.63 nmol CO₂ g⁻¹ s⁻¹ y conductividad eléctrica de la solución de imbibición, 32 a 97.1 $\mu\text{s cm}^{-1}\text{g}^{-1}$. Finalmente, el tercer estudio mostró que después de 5 años, la viabilidad decreció de 84.5 a 50.8%, la velocidad de emergencia de la radícula de 79 a 34.3 radículas d⁻¹, y la conductividad eléctrica subió de 31 a 80 $\mu\text{s cm}^{-1}$. Además, el peso de mil semillas bajó de 1360 a 1140 mg y el peso de 20 plántulas después de 10 d de sembradas disminuyó de 1306 a 876 mg. Las pérdidas en germinación de la semilla aumentaron linealmente al aumentar el tiempo de almacenamiento, con una tasa de reducción de 8.7% anual. La semilla de tomate de cáscara sólo se puede conservar en esas condiciones por 3 años con 65.8% de germinabilidad, y sólo por un año con 80% germinabilidad.

Palabras clave: tomate verde, tomatillo, semillas, sacarosa sintasa, invertasa ácida.

PHYSIOLOGICAL MARKERS OF DEVELOPMENT AND DETERIORATION OF SEEDS IN *Physalis ixocarpa* Brot.

Ignacio Pérez Camacho, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2008

Mexico is a center of origin of the husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.), it occupies the fifth place among the horticultural species. In spite of his importance, the investigation that exists in this species is still scarce, particularly studies about the production and deterioration of seeds. The investigation was carried out in three phases. In the first one the activity of saccharose sintasa and invertasa acid enzymes was studied during of development of the seed and then correlated by the evolution of the quality parameters of seed. In the second one seeds harvested during of crop development were stored under contrasting conditions of temperature (5.3 and 23.8 °C) and relative moisture (RH) (41.2 and 81.4%) for 0, 4 and 8 months, evaluating the effect of the deterioration in the physiological quality of the seeds. Finally, in the third study the effect of the storage for 5 years on physiological parameters was analyzed. In the first experimental phase it was found that during the development of the seed, the content of soluble carbohydrates increased from 33 to 118 $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight, and the content of sucrose in the seed increased from 13 to 25 $\mu\text{g g}^{-1}$. In the metabolism of the sucrose, the invertase acid had high levels to 15 days after polinization (DPP) and then diminished continuously to come to his minimal activity to 55 DPP. On the other hand, the sucrose synthase turned out to be undetectable in the first 15 DPP, although later on it increased to reach his maximum activity at 35 DPP, and then declined. These results demonstrate that both enzymes, are active in the seed of husk tomato, and serve to metabolize the sucrose that is used in the growth and accumulation of reserves. In the second phase it was found that after eight months of storage, only there was a significant deterioration with 23.8 °C and 81.4% RH, since it caused the decrease of: germination, from 69.8 to 29.3%; viability, from 81 to 46%; emergency speed of radicle, from 20.39 to 9.88 radicles dia^{-1} ; respiration, 16.13 to 6.63 $\text{nmol CO}_2 \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$ and electrical conductivity of the imbibition solution, 32 to 97.1 $\mu\text{s cm}^{-1}\text{g}^{-1}$. Finally, the third study showed that after 5 years, the viability decreased from 84.5 to 50.8%, the emergency speed of the radicle from 79 to 34.3 radicles d^{-1} and the electrical conductivity raised from 31 to 80 $\mu\text{s cm}^{-1}$. Also, the weight of thousand seeds lowered from 1360 to 1140 mg and the weight of 20 seedlings after 10 d of sowed diminished from 1306 to 876 mg. The losses in germination of the seed increased linearly on having increased the time of storage, with a rate of reduction per year of 8.7%. The seed of husk tomato can only be preserved in these conditions for 3 years with 65.8% of germinability and only for one year with 80% germinability.

Key words: husk tomato, tomatillo, seeds, sucrose synthase, invertase acid.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Antecedentes

México es centro de origen de las especies del género *Physalis* donde forma parte de los numerosos platillos de la cocina mexicana desde épocas precolombinas, sobre todo en forma de salsas y ensaladas. La superficie cosechada de tomate de cáscara en el país se ha incrementado desde 1932 y adquirió importancia en la década de los setenta, ya que antes prácticamente sólo se cultivaba en el centro del país. A partir de la década de los ochenta se ha exportado tanto en fresco como industrializado a los Estados Unidos de Norteamérica (Pérez y Granados, 2001), en México, el tomate de cáscara ocupa el quinto lugar entre las especies hortícolas, superada únicamente por chile, jitomate, papa y cebolla. A partir de los noventa su cultivo se ha extendido a 26 de los 32 Estados de la República (Peña y Santiaguillo, 1998). En el año 2003, la superficie sembrada fue de 48,639 ha con un rendimiento medio de 12.362 t ha⁻¹ (Robledo *et al.*, 2004).

A pesar de su importancia, la investigación que existe en esta especie aún es escasa, particularmente la relacionada con el conocimiento de la importancia que tienen algunas características fisiológicas y morfológicas en la determinación del rendimiento de semilla de alta calidad y la vida de dichas semillas.

El desarrollo de la semilla es dependiente de la fijación fotosintética del bióxido de carbono y del transporte de sacarosa, aminoácidos y ácidos orgánicos a la semilla (Bradford y Nonogaki, 2007). En la mayoría de especies vegetales el carbono asimilado por las hojas es transportado como sacarosa, un disacárido formado por glucosa y fructosa unidas por un enlace glicosídico (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Una vez descargada en el órgano demanda, la sacarosa debe ser hidrolizada por las enzimas invertasa y sacarosa sintasa en los dos monosacáridos que la componen (glucosa y fructosa) para que pueda ser utilizada en el proceso de biosíntesis de sustancias de reserva, como almidón que es la forma de reserva de carbono más importante en plantas superiores (Slattery et al., 2000), o de compuestos estructurales como celulosa que se sintetiza en grandes cantidades durante el crecimiento celular de órganos de reserva (Delmer y Amor, 1995).

Una vez que la semilla alcanza su madurez fisiológica logrando una máxima acumulación de reservas, lo que se relaciona directamente con máximos valores de germinación, velocidad de crecimiento de la plántula (vigor) y tolerancia a condiciones adversas, se inicia el proceso de deterioro, el cual depende de las condiciones en que se almacenan las semillas.

Los mecanismos que causan el deterioro de la semilla son múltiples. El almacenamiento en condiciones ambientales desfavorables y el consecuente deterioro de la semilla provocan disminución en su germinabilidad, así como en la subsecuente velocidad de crecimiento de la plántula y en su tolerancia a condiciones adversas. Tal deterioro está asociado con una menor acumulación de carbohidratos en la semilla e insuficiencia de sustratos respiratorios para la germinación. Por ello, un signo temprano de envejecimiento de la semilla es la disminución significativa de su tasa respiratoria (Bernal y Leopold, 1992).

En ese contexto, la presente investigación tuvo los siguientes:

2. Objetivos

- Estudiar la actividad enzimática y el contenido de sacarosa de la semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) y su relación con el desarrollo de las características de calidad física y fisiológica.

- Analizar el efecto de diferentes temperaturas y humedades relativas durante el almacenamiento de semillas de tomate de cáscara cosechadas en diferentes etapas de desarrollo sobre sus características de germinación, vigor, respiración y conductividad eléctrica.

- Cuantificar el efecto del envejecimiento de la semilla de tomate de cáscara almacenada en condiciones naturales sobre sus características de germinación, vigor, disponibilidad de reservas, respiración, integridad y permeabilidad de membranas.

3. Hipotesis

- Las enzimas sacarosa sintasa e invertasa acida, están presentes y activas en la semilla de tomate de cáscara y están correlacionadas con el crecimiento y acumulación de carbohidratos en la semilla.

- Las reducciones de la calidad física y fisiológica en semillas de tomate de cáscara son ocasionadas por la temperatura de almacenamiento de 23 °C y humedades relativas superiores a 80%, debido a alteraciones fisiológicas en respiración y permeabilidad de membranas.

- El deterioro natural de la semilla de tomate de cáscara presenta una correlación directa con los años de almacenamiento y es debido a la disminución de reservas.

4. Revisión de literatura

4.1. Desarrollo de la semilla

La formación de las semillas puede ser dividida en cuatro etapas fundamentales:

1. Histodiferenciación

Una semilla es un órgano reproductivo que se desarrolla a partir de un óvulo, por lo general una vez fecundado. En las angiospermas los óvulos están totalmente encerrados dentro del ovario. El desarrollo de la semilla se inicia con la fecundación, la unión de un núcleo masculino haploide procedente del grano de polen con un núcleo femenino haploide dentro del óvulo para formar un nuevo organismo, que es diploide. La fecundación es precedida por la polinización, que es la llegada de un grano de polen al estigma de la flor femenina en las angiospermas o cerca del micrópilo del óvulo en las gimnospermas. Es importante distinguir estos dos procesos de polinización y fecundación. En la mayoría de las angiospermas el alargamiento del tubo polínico es rápido, y entre la polinización y la fecundación transcurren sólo unos días, o incluso unas horas (Bradford y Nonogaki, 2007).

En el momento de la fecundación el óvulo consta de una o dos cubiertas protectoras (los integumentos) y un tejido central (la nucela). Es frecuente que los integumentos y la nucela estén claramente diferenciados sólo en la región del micrópilo (el minúsculo poro situado en los integumentos) a través del cual, en muchas especies,

entra en la nucela el tubo polínico. El óvulo está unido a la pared del ovario por un filamento, el funículo. La meiosis de una célula madre dentro de la nucela, seguida de varias divisiones celulares mitóticas, lleva a la formación del saco embrionario, una estructura haploide de ocho núcleos y siete células que ocupa el espacio central dentro de la nucela. Cuando el tubo polínico llega al saco embrionario libera dos gametos masculinos. Uno de éstos se une con uno de los núcleos del saco embrionario (la célula huevo) para formar un cigoto que después se convierte en la planta embrionaria diploide. El segundo gameto masculino se une con otros dos núcleos femeninos (los núcleos polares) para formar una célula triploide que después se convierte en el endospermo, tejido que actúa como reserva nutritiva para el embrión en crecimiento. Los otros cinco núcleos del saco embrionario (dos sinérgidas y tres células antipodales) no desempeñan después función alguna en el desarrollo de la semilla. Para que se desarrolle una semilla viable es necesario que se produzca satisfactoriamente tanto la fecundación de la célula huevo como la triple fusión con los núcleos polares (Bradford y Nonogaki, 2007).

En el desarrollo del óvulo fecundado hasta convertirse en la semilla madura intervienen varias partes. Primeramente, los integumentos del óvulo se transforman en la cubierta de la semilla madura. Esta cubierta consiste a veces en dos revestimientos distintos, una cubierta externa, típicamente firme, que es la testa, y otra interna, por lo general delgada y membranosa, que es el tegmen. La testa protege al contenido de la semilla de la desecación, los daños mecánicos o los ataques de hongos, bacterias e insectos, hasta que se abre en la germinación. No obstante, entre las angiospermas la cubierta seminal presenta una gran variación. Posteriormente, en algunos géneros

puede persistir la nucela en forma de una capa delgada (el perispermo) que está situada en la parte interna de la cubierta y que suministra reservas nutritivas al embrión. En la mayoría de las angiospermas, en cambio, desaparece pronto, y su función pasa a desempeñarla el endospermo (Bradford y Nonogaki, 2007).

En resumen, durante esta etapa el cigoto sufre división mitótica y las células hijas se diferencian para formar el cuerpo básico del embrión, compuesto del eje embrionario y de los cotiledones; ocurre la formación del endospermo triploide. Los tejidos embrionarios son metabólicamente muy activos, con altos niveles respiratorios, y con los organelos subcelulares, como mitocondrias y cloroplastos, bien diferenciados (Kobayashi *et al.*, 2003; Matilla, 2000).

2. Acumulación de reservas

El endospermo suele crecer con más rapidez que el embrión durante el período que sigue inmediatamente a la fecundación. Acumula reservas de alimentos y en su máximo desarrollo es rico en carbohidratos, grasas, proteínas y hormonas del crecimiento. En algunas especies el endospermo sigue siendo evidente y continúa ocupando más espacio en la semilla que el embrión, aun en las semillas maduras. En otras especies, el embrión va absorbiendo las reservas nutritivas del endospermo durante sus últimas fases de desarrollo, hasta que el endospermo desaparece cuando la semilla está madura (Bradford y Nonogaki, 2007).

Estas reservas sirven como depósitos que se requerirán cuando el plasmalema se expande durante la imbibición y la germinación (LePrince *et al.*, 1990). El suministro

adecuado de materia prima para formar membranas ayudaría a aliviar algunas tensiones mecánicas (Berjak *et al.*, 1993).

3. Maduración - secado

El embrión ocupa la parte central de la semilla. Su grado de desarrollo cuando la semilla está madura varía considerablemente según la especie. En los embriones de algunas especies se pueden distinguir todas las partes de la planta rudimentaria; la radícula, que en la germinación dará lugar a la raíz primaria; las hojas de la semilla o cotiledones; la plúmula, de la que surgirá el tallo primario, y el hipocótilo, que conecta los cotiledones con la radícula. Cuando el embrión absorbe todas las reservas nutritivas del endospermo, los cotiledones gruesos y carnosos suelen convertirse en los principales órganos de almacenamiento de alimento y ocupar casi toda la cavidad seminal.

En su forma más compleja, la semilla madura puede estar integrada por tejido diploide procedente de la planta madre (la cubierta seminal, incluidos la testa y el tegmen, y el perispermo), tejido triploide en el endospermo y tejido diploide de la nueva combinación genética en la descendencia del embrión. Pero puede faltar tanto el perispermo (casi siempre) como el endospermo (con frecuencia). Los componentes esenciales de todas las semillas son el embrión, el revestimiento protector que es la cubierta seminal y una reserva de sustancias nutritivas que pueden estar almacenadas en los cotiledones, el hipocótilo, el endospermo o el perispermo (Bradford y Nonogaki, 2007).

En ocasiones puede desarrollarse más de un embrión en una sola semilla, poliembrionía que se ha reportado en varios géneros. No obstante, es la excepción.

La maduración generalmente concluye con un bajo contenido de humedad y una reducción gradual en el metabolismo, como consecuencia de la pérdida de agua en los tejidos de la semilla, y el embrión pasa a un estado metabólicamente inactivo (Kigel y Galili, 1995; Matilla, 2000).

4. Germinación

Durante la imbibición de la semilla madura ocurre una reactivación de los sistemas metabólicos existentes, complementados por la síntesis de nuevos componentes que llevan a reanudar a la expansión celular (alargamiento de radícula) y la división celular. El desarrollo de la semilla y la germinación son dos fases fisiológicas distintas del ciclo de vida de la planta, ambos relacionados con el estado de reservas. El desarrollo de la semilla es esencialmente anabólico, caracterizado por la síntesis y acumulación de reservas en los tejidos de almacenamiento. En la germinación, en cambio, las reservas previamente acumuladas son hidrolizadas para sostener el crecimiento inicial de la plántula, mediante la actividad de enzimas catabólicas (Kigel y Galili, 1995; Kobayashi *et al.*, 2003).

4.2. Aspectos bioquímicos de la formación de las semillas

La capa de la semilla, un órgano materno, es el sitio de conexión no vascular entre el floema y el embrión. Los asimilados, por ejemplo sacarosa y aminoácidos emigran por esta vía hacia el embrión. Un factor importante en el desarrollo de la

semilla, es la distribución, almacenamiento y utilización de los carbohidratos, puesto que son una fuente importante de energía para el crecimiento de la célula. La sacarosa es el carbohidrato principal en el desarrollo de la semilla en las plantas. La sacarosa es un azúcar de transporte universal y su metabolismo al igual que la alta actividad de las enzimas que la metabolizan, juegan un papel importante en el desarrollo de la semilla (Islam, 2001; Gallardo *et al.*, 2003).

4.2.1. Metabolismo de la sacarosa en la semilla

La sacarosa es un disacárido que se obtiene después de la reducción del dióxido de carbono en presencia de luz y agua, siendo transportado a los tejidos no fotosintéticos (tejidos de reserva), como la semilla. La sacarosa está formada por glucosa y fructosa con un enlace ($\alpha 1 \rightarrow \beta 2$). Dependiendo de la actividad fisiológica y de las necesidades bioquímicas de los tejidos heterotróficos, la sacarosa es canalizada mediante distintas vías en los diferentes compartimentos subcelulares (Figura 1). Puede entrar en la glucólisis y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos para la producción de ATP y NADH, también puede ser usada para la biosíntesis de metabolitos primarios importantes para el crecimiento y desarrollo de tejidos. Por otro lado, la sacarosa puede convertirse en polímeros tales como almidón, tricilgliceridos o polipéptidos de almacenamiento de larga duración, o bien en componentes secundarios útiles para la defensa ante predadores, infecciones u otros desafíos ambientales. Muchos de estos procesos pueden tener lugar en la misma célula y al mismo tiempo; por lo tanto, la distribución de la sacarosa para esos diferentes procesos requiere unos mecanismos de control eficientes y precisos (Ho, 1996; Sturm, 1999).

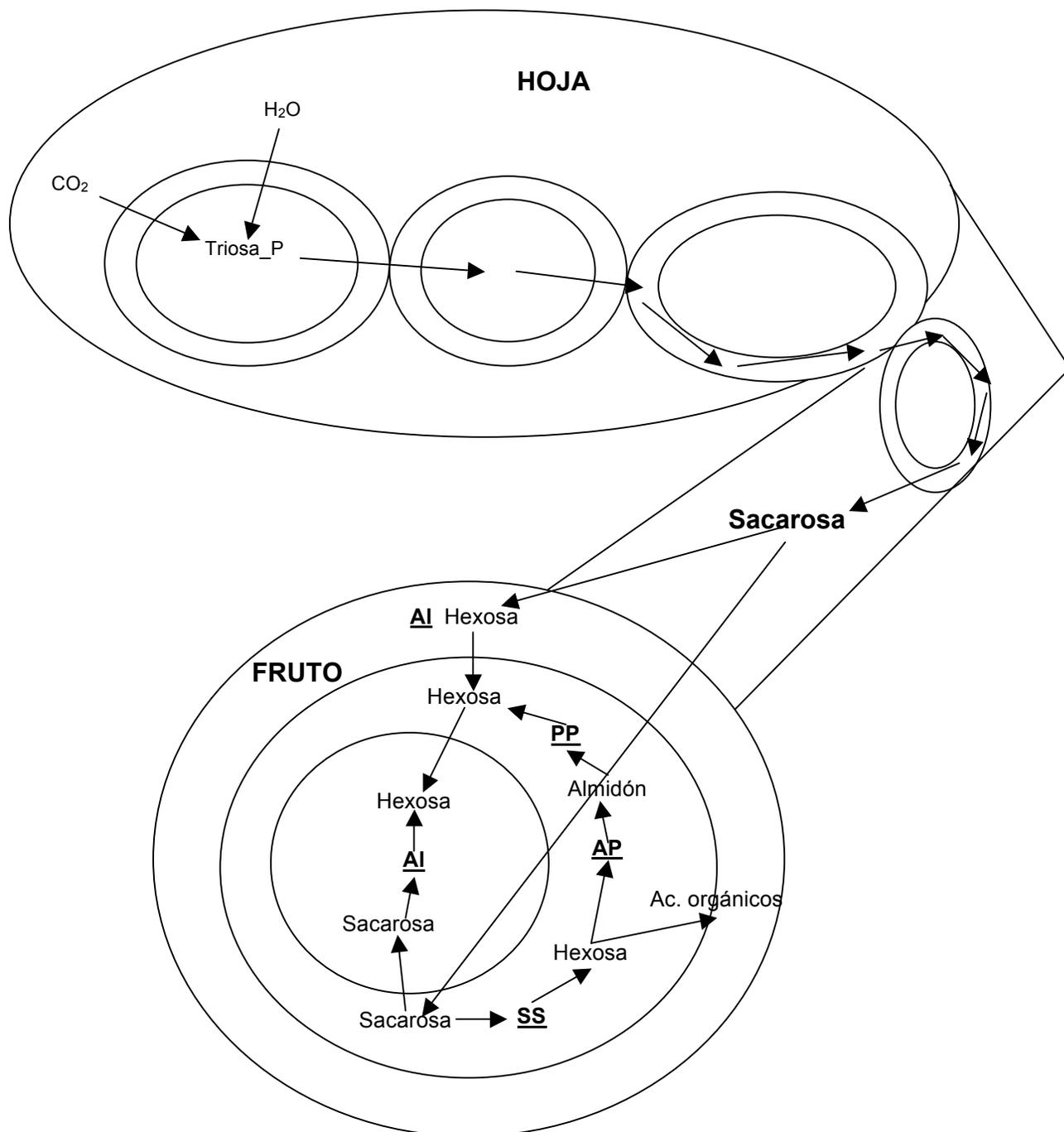


Figura 1. Rutas de síntesis, transporte y metabolismo de la sacarosa desde las hojas hasta los frutos inmaduros de tomate. La sacarosa, tras ser sintetizada en el citosol de las células del mesófilo, a partir de las triosas fosfatos sintetizadas en los cloroplastos, es transportada, vía simplasto, a las células acompañantes del floema, hasta donde llegará vía apoplasto. Una vez recorrido el floema llega hasta los órganos de demanda, donde será almacenada en las vacuolas o hidrolizada para obtener glucosa y fructosa, que una vez activadas, serán la base para el crecimiento y mantenimiento celular. Enzimas metabolizando carbohidratos: AI, invertasa ácida; SS, sacarosa sintasa; AP, ADPG-pyruvato fosforilasa; PP, fosforilasa; SPS, sacarosa fosfato sintasa. (Ho, 1996; Azcon-Bieto y Talon, 2000).

El almacenamiento de sacarosa puede ser a corto plazo o a largo plazo de acuerdo a su duración. El almacenamiento a corto plazo se refiere a la acumulación de sacarosa que ocurre en las vacuolas de las células verdes en los momentos en los que la fotosíntesis es alta y la capacidad de carga del floema está saturada. El almacenamiento a largo plazo se refiere a la sacarosa acumulada en muchos frutos y órganos especializados (semillas, bulbos, raíces, rizomas, internodos, etc.) durante un periodo latente (Echevarría, 1998). En muchos casos el almacenamiento es un proceso temporal y finaliza con la movilización de la sacarosa.

El mantenimiento de un aporte constante de sacarosa a los frutos y semillas es dependiente de la movilización diurna de la sacarosa, almacenada a corto plazo, desde la vacuola de células verdes. La demanda metabólica de la sacarosa almacenada a largo plazo ocurre en procesos vitales como el resurgimiento del metabolismo en tejidos reproductivos, en la germinación de semillas, en el mantenimiento de la viabilidad de la célula y durante la escasez de fotoasimilados (Echevarría, 1998).

Las células contienen de forma invariable una cantidad significativa de sacarosa libre. Estas concentraciones de sacarosa pueden ser muy variables dependiendo del tejido de almacenamiento (Keller, 1989).

La utilización de la sacarosa como fuente de carbono y energía depende de su división hasta hexosas (fructosa y glucosa). En plantas esta reacción está catalizada por las enzimas sacarosa sintasa o invertasa (Zhang *et al.*, 2003).

En los órganos de acumulación de sacarosa, tales como la semilla, la productividad está ligada a la cantidad de sacarosa almacenada, que dependerá de la

regulación de las enzimas que catalizan el último paso de biosíntesis de sacarosa o la división de este disacárido (Fieuw y Willenbrink, 1987).

4.2.2. Enzimas implicadas en el metabolismo de la sacarosa

Se han descrito tres reacciones implicadas en la síntesis y degradación de sacarosa en plantas (Cardini *et al.*, 1955).

La primera de estas reacciones es llevada a cabo por la enzima sacarosa sintasa (SS) que realiza una reacción reversible (Cardini *et al.*, 1955).



Así, esta sacarosa sintasa convierte sacarosa, en presencia de Uridina 5-difosfato (UDP), en UDP-Glucosa y fructosa. Aunque la sacarosa sintasa es capaz de sintetizar sacarosa, hay evidencia de que la SS en vivo está principalmente implicada en la degradación de sacarosa (Sturm, 1999).

La SS está asociada a la membrana plasmática o al tonoplasto, además de encontrarse en forma soluble en el citoplasma (Sturm, 1999; Echevarría, 1998).

Otra de las reacciones que se producen en el metabolismo de la sacarosa está determinada por la actividad de la invertasa. La invertasa es una hidrolasa que lleva a cabo la reacción irreversible de degradación de la sacarosa en dos monosacáridos:



Las invertasas se dividen en dos grandes grupos: invertasa ácida e invertasa neutra (Sturm, 1996).

La acción combinada de la sacarosa sintasa e invertasa intervienen en las concentraciones de sacarosa que encontramos en las células de almacenamiento de la semilla.

La actividad relativa y las funciones de cada una de estas enzimas son complejas, cambiando con las diferentes fases de desarrollo de la semilla.

4.2.2.1. Sacarosa sintasa (SS)

La sacarosa sintasa tiene un papel mas activo en la división que en la síntesis de sacarosa (Hawker, 1985).

En los órganos de reserva de carbohidratos la actividad de la SS es muy alta y a menudo es la actividad degradativa predominante, de forma que provee de substratos para la respiración, síntesis de almidón y síntesis de pared celular (Giaquinta, 1979).

La SS juega un papel importante en el transporte de sacarosa almacenada en la vacuola de betabel y otras especies acumuladoras de azúcar. Esta sacarosa es transportada a través del tonoplasto hacia el citosol mediante un transportador de sacarosa dependiente de ATP. La SS está asociada a este transportador, en la cara citoplasmática del tonoplasto, y rompe la sacarosa una vez que ha salido de la vacuola (Echevarría, 1998). Aproximadamente el 8-10% del total de SS existente en la célula está asociada al tonoplasto. Para el transporte extracelular, la sacarosa es transportada por un sistema mediado por vesículas del tonoplasto que protegen a la sacarosa de ataques de enzimas citológicas y previenen la expresión no deseada de genes mediados por sacarosa (Echevarría, 1998).

También se ha descrito la SS asociada a la cara citoplasmática de la membrana plasmática que permitiría la transferencia de glucosa (vía UDP-Glucosa), procedente de la ruptura de la sacarosa, a una cadena de celulosa en crecimiento (Kohorn, 2000). Así, la SS es una enzima que puede ser encontrada tanto soluble en el citosol, como asociada a membrana (plasmática o tonoplasto).

4.2.2.2. Invertasa ácida (IA)

La función más usual de las invertasas es proveer a la célula de recursos para la respiración, y de carbono y energía para la síntesis de numerosos compuestos diferentes. Las invertasas pueden también estar implicadas en el transporte de sacarosa a larga distancia generando el gradiente de concentración de sacarosa necesaria entre las zonas de carga y descarga del floema (Klotz y Finger, 2002).

En órganos de almacenamiento de sacarosa (semillas, tubérculos o raíces) se cuestiona si son las invertasas o la SS las mayoritariamente implicadas en el metabolismo de degradación de la sacarosa.

En las semillas en desarrollo de trigo (Riffkin *et al.*, 1995) y tubérculos de papa (Sung *et al.*, 1989), la SS es la actividad predominante y la hidrólisis de sacarosa vía invertasa es baja. Weber *et al.* (1997) dedujeron lo opuesto en sus estudios en haba durante el desarrollo de la semilla, encontrando una buena correlación entre los niveles de hexosas en los cotiledones y los niveles de actividad invertasa de pared celular en la cubierta de la semilla.

En semillas de zanahoria (Silva y Ricardo, 1992) y maíz (Weber *et al.*, 1997) las invertasas desarrollan un papel importante en el aporte de carbohidratos al endospermo, especialmente en las etapas tempranas de diferenciación celular.

Por el contrario, los tejidos de semilla dedicados activamente al almacenamiento tienen a menudo unos niveles de actividad de IA considerablemente bajos, y altos niveles de actividad SS (Quick y Schaffer, 1996).

La invertasa ácida soluble (IA) se considera más relacionada con la expansión celular y facilita el crecimiento de la semilla. La ruptura de la sacarosa en la vacuola provoca un aumento de los niveles de glucosa y fructosa en las raíces en crecimiento. Esto disminuye el potencial hídrico de la vacuola, permitiendo la entrada de agua y la expansión celular (Gibeaut *et al.*, 1990). Existe relación entre la actividad IA y la proporción en la elongación de la célula (Pfeiffer y Kutschera, 1995).

En este sentido, se encontraron altas actividades IA, en tejidos en crecimiento en tomate (Nguyen-Quoc y Foyer, 2001).

En general, se propone que la actividad IA sólo está presente en las etapas tempranas del desarrollo, declinando rápidamente, hasta hacerse prácticamente indetectable.

4.3. Almacenamiento de la semilla

Se puede definir al almacenamiento como la conservación de semillas viables desde el momento de la recolección hasta que se necesitan para la siembra (Copeland y McDonald, 2001). Cuando las semillas se pueden sembrar inmediatamente después de la recolección, no se precisa almacenamiento. La fecha idónea para sembrar las

semillas de una determinada especie depende de la fecha prevista de la siembra. Lo más habitual es que sea necesario almacenar la semilla durante períodos de tiempo diversos, períodos que cabe clasificar de la manera siguiente (Walters *et al.*, 2005):

Hasta un año, cuando la producción de semilla se efectúa con periodicidad anual, pero es necesario esperar la temporada idónea para la siembra. De 1 a 5 años o más, cuando una especie fructifica en abundancia a intervalos de varios años y debe recolectarse en un año buena semilla suficiente para satisfacer las necesidades anuales en los años intermedios, en los que la producción de semilla es escasa. De largo plazo, con fines de conservación de recursos genéticos. El período de almacenamiento varía en función de la longevidad de la semilla, de la especie de que se trate y las condiciones del almacenamiento; no obstante, en especies que se almacenan en ambientes óptimos, el tiempo de almacenamiento se suele medir en decenios.

Los medios que se precisan están relacionados con la cantidad de semilla que se va a almacenar y con la duración del almacenamiento. Crear unas instalaciones costosas, capaces de mantener la viabilidad de las semillas durante 10 años, cuando éstas no se van a almacenar por más de nueve meses es tirar el dinero. Es asimismo un gasto innecesario recolectar, extraer y limpiar la semilla cuando las condiciones de almacenamiento son tan insuficientes que el 90% de ella muere antes de llegar al campo (Copeland y McDonald, 2001).

El período durante el cual la semilla puede seguir siendo viable sin germinar depende mucho de su calidad en el momento de la recolección, el tratamiento al que se

la somete entre la recolección y el almacenamiento y las condiciones en que se almacena. No obstante, la longevidad de la semilla varía también muy considerablemente entre unas especies y otras, aun cuando reciban un tratamiento idéntico y se las almacene en las mismas condiciones.

En la actualidad se distinguen dos tipos principales de semillas (Roberts, 1973):

1. **Ortodoxas**. Semillas que pueden secarse hasta un contenido de humedad (CH) bajo, de alrededor del 5% (peso en húmedo), y almacenarse perfectamente a temperaturas bajas o inferiores a 0 °C durante largos períodos.
2. **Recalcitrantes**. Semillas que no pueden sobrevivir si se las seca más allá de un contenido de humedad relativamente alto (con frecuencia en el intervalo de 20 y 50%, peso en húmedo) y que no toleran el almacenamiento durante largos períodos.

Dentro de estos dos tipos pueden establecerse varias subdivisiones, como por ejemplo entre semillas ortodoxas con o sin cubierta y entre semillas recalcitrantes que soportan o no temperaturas bajas, inferiores a 10 °C. Dentro de cada una de las clases principales siguen existiendo diferencias considerables entre las especies en cuanto al período durante el que se mantiene la viabilidad en unas condiciones dadas. Cabe establecer asimismo una distinción entre las especies auténticamente recalcitrantes y las que son simplemente difíciles; estas últimas pueden llegar a comportarse como las ortodoxas cuando por ejemplo se eligen con especial atención los métodos que se aplican para secarlas (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

4.3.1. Factores que afectan la duración de la vida de la semilla

Estado de desarrollo de la semilla. Las semillas plenamente maduras conservan su viabilidad durante más tiempo que las semillas que se recolectan inmaduras. Es posible que determinados compuestos bioquímicos que son esenciales para conservar la viabilidad no se formen antes de las fases finales del proceso de maduración de la semilla. Entre ellos figuran algunos compuestos que inducen la latencia, y ésta parece estar asociada con la longevidad de la semilla (Desai *et al.*, 1997; Copeland y Mcdonald, 2001).

Ausencia de daño mecánico. Las semillas que resultan dañadas mecánicamente durante la extracción, limpieza, separación, etc. pierden enseguida su viabilidad. El peligro es máximo en las especies que tienen la cubierta seminal delgada o blanda. El calor excesivo durante la extracción o el secado daña también la semilla. Hay que procurar que durante la preparación de la semilla para el almacenamiento se empleen los tiempos mínimos, las temperaturas más bajas y las velocidades de máquina mínimas que sean necesarias (Desai *et al.*, 1997; Copeland y Mcdonald, 2001).

Ausencia de deterioro fisiológico. La manipulación deficiente, durante el tránsito o durante el procesamiento deteriora fisiológicamente las semillas aun cuando no existan daños mecánicos o por hongos. Las semillas ortodoxas deben disponer de ventilación suficiente para evitar la respiración rápida y el recalentamiento, mientras que a las semillas recalcitrantes hay que protegerlas de un secado excesivo (Desai *et al.*, 1997; Copeland y Mcdonald, 2001).

Ausencia de hongos e insectos. En el caso de las especies que se almacenan a temperaturas bajas y con un contenido de humedad bajo, las propias condiciones de almacenamiento deben evitar la aparición de hongos e insectos. No obstante, es necesario evitar cosechas que presenten una alta incidencia de ataques de hongos o insectos y efectuar todas las operaciones de recolección, transporte, procesamiento, etc. con la mayor rapidez posible a fin de asegurar que la semilla no resulte dañada antes de iniciar el almacenamiento. El ataque de hongos e insectos se produce con muchísima rapidez en el suelo (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

Viabilidad inicial. Los lotes de semilla que tienen inicialmente una viabilidad y una capacidad de germinación altas presentan en el almacenamiento una longevidad mayor que los que tienen una viabilidad inicial baja. Antes del almacenamiento, y sobre una muestra de cada lote de semilla, deben efectuarse ensayos de germinación, precedidos en caso necesario por un tratamiento previo apropiado para romper la latencia, a fin de determinar el tiempo probable durante el que la semilla conservará su viabilidad una vez almacenada (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

4.3.2. Condiciones de almacenamiento y envejecimiento

La calidad fisiológica de la semilla se refiere, a la característica de viabilidad de una semilla, a la alta capacidad de germinación y vigor para establecer nuevos individuos y es trascendente para los agricultores y la industria semillera. La semilla es un organismo vivo y como tal, está sujeta a procesos degenerativos graduales que culminan con su muerte. Los cambios fisiológicos que suceden en las semillas envejecidas son consecuencia de cambios bioquímicos que tienen lugar en ellas. En un

proceso continuo de envejecimiento, esos cambios son graduales y su magnitud depende del tiempo de almacenamiento y de las condiciones a las que esté sujeta la semilla, mientras que la senescencia representa una serie de procesos fisiológicos degenerativos, genéticamente controlados, que conducen irreversiblemente a la muerte (Ponce *et al.*, 1992)

Algunos cambios fisiológicos que se producen en los tejidos celulares pueden estar asociados con el envejecimiento fisiológico de las semillas. Estos inducen (1) la pérdida de reservas nutritivas debida a la respiración, por ejemplo una disminución de las proteínas y los azúcares no reductores, acompañada de un incremento de los azúcares reductores y los ácidos grasos libres; (2) una acumulación de subproductos de la respiración que son tóxicos o inhibidores del crecimiento; (3) la pérdida de actividad de los sistemas enzimáticos; (4) la pérdida de capacidad, en las moléculas proteínicas desecadas, para recombinarse y formar moléculas protoplásmicas activas en una rehidratación ulterior; (5) el deterioro de las membranas celulares semipermeables; (6) la peroxidación de los lípidos, lo que hace que se produzcan radicales libres que reaccionan con otros componentes de la célula y los dañan, y (7) alteraciones en el ADN del núcleo celular, que producen mutaciones genéticas y daño fisiológico (Roberts, 1973). No está claro todavía hasta qué punto esos diversos efectos son las causas del deterioro o simplemente sus síntomas, pero se ha sugerido que la producción de radicales libres es el primer efecto del envejecimiento y que el daño que sufren los diversos sistemas de la célula es el resultado de la liberación de esos radicales libres (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

Cualquiera que sea el mecanismo exacto del deterioro de las semillas, se coincide en que, en lo que se refiere a las semillas ortodoxas, la pérdida de viabilidad es un fenómeno que está regido en gran parte por la tasa de respiración. Es probable que todas las medidas que reduzcan la tasa de respiración, sin producir por otra parte daños a la semilla, consigan prolongar la vida de la semilla almacenada. Esas medidas son el control de oxígeno, el control del contenido de humedad y el control de la temperatura. En las semillas recalcitrantes, los niveles mínimos seguros de oxígeno, contenido de humedad y temperatura, y por consiguiente de respiración, son todos considerablemente más altos que los aplicables a las semillas ortodoxas, pero siempre que esos niveles se mantengan por encima del mínimo seguro en cada especie, parece que puede prolongarse la longevidad manteniendo las semillas lo más cerca posible de esos mínimos a fin de evitar una tasa de respiración excesivamente elevada (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

La atmósfera de almacenamiento

La forma más evidente de reducir la tasa de respiración aeróbica consiste en excluir el oxígeno de la atmósfera que rodea a las semillas. Esto puede efectuarse sustituyendo el oxígeno por otros gases, como CO₂ o nitrógeno, o mediante un vacío parcial o completo. En un experimento con semillas de lechuga que cita Roberts (1972), se guardaron las semillas en recipientes herméticos a 18 °C y un CH del 6%. Transcurridos tres años, las semillas almacenadas en una atmósfera de oxígeno puro tenían una viabilidad del 8%, las almacenadas en el aire normal una viabilidad del 57%, las almacenadas en nitrógeno, argón o CO₂ del 78% y las almacenadas en vacío del 77%. Los mejores resultados se obtuvieron con una atmósfera de almacenamiento de

nitrógeno, seguida por el CO₂, mientras que con el almacenamiento al vacío y en el aire se obtuvieron resultados menos satisfactorios. A la más alta de las temperaturas que se utilizaron, 35 °C, en la que el deterioro de la viabilidad fue más rápido, la germinación final, tras 50 semanas de almacenamiento en recipientes herméticos con un CH del 8 por ciento, había perdido un 8% en nitrógeno, 14% en CO₂, 21% en el vacío y 29% en el aire. El mismo orden se obtuvo al comparar la velocidad de germinación y el vigor de las plántulas germinadas (medido como peso en seco 49 días después de la siembra). Aunque experimentalmente se ha conseguido prolongar la vida de la semilla en estas magnitudes, algunos de estos métodos son de costosa aplicación, y además sus efectos sobre la vida de la semilla no son tan notables como los que tienen las diferencias de temperatura y humedad. La exclusión del oxígeno evita la respiración aeróbica, pero no la anaeróbica, mientras que reduciendo el CH y la temperatura se consigue rebajar el nivel de ambas. Se han efectuado predicciones sistemáticas de la duración de la vida de las semillas de diversas especies agrícolas en una gama de temperaturas y CH (Ellis y Roberts 1981), pero no se dispone de predicciones cuantitativas análogas del efecto de los niveles de oxígeno sobre la longevidad (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

El contenido de humedad de la semilla

Las relaciones entre el contenido de humedad de la semilla sobre la base del peso en húmedo o en fresco y el CH sobre la base del peso en seco, y entre el CH en equilibrio de la semilla y la humedad relativa de la atmósfera circundante son factores importantes en el procesamiento. No lo son menos en lo que se refiere al almacenamiento. En el primer caso, la manipulación de la humedad relativa (HR)

puede modificar eficazmente el CH de las semillas hasta que alcanzan el valor óptimo para el almacenamiento, y en el segundo caso el CH puede mantenerse en ese valor óptimo o cerca de él manteniendo una HR adecuada en la atmósfera en que están inmersas las semillas.

En las semillas ortodoxas, el contenido de humedad es probablemente el más importante de los factores que determinan la longevidad de la semilla. Reduciendo el CH se reduce la respiración, y con ello se desacelera el envejecimiento de la semilla y se prolonga su viabilidad (Desai et al., 1997; Copeland y McDonald, 2001).

Para prevenir la actividad de los hongos es más eficaz controlar el CH que controlar la temperatura. Con unos niveles suficientemente altos de CH y HR, puede darse actividad de hongos entre $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $+80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Roberts, 1972), y es más fácil mantener el CH por debajo del 12–14% (o la HR en un equilibrio de alrededor del 65%) que mantener la temperatura por debajo de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Desai et al., 1997; Copeland y McDonald, 2001).

Se ha sostenido que las semillas embebidas pueden reparar, de una manera que no pueden hacerlo las semillas que tienen un CH más bajo, los daños causados por los radicales libres en las membranas celulares, enzimas y ADN del núcleo celular. Pero el almacenamiento prolongado de semillas embebidas puede ser difícil en la práctica, pues es preciso mantener alta y constante la humedad, para la imbibición, y también una cantidad de oxígeno suficiente, y evitar al mismo tiempo que las semillas germinen y que se promueva la multiplicación de hongos y bacterias (Roberts, 1981).

El contenido de humedad es también importante en las semillas recalcitrantes, pero en este caso el CH crítico no es el máximo que exige un almacenamiento prolongado, sino el mínimo necesario para secar las semillas. El almacenamiento debe efectuarse a valores muy próximos al CH mínimo seguro, pues cuanto más alto sea el CH, tanto más aumentará la tasa de respiración y tanto más se acelerará la pérdida de viabilidad. Y entre más alta es la tasa de respiración, mayor es la cantidad de energía que se libera, con riesgo de recalentamiento y muerte de la semilla a menos que se ponga especial cuidado en mantener una ventilación suficiente (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

Según Walters *et al.*, (2005), los diversos niveles de hidratación en las semillas corresponden a distintas características y diferentes procesos químicos y metabólicos (Figura 2). Semillas completamente hidratadas ($\Psi \geq -1$ MPa; hidratación nivel V) pueden crecer. Respuestas a la tensión pueden ser perceptibles en niveles más bajos de hidratación, inicialmente como la expresión de reparación de stress relacionada con proteínas y ácidos nucleicos; en hidratación nivel IV, desenfrenada radicales libres y pérdida de integridad de la membrana; Nivel III de la hidratación. En los potenciales del agua debajo de 215 MPa, las células han entrado oficialmente al estado seco (nivel II de hidratación), y la mayoría (si no todos) de las reacciones contribuyen a la muerte de la semilla en un cierto plazo. El rango de envejecimiento de la semilla depende de su contenido de agua. Primero aumenta la longevidad con la deshidratación (Nivel II de la hidratación) y, en un cierto punto crítico, disminuye con la sequedad adicional (hidratación I).

Niveles de hidratación						
I	II	III	IV	V		
Fotorreceptores	Actividad catabólica vía enzimas	Respiración		Turgencia		
Producción de radicales libres vía auto-oxidación	Respiración anaeróbica	Metabolismo irregular	Reparación de ácidos nucleicos	División celular		
Emite carbonilos		Producción de radicales libres vía metabolismo	Proteínas protectoras	Crecimiento de proteínas		
Desestabilización de la estructura de la membrana y proteínas	Emite alcoholes		Enzimas antioxidantes	GERMINACIÓN		
ENVEJECIMIENTO	ENVEJECIMIENTO	ENVEJECIMIENTO ACELERADO		Perdida de tolerancia a la deseccación		
Incrementa el envejecimiento de la semilla	Reacciones de Maillard	“apresion” de la membrana	Inducción de la tolerancia a la deseccación			
Tecnología ultra- secado	Degradación enzimática					
DAÑO IMBIBICIONAL	DAÑO IMBIBICIONAL	DAÑO A LA DESECACIÓN	DAÑO A LA DESECACIÓN			
	Muerte de semillas intermedias	Semillas recalcitrantes mueren	Embriones inmaduros y muerte de plántulas			
Mpa -1000	-100	-10		-1	-0.1	
% 1 10	50	90		99	99.9	99.99
Escala de humedad relativa						

Figura 2. Relación entre el nivel de hidratación en las semillas y las actividades fisiológicas observadas en función del potencial del agua en la semilla (Walters *et al.*, 2005).

En el punto crítico ($\Psi \approx -200$ MPa, HR $\leq 22\%$), un cambio en la composición volátil emitida por las semillas indica un switch en la forma de reacciones de degradación. El nivel de humedad que distingue los dos niveles de hidratación es importante porque define la longevidad máxima de un organismo en esa temperatura (Walters *et al.*, 2005).

Temperatura de almacenamiento

Al igual que el contenido de humedad, la temperatura presenta una correlación negativa con la longevidad de la semilla; cuanto más baja es la temperatura, tanto menor es la tasa de respiración, y por ello tanto más prolongada la vida de la semilla almacenada. Harrington (1970) sugirió otra norma práctica para las semillas agrícolas: entre 50 °C y 0 °C, cada 5 °C de descenso de la temperatura de almacenamiento supone duplicar la vida de la semilla. En el caso de las semillas ortodoxas, cuyo contenido de humedad puede reducirse hasta unos niveles bajos, se consigue una longevidad aún mayor mediante el almacenamiento a temperaturas inferiores a 0 °C.

La elección de la temperatura de almacenamiento varía considerablemente según la especie de que se trate y el período de tiempo durante el que se va a almacenar la semilla. Cuanto más baja sea la temperatura que hay que mantener en una cámara fría, tanto más alto será su costo, y posiblemente no sean necesarias temperaturas inferiores a cero grados cuando la semilla se va a tener almacenada solamente durante uno o dos años.

El factor temperatura y el factor humedad están tan interrelacionados que es muy difícil separarlos. Las semillas que tienen un nivel de humedad relativamente alto pueden almacenarse durante períodos notablemente más largos a temperaturas próximas a la de congelación que a temperaturas más altas, aunque éstas (30 °C) son menos perjudiciales cuando el contenido de humedad de la semilla es bajo. En resumen, cabe afirmar que el contenido de humedad crítico se encuentra a un nivel más elevado cuando las temperaturas de almacenamiento son bajas que cuando son

intermedias o altas, es decir, hasta cierto punto una temperatura baja puede compensar un contenido de humedad alto, y viceversa. No obstante, es necesario evitar por completo los riesgos de daño por congelación debido a la formación de hielo en las semillas que tienen un CH alto. Roberts (1981) ha sugerido que un CH del 20% es posiblemente el límite superior crítico para el almacenamiento a 0 °C, del 15% para -20 °C y del 13% para -196 °C. Si se secan las semillas hasta que su CH es del 4–8%, como se suele recomendar en las especies ortodoxas, no debe existir peligro de daño por congelación, ni siquiera a temperaturas bastante inferiores a 0 °C.

En muchas semillas el contenido de humedad en equilibrio a una HR determinada varía con la temperatura. Al igual que ocurre con el contenido de humedad, las fluctuaciones térmicas repetidas producen pérdida de viabilidad. En la medida de lo posible, la temperatura debe mantenerse en un nivel uniforme.

Humedad relativa

El contenido de humedad de la semilla mantiene un equilibrio higroscópico con la humedad relativa del aire del almacén (Harrington, 1970). Esto se puede explicar de forma más simple diciendo que tanto el grano como el aire dan y reciben agua hasta llegar a un equilibrio. El contenido de humedad de la semilla se incrementa al incrementarse la humedad relativa y en consecuencia la longevidad de la semilla disminuye (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

Luz

Se ha reportado que la luz, y en concreto los rayos ultravioleta, es perjudicial para la semilla (Harrington, 1970), pero se han dedicado muy pocos estudios a estos aspectos. La utilización de recipientes metálicos opacos sería por tanto preferible, para las especies que se ven afectadas por la luz, comparados con los recipientes o botellas de vidrio. No obstante, parece que la luz es mucho menos importante que el contenido de humedad o la temperatura (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

4.3.3. Manifestaciones del deterioro

En las semillas, durante el almacenamiento, los orgánulos exhiben algunos cambios para adaptarse al ambiente interno de las células. Algunos cambios bioquímicos y ultraestructurales que ocurren durante el periodo de reposo de la semilla están asociados con el deterioro. Algunos de los daños son reversibles si las semillas son hidratadas, pero daños severos son irreversibles y conducen a la producción de plántulas anormales (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

Cambios genéticos

Existe evidencia de que hay una estrecha correlación entre la pérdida de viabilidad de la semilla durante el almacenamiento y la acumulación de aberraciones cromosómicas (Roberts, 1981).

Copeland y McDonald (2001) demostraron que el deterioro de la semilla está asociado con mutaciones que afectan las funciones celulares de tejidos vitales.

Es importante señalar que el principal problema de los cambios genéticos, ocurre durante el almacenamiento a largo plazo, en donde muchas semillas mueren, provocando que las pocas que sobreviven no tengan la misma composición genética promedio, que el lote original al inicio del almacenamiento, dando origen a la deriva genética; indicando con esto que después de muchos años de almacenamiento se obtiene una población genéticamente diferente a la original (Harrington, 1970).

Alteraciones en las membranas

Una de las implicaciones del deterioro de las semillas es la alteración o pérdida de la integridad de las membranas celulares. Esta idea ha sido apoyada por estudios que han mostrado que la cantidad de solutos liberados por las semillas es inversamente proporcional a la viabilidad de éstas, asociado a la pérdida de integridad del plasma y el tonoplasto de las células. Así, conforme progresa el deterioro, las membranas celulares pierden permeabilidad selectiva, lo que permite que los metabólicos citoplásmicos salgan a los espacios intercelulares. La pérdida de integridad de las membranas es probablemente el primer cambio deteriorativo durante el envejecimiento. Ello se basa en el hecho de que la reducción en la actividad de la peroxidasa y el ascorbato, incrementa el nivel de ácidos grasos libres y malonaldehído, además de la formación de lípidos conjugados; la reducción en el contenido de sustancias de reserva como carbohidratos, proteínas y fosfolípidos puede ser atribuida a la pérdida de integridad de membranas. El mecanismo que puede estar involucrado en el deterioro de la semilla es la reacción de los radicales libres, producidos como resultado de la peroxidación de lípidos, con los lípidos de la membrana, lo cual destruye la estructura celular (Basavarajappa *et al.*, 1991).

Cambios en la respiración

La respiración es una expresión conjunta de la actividad de un grupo de enzimas que reaccionan para degradar las reservas alimenticias, por lo que se considera un proceso de naturaleza catabólica, en donde la semilla absorbe oxígeno del ambiente y produce bióxido de carbono, derivado del rompimiento de carbohidratos (Copeland y McDonald, 2001). Priestley (1986) menciona que los cambios en la respiración durante el almacenamiento ocasionan reducciones en el peso seco, debido a la reducción de las reservas nutritivas, afectando en forma negativa el comportamiento de la semilla durante la germinación, establecimiento en campo y rendimiento. La respiración es de vital importancia durante la germinación. Es de esperarse que si la respiración de la semilla fue alta durante el almacenamiento, durante la germinación no alcance niveles similares a aquellas que experimentaron baja respiración, por lo que la producción de ATP será insuficiente para abastecer los procesos metabólicos.

4.3.4. Almacenamiento de la semilla

Elección del método de almacenamiento

Existen diversos métodos de almacenamiento. Los principales factores que hay que tener en cuenta a la hora de elegir uno de ellos son las características de la semilla de la especie de que se trate, el período durante el que se va a almacenar y el costo. Cuando existe más de un método adecuado para mantener la viabilidad durante el período de que se trate, normalmente se elige el más sencillo y barato (Desai *et al.*, 1997).

Recipientes para el almacenamiento

El almacenamiento de semillas suele exigir algún tipo de recipiente, para facilitar el acceso a los distintos lotes y su manipulación cuando se mantienen separados, aprovechar al máximo el espacio de almacenamiento, proteger la semilla contra los animales y las plagas de insectos y, en algunos casos, impedir el intercambio de humedad y gases entre la atmósfera interior y la exterior. En lo que se refiere a las semillas se han utilizado muchos tipos de recipiente, que conviene dividir en: (1) materiales completamente impermeables y (2) materiales no totalmente impermeables (Desai *et al.*, 1997).

Materiales completamente impermeables

Tras secar las semillas ortodoxas hasta que tienen el CH correcto, éste puede mantenerse en el almacén reduciendo la humedad del espacio de almacenamiento en su conjunto. Otra manera muy eficaz, que se suele utilizar al almacenar semillas, consiste en colocar la semilla en recipientes herméticamente cerrados e impermeables a la humedad. Esto evita la necesidad de contar con un equipo de deshumidificación, que es costoso. Cuando el almacenamiento es de largo plazo el método más eficaz consiste en una combinación de recipientes impermeables a la humedad con unas temperaturas bajas y controladas, que se obtienen mediante un sistema de refrigeración. Otra ventaja de la mayoría de los materiales de este tipo es que impiden también la entrada de oxígeno, de manera que se reduce aún más la tasa de respiración. Los recipientes herméticos e impermeables no están indicados para almacenar semillas recalcitrantes, ni tampoco semillas ortodoxas con un CH alto, que

se deterioran con más rapidez en condiciones herméticas que en abiertas. Algunas semillas absorben la humedad enseguida, por lo que es importante que, una vez terminada la operación de secado, se guarden lo antes posible en el recipiente, preferiblemente sin salir de la propia cámara de secado (Desai *et al.*, 1997).

Entre los recipientes impermeables a la humedad figuran las latas y tambores de estaño o aluminio, los frascos de vidrio de los tipos Mason o Kilner, los viales plásticos y los envases de papel de aluminio laminado. Las latas metálicas, rígidas e irrompibles, ofrecen la máxima protección contra el daño mecánico y están igualmente indicadas para el almacenamiento y el envío ulterior. La medida de la protección contra la humedad la da únicamente el cierre del recipiente. En los recipientes rígidos, y cuando se prevé la necesidad de abrirlos periódicamente para extraer semilla y después volverlos a cerrar, deben utilizarse tapas estancas de rosca o de abrazaderas; el papel de aluminio debe cerrarse mediante calor. La eficacia del sistema de cierre es especialmente importante en el almacenamiento de largo plazo. Para el almacenamiento prolongado y herméticamente cerrado de semillas agrícolas se recomiendan tres tipos de recipiente: frascos o viales de vidrio, latas metálicas y envases de papel metálico laminado (Desai *et al.*, 1997).

Materiales no totalmente impermeables

Se trata del polietileno y otras películas plásticas y el papel de aluminio. Estos materiales son resistentes al paso de la humedad, pero, en períodos largos, permiten que se produzca un lento paso de vapor de agua que tiende a equilibrar la HR del interior con la del ambiente exterior. Aunque el polietileno no es un material adecuado

para el almacenamiento prolongado de semillas ortodoxas con fines de conservación genética, está muy indicado en los casos de plazo corto o medio. Es esencial cerrar correctamente las bolsas, operación que puede realizarse mediante una combinación de calor y presión. Antes se utilizaban hierros candentes, pero en la actualidad el cerrado hermético puede realizarse de una manera más eficaz y cómoda mediante los selladores térmicos comerciales, de los que existen diversos modelos en el mercado (Desai *et al.*, 1997).

Utilización de deshidratantes en los recipientes

Si las semillas ortodoxas se secan hasta alcanzar el CH correcto y se almacenan en recipientes impermeables y herméticamente cerrados, el CH debe permanecer constante durante años. Sin embargo, si se almacenan en un material resistente a la humedad pero no totalmente impermeable, como por ejemplo las bolsas de polietileno, o si es necesario abrir los recipientes y volverlos a cerrar periódicamente para sacar semilla, con el tiempo se irá acumulando lentamente humedad. Para evitar esto se recomienda incluir en los recipientes un deshidratante, como el gel de sílice. La capacidad del gel de sílice para adsorber humedad depende de la humedad relativa del ambiente (Harrington, 1972):

Un método adecuado consiste en utilizar gel de sílice tratado con cloruro de cobalto, que cambia de color, del azul al rosa, cuando la humedad relativa llega al 45% aproximadamente; en muchas especies ortodoxas, el CH en equilibrio correspondiente sería del 7–9%. Se coloca gel de sílice desecado en el recipiente junto con las semillas y, cuando los gránulos adquieren un color rosado, se saca el gel y se reactiva

secándolo en una estufa a 175 °C y enfriándolo después en un recipiente hermético antes de volverlo a utilizar. Se recomienda un peso de gel de sílice igual a la décima parte del peso de la semilla (Harrington, 1972). Hay que tener cuidado de no incluir en los recipientes demasiada cantidad de gel de sílice, pues la semilla podría secarse en exceso. Aun con una cantidad de gel de sílice equivalente a la décima parte del peso de la semilla, el CH de una semilla guardada al 6% suele descender a menos del 5% durante la fase inicial del almacenamiento.

En resumen, la semilla presenta dos fases importantes en su vida, y son el desarrollo y el deterioro (Figura 3).

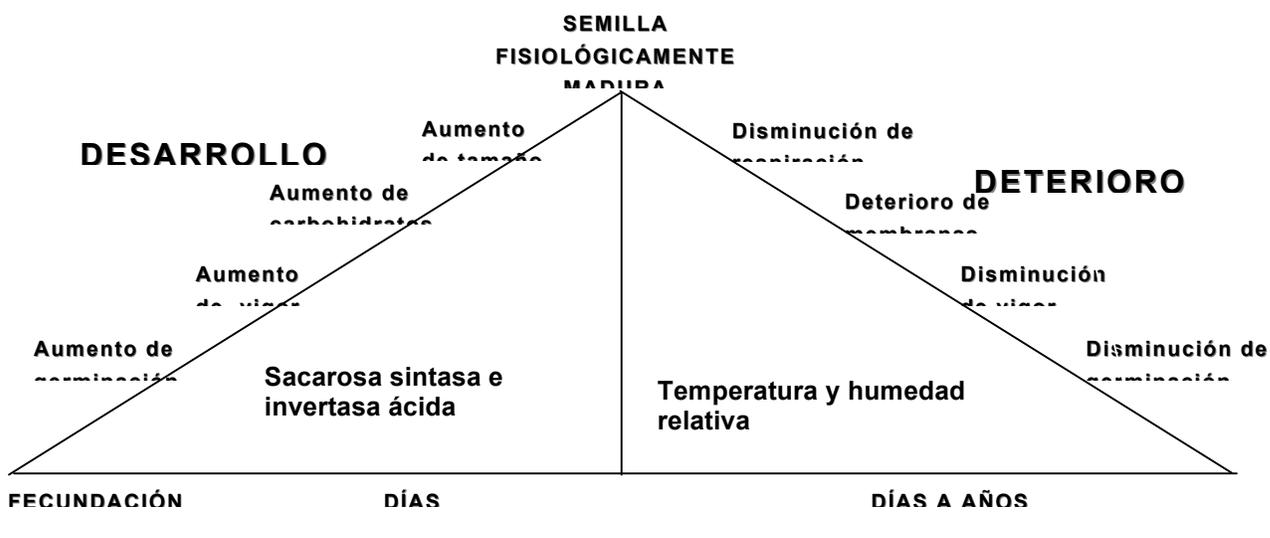


Figura 3. Desarrollo y deterioro de la semilla. Modificado de Ayala, 2008¹.

En la etapa de desarrollo, se aumenta la germinación, vigor, tamaño, contenido de carbohidratos y la tolerancia a condiciones adversas. Estos cambios están asociados con cambios en el metabolismo, ya que los carbohidratos generalmente

¹ Curso SEM-604. Principios agroclimáticos y tecnológicos para la producción de semillas. Cuatrimestre de Verano 2008. Colegio de Postgraduados

aumentan con la maduración de la semilla, aumento que podría resultar en suficientes sustratos respiratorios para la germinación. Este aumento de carbohidratos es favorecido por la acción de las enzimas sacarosa sintasa e invertasa acida. Después de esta etapa, la semilla comienza su fase de deterioro y disminuye la germinación, vigor y la tolerancia a condiciones adversas hasta provocar la muerte. Estos cambios están asociados con cambios en el metabolismo, ya que los carbohidratos generalmente disminuyen con la edad de la semilla, disminución que podría resultar en insuficiencia de los sustratos respiratorios para la germinación; por ello se considera que un signo temprano de envejecimiento de la semilla es la disminución significativa de su tasa respiratoria y el deterioro de membranas.

4. Literatura citada

Azcon-Bieto J, y M Talon. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ediciones Universitarias de Barcelona, España. 522p.

Basavarajappa BS, HS Shetty and HS Prakash. 1991. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Science Technology* 19: 279-286.

Berjak P, W Vertucci C and W Pammenter N. 1993. Desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds: effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in *Camellia sinensis*. *Seed Science Research* 3: 70-82.

Bernal LI. and Leopold AC. 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiology* 98: 1207-1210.

- Bradford K and H Nonogaki. 2007. Seed development, dormancy and germination. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 367 p.
- Cardini CE, Leloir LF and Chiriboga J. 1955. The biosynthesis of sucrose. Journal of Biological Chemistry 214: 149-155.
- Copeland OL and MB McDonald. 2001. Principles of Seed Science and Technology. 4th edition. Kluwer Press, New York. USA. 488 p.
- Delmer, PD and Y Amor. 1995. Cellulose biosynthesis. Plant Cell 7:987-1000.
- Desai BB, PM Kotecha and DK Salunkhe. 1997. Seeds handbooks: biology, production, processing and storage. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 626 p.
- Echevarria E. 1998. Acid invertase (sucrose hydrolysis) is not required for sucrose mobilization from the vacuole. Plant Physiology 104:17-21.
- Ellis RH and EH Roberts. 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. Seed Science and Technology 9(2), 373–409.
- Fieuw S and J Willenbrink. 1987. Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase in sugar beet plants (*B. vulgaris* L. ssp *altissima*). Journal Plant Physiology 131: 153-162.
- Gallardo K, C Signor, J Vandekerckhove, D Thompson R and J Burstin. 2003. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. Plant Physiology, 2003: 664-682.
- Giaquinta R. 1979. Sucrose translocation and storage in the sugar beet. Plant Physiology 63: 828-832.

- Gibeaut DM, Karappiah N, Chang SR, Brock TG, Vadlamudi B, Kim D, Ghosheh NS, Rayle DL, Carpita NC and Kaufman PB. 1990. Cell wall and enzyme changes during graviresponse of the leaf-sheat pulvinus of oat (*Avena sativa*). *Plant Physiology* 94: 411-416.
- Harrington JF. 1970. Seed and pollen Storage for conservation of plant gene resources. *In: Genetic resources in plants - their exploration and conservation, Handbook No 11. International Biological Programme, Londres.*
- Harrington JF. 1972. Seed storage and longevity. *In: T.T. Kozlowski (ed.). Seed Biology Vol. 3. Academic Press, Nueva York & London, pp 145–245.*
- Hawker JS. 1985. Sucrose. *In: PM Dey, RA Dixons (eds). Biochemistry of storages carbohydrates in green plants. Academic press, London, pp 1-51.*
- Ho L. 1996. Tomato. *In: Zamski, E and Schaffer, A. (eds) Photoassimilate Distribution in Plants and Crops. New York, Marcel Dekker, Inc. pp 709-728.*
- Islam MS. 2001. Sucrose metabolism in domesticated cherry tomato, *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* Alef., and purification of sucrose synthase. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76: 40-47.
- Keller F. 1989. Biochemistry and Physiology of non fructan sucrosyl oligosaccharides and sugar alcohols in higher plants. *Journal Plant Physiology* 134: 141-147.
- Kigel J and G Galili. 1995. Seed development and germination. Marcel Dekker Inc. New York. 847 p.
- Klotz KL and Finger FL. 2002. Contribution of invertase and sucrose shynthase isoforms to sucrose catabolism in developing sugarbeet roots. *Journal Sugar Beet Research* 39:1-24.

- Kobayashi T, K Higashi and H Kamada. 2003. 4-Hydroxybenzyl alcohol accumulates in flowers and developing fruits of carrot and inhibits seed formation. *Journal of Plant Physiology* 607: 19-25.
- Kohorn BD. 2000. Plasma membrane-cell wall contacts. *Plant Physiology* 124:31-38.
- LePrince O, R Bronchart and R Deltour. 1990. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seeds. *Plant Cell and Environment* 13: 539 - 546.
- Matilla A J. 2000. Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research* 10: 111-126.
- Nguyen-Quoc B, Foyer CH. 2001. A role for futile cycles involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal Experimental Botany* 52: 881-889.
- Peña LA y Santiaguillo HJF. 1998. Variabilidad genética de tomate de cascara en México. Boletín Técnico No. 2. Programa Nacional de Investigación en Olericultura. UACH, Chapingo, México. 26 p.
- Pérez CI. 2003. Tolerancia a la desecación en semillas de tomate de cáscara. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillos Estado de México. 63 p.
- Pfeiffer I and Kutschera U. 1995. Sucrose metabolism and cell elongation in developing sunflower hypocotyls. *Journal Experimental Botany* 46:631-638.
- Ponce DG, LJ Pérez F, C Pelayo Z y E Bózquez M. 1992. El proceso de senescencia. *Ciencia* 45:121-126.
- Priestley DA. 1986. Seed Aging. Implications for seed storage and persistence in the soil. Comstock Pub. Cornell University Press. Ithaca, USA. 304 p.

- Quick WP and Schaffer AA. 1996. Sucrose metabolism in sources and sinks. *In*: Zamski, E and Schaffer, A. (eds) Photoassimilate Distribution in Plants and Crops. New York, Marcel Dekker, Inc. pp 115-156.
- Riftkin HL, Duffus CM and Bridges IC. 1995. Sucrose metabolism during endosperm development in wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiology* 93:123-131.
- Roberts EH. 1972. Viability of seeds. Chapman and Hall, London.
- Roberts EH. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499–514.
- Roberts EH. 1981. Physiology of ageing and its application to drying and storage. *Seed Science and Technology* 9, 359–372.
- Robledo TV, A Peña L, F Ramírez G, R Ramírez H y JG Ramírez M. 2004. Características asociadas al rendimiento de fruto en el cultivo de tomate de cascara. *In*: XX Congreso Nacional de Fitogenética. Toluca, México. pp. 220.
- Silva MP and Ricardo CPP. 1992. β -Fructosidases and *in vitro* dedifferentiation-redifferentiation of carrots cells. *Phytochemistry* 31:1507-1511.
- Slattery CJ, H Kavakli and TW Okita. 2000. Engineering for increased quantity and quality. *Trends Plant Sci.* 7:291-298.
- Sturm A. 1996. Molecular characterization and functional analysis of sucrose-cleaving enzymes in carrot (*Daucus carota* L.). *Journal Experimental Botany* 47:1187-1192.
- Sturm A. 1999. Invertases. Primary structures, functions and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121:1-7.

- Sung SJS, Xu DP and Black CC. 1989. Identification of actively filling sucrose sinks. *Plant Physiology* 89:1117-1121.
- Walters C, LM Hill and LJ Wheeler. 2005. Dying while Dry: Kinetics and Mechanisms of Deterioration in Desiccated Organisms. *Integrative and Comparative Biology* 45:751–758
- Weber H, Borisjuk L and Wobus U. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science* 2: 169-174.
- Zhang S, Nichols SE and Dong JG. 2003. Cloning and characterization of two fructokinases from maize. *Plant Science* 165: 1051-1058.

CAPÍTULO 1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CONTENIDO DE SACAROSA DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA DE *Physalis ixocarpa* Brot.

Resumen

En esta investigación se estudió la actividad enzimática y el contenido de sacarosa de la semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) y su relación con el desarrollo de las características de calidad física y fisiológica. Se utilizó semilla de tomate de cáscara variedad CHF1-Chapingo producida en invernadero en la Universidad Autónoma Chapingo, Edo. de México, a 2250 m de altitud, durante el ciclo primavera-verano de 2005. La semilla se obtuvo de 120 frutos cosechados en seis fechas de desarrollo o tratamientos (15, 25, 35, 45, 55 y 65 DPP. Se encontró que durante el desarrollo de la semilla, el contenido de carbohidratos solubles aumentó de 33 a 118 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco, y el contenido de sacarosa en la semilla se incremento de 13 a 25 $\mu\text{g g}^{-1}$. En el metabolismo de la sacarosa, la enzima invertasa ácida tuvo niveles altos de actividad en etapas tempranas del desarrollo de la semilla, y luego fue disminuyendo continuamente para llegar a su mínima actividad a los 55 DPP. En cambio, la enzima sacarosa sintasa resultó indetectable en los primeros 15 DPP, para después incrementar y alcanzar su máxima actividad a los 35 DPP, y luego declinar teniendo niveles muy bajos después de 45 DPP. Estos resultados evidencian que ambas enzimas, sacarosa sintasa e invertasa ácida, están presentes y activas en la semilla de tomate de cáscara, que sirven para metabolizar la sacarosa que se usa en el crecimiento y acumulación de carbohidratos en la semilla, procesos que determinan la germinación y vigor de la semilla.

Palabras clave: *Physalis ixocarpa*, desarrollo de semillas, sacarosa, invertasa acida, sacarosa sintasa.

1.1. Introducción

El desarrollo de la semilla depende de la fijación fotosintética del bióxido de carbono y del transporte de sacarosa, aminoácidos y ácidos orgánicos a la semilla (Bradford y Nonogaki, 2007). En la mayoría de especies vegetales el carbono asimilado por las hojas es transportado como sacarosa, un disacárido formado por glucosa y fructosa unidas por un enlace glicosídico (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

La sacarosa se sintetiza en el citosol a partir de las triosas-P producidas en el cloroplasto por el ciclo de Calvin, y comprende 13 reacciones catalizadas por 11 enzimas, entre las que destaca la síntesis de triosas-P.

Las triosas-P pueden ser exportadas del cloroplasto al citosol de células mesofilicas en donde se usan para sintetizar sacarosa la cual se almacena temporalmente en las vacuolas; luego la sacarosa es exportada hacia las células que demandan compuestos ricos en carbono. El transporte de sacarosa desde la fuente a la demanda es un movimiento de larga distancia llamado translocación, en una ruta que involucra la carga del floema, la propia translocación y termina con la descarga del floema en las células del tejido demanda (Grusak *et al.*, 1996).

Una vez descargada en el órgano demanda, la sacarosa debe ser hidrolizada en los dos monosacáridos que la componen (glucosa y fructosa) para que pueda ser utilizada en el proceso de biosíntesis de sustancias de reserva, como almidón que es

la forma de reserva de carbono más importante en plantas superiores (Slattery et al., 2000), o de compuestos estructurales como celulosa que se sintetiza en grandes cantidades durante el crecimiento celular de órganos de reserva (Delmer y Amor, 1995). Dos enzimas hidrolizan la sacarosa: la invertasa y la sacarosa sintasa (SS).

SS actúa en el citoplasma células donde cataliza la reacción reversible $\text{UDP-Glc} + \text{Fructosa} \leftrightarrow \text{Sacarosa} + \text{UDP}$, de modo que juega un papel primordial en otros procesos fisiológicos como son síntesis de almidón, celulosa y hemicelulosa, así como en la respiración. Por otra parte, la invertasa puede ser localizada en la vacuola, citoplasma o compartimientos celulares y cataliza la reacción reversible $\text{Sacarosa} \leftrightarrow \text{Fructosa} + \text{Glucosa}$, por lo que también provee a la célula de recursos para la respiración, y de carbono y energía para la síntesis de numerosos compuestos en la semilla (Bradford y Nonogaki, 2007).

El transporte de sacarosa de la fuente a la demanda es controlado por la “fuerza de la demanda”, que es la capacidad del órgano receptor para atraer la sacarosa. La fuerza de la demanda se correlaciona con la actividad de SS, ya que en los órganos de reserva entre mayor sea la actividad de SS, mayor es su fuerza de demanda, puesto que la hidrólisis de sacarosa provoca un gradiente de este glúcido hacia el órgano de demanda (Sonnewald y Willmitzer, 1992). La influencia de la actividad de SS sobre la partición del carbono y el desarrollo del órgano demanda se ha demostrado en muchos cultivos hortícolas; en *Lycopersicon esculentum* Mill. la máxima actividad de esta enzima se ha observado durante el periodo de mayor crecimiento del órgano de reserva (Quick y Schaffer, 1996), al igual que en *Chaerophyllum bulbosum* (Ayala Garay, 2002).

Conforme se va desarrollando la semilla alcanza una máxima acumulación de reservas, lo que se relaciona directamente con máximos valores de germinación, velocidad de crecimiento de la plántula (vigor) y tolerancia a condiciones adversas (Bradford, 2004), de esta forma el desarrollo de las capacidades de la semilla está asociado con su metabolismo; por ejemplo, la acumulación de las reservas de carbono que ocurre durante su formación resulta en suficiencia de sustratos para la germinación y establecimiento y en la capacidad para usarlos.

Por tanto, el conocimiento detallado de las características bioquímicas y fisiológicas durante el desarrollo de la semilla de *Physalis* ayudaría a entender la constitución temporal de sus características de calidad. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad enzimática y el contenido de sacarosa de la semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) y su relación con el desarrollo de las características de calidad física y fisiológica.

1.2. Materiales y métodos

Se utilizó semilla de tomate de cáscara variedad CHF1-Chapingo producida en invernadero en la Universidad Autónoma Chapingo, Edo. de México, a 2250 m de altitud, durante el ciclo primavera-verano de 2005. La temperatura promedio del invernadero fue $21.4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10.4$ y humedad relativa de $51.1\% \pm 23.7$. La semilla se obtuvo de 120 frutos cosechados en seis fechas de desarrollo o tratamientos (15, 25, 35, 45, 55 y 65 días post-polinización, DPP). Las semillas se dejaron secar durante 8 d después de la cosecha en una bodega cerrada.

Los análisis de calidad física y fisiológica de semillas se hicieron en el Laboratorio de Análisis de Semillas del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México. Los análisis de las variables bioquímicas de las semillas cosechadas en 2005 se hicieron en 2007, al momento de la cosecha las semillas se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el Laboratorio de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztacala, Estado de México.

Calidad física

Para medir el peso de mil semillas se siguió el procedimiento estándar propuesto por la ISTA (2004), en ocho repeticiones de 100 semillas que se pesaron en una balanza Ohaus (Pine Brook, China), con precisión de 0.001 g. Estos datos se analizaron conforme a un diseño experimental completamente al azar.

Calidad fisiológica

Se estableció una prueba de germinación con cuatro repeticiones de 100 semillas, en un diseño experimental completamente al azar. Las semillas se germinaron en cajas petri con papel filtro humedecido colocadas en una germinadora SD8900 (Seedburo Inc., EE. UU.) a $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad, por 8 d, según las normas de la ISTA (2004). En este experimento se midió la velocidad de emergencia de radícula con la fórmula de Maguire (1962) como parámetro del vigor de la semilla, que usa el número de radículas emergidas cada 24 h:

$$\text{Velocidad de Emergencia} = \frac{(\sum \text{Número de radículas emergidas al conteo } i\text{-ésimo})}{(\sum \text{Número de días de la siembra al conteo } i\text{-ésimo})}$$

A los 8 d se calcularon los porcentajes de germinación y de viabilidad, con base en las cantidades de plántulas normales y plántulas anormales.

El vigor de los lotes de semilla se evaluó mediante la prueba de velocidad de emergencia en arena. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental de bloques al azar con cuatro repeticiones de 100 semillas. Las semillas se sembraron en un semillero con arena esterilizada a 1 cm de profundidad y con humedad a saturación. Cada 24 h se registraron las plántulas emergidas, y la velocidad de emergencia de plántulas se calculó con la fórmula de Maguire (1962):

$$\text{Velocidad de Emergencia} = \frac{(\sum \text{Número de radículas emergidas al conteo } i\text{-ésimo})}{(\sum \text{Número de días de la siembra al conteo } i\text{-ésimo})}$$

Variables bioquímicas

La concentración de sacarosa se determinó en 300 mg de semilla por tratamiento; tales semillas se homogeneizaron en un mortero con 1 mL de etanol a 96% en frío. Al homogeneizado se le agregó 1 mL de agua destilada y se centrifugó a 14 000 g y se recuperó el sobrenadante, el cual se calentó 3 min a 80 °C. En un tubo se colocaron 100 µL de este extracto, y 400 µL de amortiguador de acetato de sodio 100 mM, pH 4.5. La mezcla se incubó 1 h a 37 °C más 3 min a 80 °C. Para teñir y poder leer en el espectrofotómetro, se utilizó el método Nelson-Somogy, que consiste en que a cada tubo de ensayo se adicionan 100 µL de muestra, 900 µL de agua destilada y 1000 µL de reactivo de cobre. Los tubos de ensayo se taparon con papel aluminio y se colocaron en baño María donde se hirvieron a 90 °C durante 20 min. A

cada tubo se agregó 1000 μL de reactivo de arsenomolibdato y 2000 μL de agua destilada. Se mezcló por inversión cada tubo y se leyó en un espectrofotómetro Lambda 2S (Perkin Elmer) a 520 nm. Para calcular la glucosa liberada por la reacción, se hizo la gráfica de calibración con los datos de los tubos de ensayo, al utilizar la ordenada para la concentración de glucosa y la abscisa para la absorbancia. Se interpoló en la curva patrón el valor del problema y se determinó la concentración de sacarosa.

La concentración de carbohidratos totales se determinó en 300 mg de semilla por tratamiento; tales semillas se homogeneizaron en un mortero con 1 mL de etanol a 96% en frío. Al homogeneizado se le agregó 1 mL de agua destilada y se centrifugó a 14,000 g y se recuperó el sobrenadante, el cual se calentó 3 min a 80 °C. En un tubo se colocaron 100 μL de este extracto, 100 μL de invertasa (30 unidades mg^{-1} , grado VII, Sigma Aldrich, Tokio, Japón) y 300 μL de amortiguador de acetato de sodio 100 mM, pH 4.5. La mezcla se incubó 1 h a 37 °C más 3 min a 80 °C. Para teñir y poder leer en el espectrofotómetro, se utilizó el método Nelson-Somogy como anteriormente se describió.

La actividad de la enzima invertasa ácida se determinó en 1 g de semilla que se homogeneizó en un mortero con 2 mL de amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4 más 5 μL de sulfato de manganeso en frío. El homogeneizado se centrifugó a 14,000 g. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 100 μL que se colocó en tubo junto con 400 μL de amortiguador de acetato de sodio 200 mM, pH 5.5, y la mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C, y luego se calentó 3 min a 80 °C; por último, se utilizó el método Nelson-Somogy como anteriormente se describió. La concentración de invertasa ácida se expresó en μg glucosa mg proteína⁻¹ min⁻¹.

Para determinar proteína, 1 g de semilla de tomate de cáscara se homogeneizó en un mortero con 2 mL de buffer, 50 mM de fosfato de sodio, 1 mM mercaptoetanol y 5 μ L de sulfato de manganeso a pH 7.4, y nitrógeno líquido. El homogeneizado se centrifugó a 14 000 g (para que la muestra no lleve basura y dé buena lectura en el espectrofotómetro), y se recuperó el sobrenadante. En un tubo de ensayo se colocaron 10 μ L de este extracto, 1 mL de agua destilada y 5 mL de reactivo de Bradford (para la detección de proteínas). Se mezcló por inversión cada tubo y se leyó en el espectrofotómetro Lambda 2S (Perkin Elmer) después de 10 min y antes de 1 h, a 595 nm. En la gráfica de calibración la abscisa correspondió a las concentraciones de BSA (albúmina de suero de bovino) y la ordenada a la absorbancia. Se interpoló en la curva patrón el valor del problema y se determinó su concentración. El reactivo de Bradford se preparó al disolver 100 mg de azul de comassie G-250 en 50 mL de etanol a 95%, se agregó 100 mL de ácido fosfórico a 85% (p/v), se diluyó en 1 L de agua destilada, se filtró en papel filtro y se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente (Bradford, 1976).

Después de interpolar en la curva patrón el valor del problema y determinar la concentración de proteína y de glucosa (como anteriormente se explicó) se hizo el siguiente cálculo: $(\mu\text{g glucosa}) \times (1000 \text{ mg proteína}) / \text{mg de proteína}$; este resultado se dividió entre 60 para tener la concentración por minuto.

Para determinar la actividad de la enzima sacarosa sintasa, 100 mg de semilla se homogeneizaron en un mortero frío con 1 mL de amortiguador compuesto de: Tris 1 M, MgCl_2 20 mM, EDTA 1 mM y DTT 10 mM, a pH 8.2. El homogeneizado se centrifugó a 14,000 g y se recuperó el sobrenadante. En microtubos se colocaron los siguientes

reactivos: 100 μ L de sacarosa (1 M), 340 μ L Hepes (100 mM, pH 7), 10 μ L de UDP (100 mM) y 50 μ L del extracto. Se incubaron los microtubos por 20 min a 30 °C, y luego se calentaron por 5 min a 100 °C. Posteriormente se leyó en un espectrofotómetro computarizado con el programa Lamba versión 1994-1996, en 100 μ L de la muestra incubada, 875 μ L de Tris 0.1 M, pH 8.7, 5 μ L de UDPG-DH y 20 μ L de NAD 25 mM.

Análisis estadístico de los datos

En todas las variables se obtuvieron promedios por tratamiento mediante el programa Microsoft Excel 2003. Los promedios de datos observados se ajustaron a curvas polinomiales. Con el programa estadístico SAS versión 6.12 (SAS Institute, 1993) se hicieron los análisis de varianza y se hicieron las comparaciones de medias con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

1.3. Resultados y discusión

El peso de 1000 semillas (P1000S) del tomate de cáscara, que indica el tamaño de la semilla y su crecimiento durante la formación del fruto aumentó hasta los 55 días post-polinización (DPP) , de manera que la máxima acumulación de biomasa ocurrió a los 55 DPP con un peso de 1.65 g (Figura 1a). Se postula entonces que a los 55 DPP ocurrió la madurez fisiológica del tomate de cáscara creciendo en estas condiciones, puesto que la máxima acumulación de materia seca coincide con la madurez fisiológica de la semilla (Bradford, 2004).

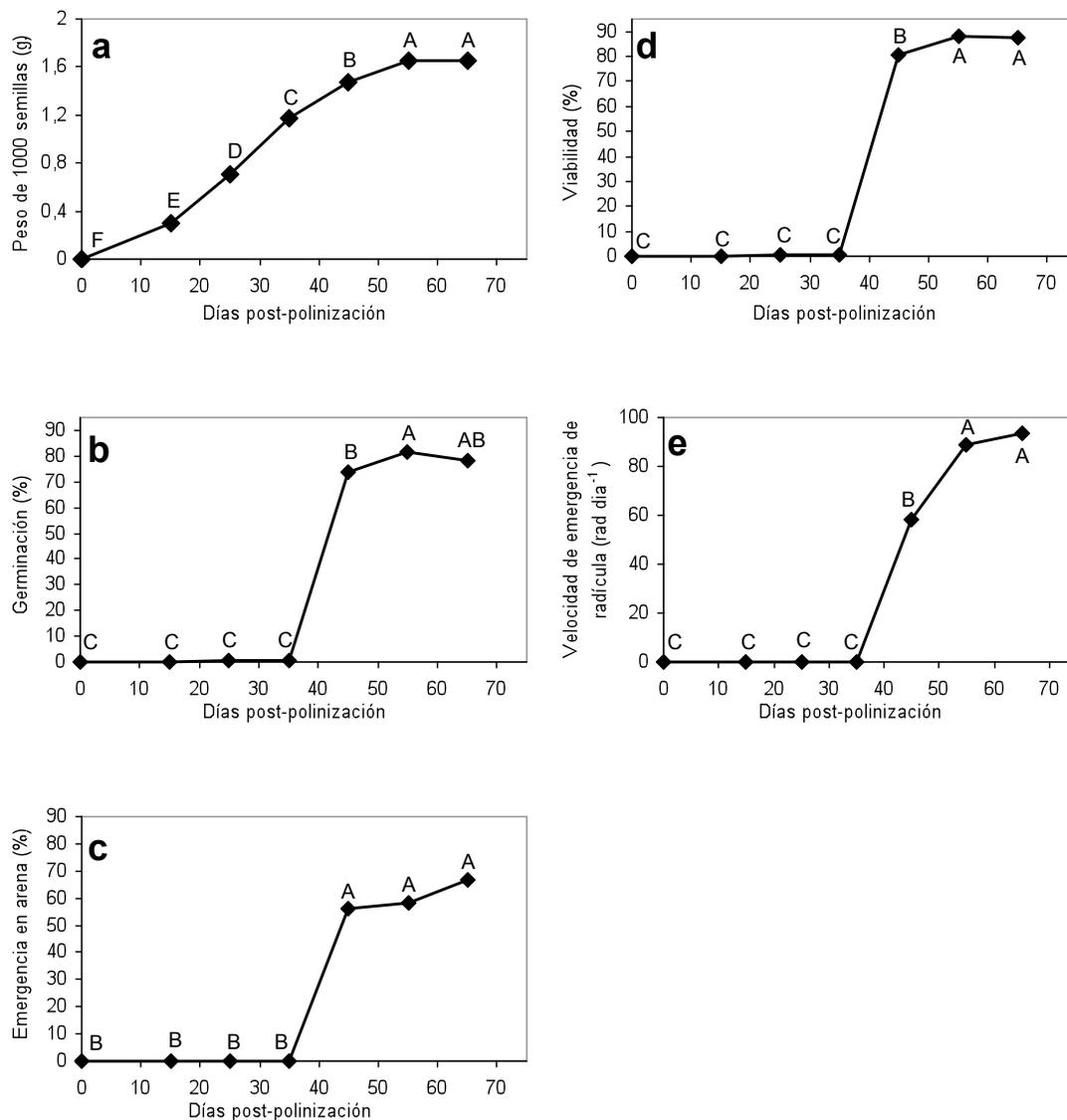


Figura 1. Efecto de la edad del fruto en formación, en las variables físicas y fisiológicas de la semilla de *Physalis ixocarpa* Brot. Letras iguales en cada variable indican valores estadísticamente iguales (Tukey, 0.05)

Las semillas inmaduras de 5 a 35 DPP carecieron de capacidad germinativa, pero ésta se expresó a los 45 d con un valor de 73.5%, y alcanzó su valor máximo 10 d después con 81.5% (Figura 1b), fecha en la que el fruto cambió de color verde a amarillo. Estos resultados contrastan con los de Martínez *et al.* (2004) quienes reportaron que el mayor porcentaje de germinación en semillas de tomate de cáscara

se alcanza a los 63 DPP, en cambio fueron similares a los observados por Modi y White (2004) en semillas de tomate "Cherry", cuya germinación evolucionó de 5, 38, 68 y 72% a los 14, 28, 42 y 56 DPP, respectivamente. Es decir, en tomate de cáscara la semilla puede ser extraída del fruto a los 45 d y lograr germinabilidad. En este experimento, la germinabilidad máxima de 81.5% corresponde a un nivel poco aceptable para el comercio de semillas puesto que para que un lote pueda ser certificado debe contar con un mínimo de 85% de germinación (ISTA, 2004).

Al igual que la germinabilidad, la semilla inmadura de 45 d alcanzó viabilidad mayor a 80%, pero muestras menores a 35 d fueron inviables. Al comparar la viabilidad y germinabilidad a los 55 d, se observa que la viabilidad fue mayor en 6.5% lo que indica que este es el porcentaje de plántulas anormales (Figura 1d).

La velocidad de emergencia de radícula, indicador del vigor de la semilla, mostró que ésta ocurre después de 35 d y que se mantiene creciendo en forma sigmoideal hasta los 65 d (Figura 1e).

La emergencia en arena a los 55 d, cuando se alcanzó la máxima germinabilidad en la prueba estándar, fue 58% (Figura 1c). Por lo que emergencia en arena fue 23.5 % inferior que la tasa de germinación. En arena la germinación debió haber tenido igual tasa que en la prueba estándar, pero para que la emergencia ocurra en arena, las plántulas deben crecer y alargarse, de manera que la plántula tiene que vencer la resistencia del sustrato; además, en esta prueba indicadora del vigor de las semillas, las plántulas tuvieron que crecer más para poder ser registradas como emergidas. En semillas inmaduras de 35 DDF o menos, no emergieron plántulas debido a la

inmadurez de la semilla y a su bajo nivel de nutrientes, enzimas y hormonas indispensables para la germinación (Kermode, 1990).

Los contenidos de sacarosa y carbohidratos solubles totales fueron en aumento durante el desarrollo de la semilla, en forma lineal (Figura 2). La sacarosa representó 27.3% de los carbohidratos totales. Lo anterior indica que los mecanismos de síntesis o acumulación de sacarosa se encuentran activos durante el desarrollo de las semillas. Tales incrementos observados en los contenidos de carbohidratos solubles en las semillas de tomate de cáscara parecen estar asociados con el desarrollo de la semilla, de una forma similar a lo observado por Brenac *et al.* (1997) en semillas de maíz.

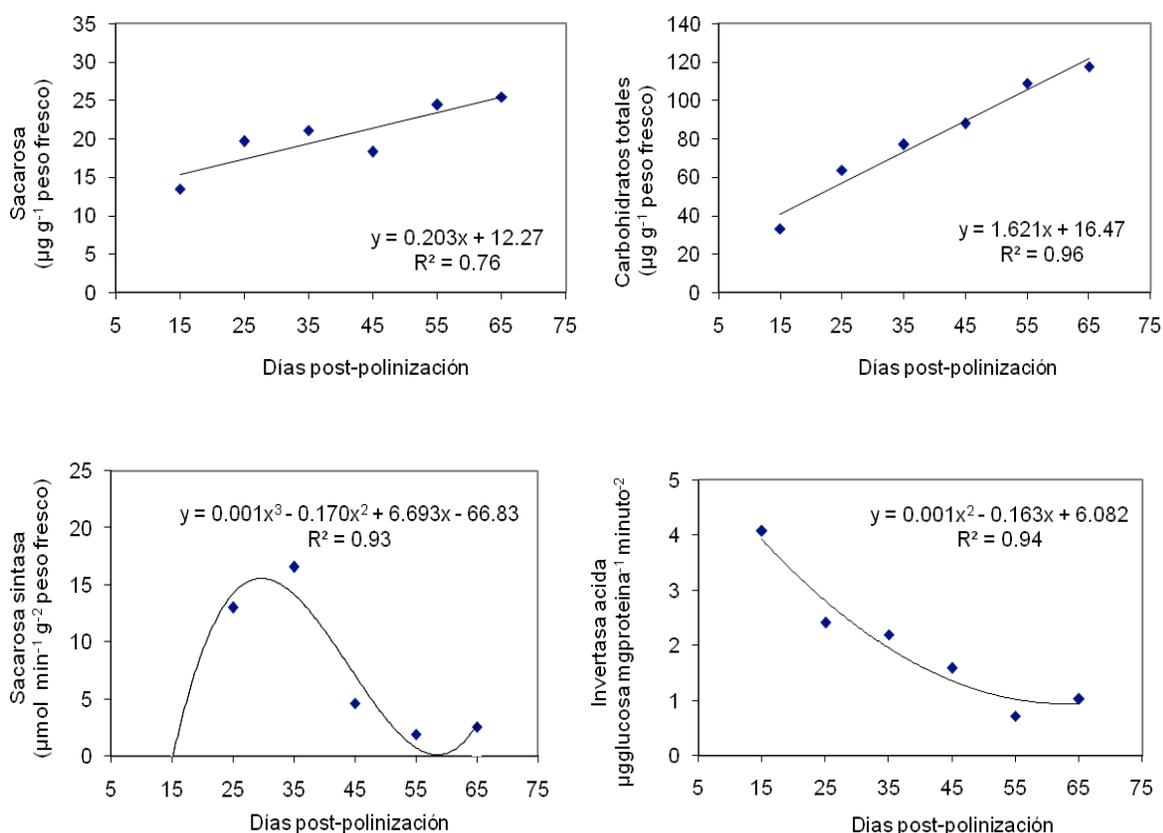


Figura 2. Efecto de la edad del fruto en formación en los contenidos de sacarosa, carbohidratos totales, y en las actividades de las enzimas sacarosa sintasa e invertasa ácida en semillas de *Physalis ixocarpa* Brot.

La baja germinación y vigor antes de los 35 DPP podría deberse a que la semilla aún no contenía las cantidades adecuadas de reservas o el embrión era fisiológicamente inmaduro. Dado que a los 45 DPP la semilla contenía $87.9 \mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco de carbohidratos totales y ya permitía la germinación, podría inferirse que ésta es la cantidad mínima de carbohidratos que se requiere para la germinación en tomate de cáscara. Esto último es de vital importancia, ya que los carbohidratos aportan energía metabólica y constituyentes estructurales de la célula, además de actuar como reguladores de procesos asociados con el crecimiento y desarrollo de las plántulas en los primeros días, hasta que estas plántulas sean capaces de fotosintetizar y elaborar sus propios nutrimentos (Copeland y McDonald, 2001; Bradford, 2004).

La máxima calidad de semilla, en cuanto a vigor, se ha asociado con la máxima acumulación de carbohidratos (Bradford, 2004). En este experimento el máximo vigor de la semilla y la máxima acumulación de sacarosa se alcanzaron a los 55 DPP, fecha que podría representar el cese del transporte de savia del floema a la semilla.

La sacarosa se ha encontrado en concentraciones altas en los tejidos seminales, por lo que se considera que contribuye al vigor de las semillas como combustible del metabolismo inicial que aporta sustratos para la respiración y el alargamiento del eje embrionario (Kigel y Galili, 1995; Yordanov *et al.*, 2003). Se puede inferir entonces que la acumulación paulatina de este azúcar durante el desarrollo de la semilla de tomate de cáscara, contribuye al desarrollo del embrión y, tal vez, a la estabilización de los lípidos membranales.

En este estudio ninguna de las enzimas (sacarosa sintasa e invertasa acida) por sí sola, se correlacionó significativamente con la calidad fisiológica de la semilla de

tomate de cáscara (Cuadro 1), aunque estas enzimas seguramente contribuyen al metabolismo de la semilla creciente.

Cuadro 1. Análisis de correlación entre indicadores de germinación, vigor, contenido de carbohidratos y actividad enzimática.

	Carbohidratos	Sacarosa	Sacarosa sintasa	Invertasa acida
P1000S	0.9577	0.7615	0.0277	0.0514
Viabilidad	0.6358	0.3353	0.1236	0.1872
Germinación	0.6340	0.3346	0.1236	0.1880
VERadícula	0.6608	0.3726	0.1349	0.2050
PEArena	0.6389	0.3361	0.1250	0.1833

VE = Velocidad de emergencia; PE = Porcentaje de emergencia

Nótese que en semilla muy joven (≤ 15 DPP) la actividad de la sacarosa sintasa es nula, para luego aumentar rápidamente hasta alcanzar su máximo valor (~15 unidades) a los 35 DPP, y en seguida decrecer a valores pequeños (2-3 unidades) de los 55 DPP en adelante. En contraste, en semilla joven la actividad de la invertasa ácida es alta (4.07 unidades) y luego va en continuo decrecimiento conforme crece y madura la semilla, hasta niveles de apenas 0.71 unidades. De acuerdo con estos resultados, la invertasa ácida es una enzima importante en etapas tempranas del desarrollo de la semilla, y la sacarosa sintasa juega un papel importante en etapas intermedias del desarrollo de la semilla de tomate de cáscara, ya que alcanza su máxima actividad cuando la semilla crece más rápido (entre 25 y 35 DPP), lo que concuerda con lo observado por Quick y Schaffer (1996) en *Lycopersicon esculentum* Mill. Nótese además, que, a la madurez fisiológica (55 DPP), la actividad de estas dos

enzimas presentó un nivel muy bajo, por lo que la continua acumulación de sacarosa y carbohidratos totales podría deberse (en estas fases) a una alta concentración de estas enzimas (que aquí no se midió).

La fuerza de demanda, medida como la tasa de importación de asimilados, podría estar relacionada con la ruta de transporte de sacarosa hacia las células de demanda durante el desarrollo de la semilla. De esta forma, el peso de mil semillas podría estar determinado por el balance entre la fuerza de la fuente y demanda de la planta. Por otro lado, el contenido de carbohidratos solubles totales es una característica importante determinante de la calidad de la semilla (germinación y vigor), lo cual está estrechamente ligado a la concentración de sacarosa. Estos resultados evidencian que ambas enzimas sacarosa sintasa e invertasa ácida, están presentes y activas en la semilla de tomate de cáscara, que sirven para metabolizar la sacarosa que se usa en el crecimiento y acumulación de carbohidratos en la semilla, procesos que determinan la germinación y vigor de la semilla (Bradford y Nonogaki, 2007).

1.4. Conclusiones

Durante el desarrollo de la semilla, el contenido de carbohidratos solubles aumentó de 33 a 118 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco, y el contenido de sacarosa en la semilla se incrementó de 13 a 25 $\mu\text{g g}^{-1}$.

En el metabolismo de la sacarosa, la enzima invertasa ácida tuvo niveles altos de actividad en etapas tempranas del desarrollo de la semilla, y luego fue disminuyendo continuamente para llegar a su mínima actividad a los 55 DPP. En cambio, la enzima sacarosa sintasa resultó indetectable en los primeros 15 DPP, para

después incrementar y alcanzar su máxima actividad a los 35 DPP, y luego declinar teniendo niveles muy bajos después de 45 DPP.

Las enzimas sacarosa sintasa e invertasa ácida, están presentes y activas en la semilla de tomate de cáscara, y sirven para metabolizar la sacarosa que se usa en el crecimiento y acumulación de carbohidratos en la semilla.

1.5. Literatura citada

Ayala Garay OJ. 2002. Etude ecophysiologique de deux cultivars de cerfeuil tubereux, *Chaerophyllum bulbosum* L.: accumulation d'amidon dans les tubercules et impact des modes de conservation sur l'hydrolyse de l'amidon. Thèse pour obtenir le titre de docteur de l'ENSAR. 140 p.

Azcón-Bieto J y, M. Talón. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. Ediciones Universitarias de Barcelona, España. 522 p.

Bewley J. D. and M. Black. 1994. Seeds, physiology of development and germination. Plenum Press. Second ed., New York. USA. 445 p.

Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micro quantities of protein. *Analy. Biochemi.* 72:248.

Bradford, K J. 2004. Seed production and quality. Department of Vegetable Crop and Weed Science. University of California. Davis, CA. USA. 134 p.

Bradford, K and H Nonogaki. 2007. Seed development, dormancy and germination. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 367 p.

- Brenac P, M Horbowicz, SM Downer, AM Dickerman, ME Smith and Obendorf. 1997. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and maturation. *J. Plant Physiol.* 150: 481-488.
- Copeland, OL and MB McDonald. 2001. *Principles of Seed Science and Technology*. 4th ed. Kluwer Press, New York. USA. 488 p.
- Delmer, PD and Y Amor. 1995. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell* 7:987-1000.
- Grusak, MA, DU Beebe and R Turgeon. 1996. Phloem loading. *In: Photoassimilate Distribution in Plants and Crops*. A. Zamski and A. A. Schaffer (eds). Marcel Dekker Inc, New York. pp 209-227.
- ISTA, International Seed Testing Association. 2004. *International Rules for Seed Testing. Rules 2004*. ISTA editions, Zurich, Switzerland. 243 p.
- Kermode, AR. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Rev. Plant Sci.* 9: 155-195.
- Kigel J and G Galili. 1995. *Seed development and germination*. Marcel Dekker. Inc. New York. 847 p.
- Maguire, J. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2: 176.
- Martinez SJ, A Peña L y D Montalvo H. 2004. Producción y Tecnología de Semilla de Tomate de Cáscara. Boletín técnico # 4. Programa Nacional de Investigación y Servicio en Olericultura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 36 p.

- Modi AT and BJ White. 2004. Water potential of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) placenta and seed germination in response to desiccation during fruit development. *Seed Sci. Res.* 14: 249-257.
- Quick WP and AA Schaffer. 1996. Sucrose metabolism in sources and sinks. *In* : Photoassimilate Distribution in Plants and Crops. A. Zamski and A. A. Schaffer (eds). Marcel Dekker Inc., New York. pp. 115-156.
- SAS Institut. 1993. SAS/STAT User's Guide Release 6. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina. USA. 164 p.
- Slattery CJ, H Kavakli and TW Okita. 2000. Engineering for increased quantity and quality. *Trends Plant Sci.* 7:291-298.
- Sonnewald, U and L Willmitzer. 1992. Molecular approaches to sink-source interactions. *Plant Physiol.* 99:1267-1270.
- Yordanov I, V Velikova and T Tsonev . 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulgarian J. Plant Physiol.* (special issue) pp: 187-206.

CAPITULO 2. EFECTO DEL DESARROLLO Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS DE TOMATE DE CÁSCARA EN VARIABLES FISIOLÓGICAS

Resumen

En el presente estudio se analizó el deterioro de la semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) cosechada en diferentes momentos de desarrollo y almacenada a diferentes temperaturas y humedades relativas. Se utilizó semilla de la variedad CHF1-Chapingo producida en invernadero. Se generaron cuatro ambientes de almacenamiento resultantes de la combinación de 23.8 y 5.3 °C de temperatura, y 81.4 y 24.1% de humedad relativa (HR); teniendo como testigo la semilla expuesta a temperatura y humedad relativa del medio ambiente. Después de ocho meses de almacenamiento, sólo se encontró un deterioro significativo a 23.8 °C y 81.4% HR, ya que causó la disminución de: germinación, de 69.8 a 29.3%; viabilidad, de 81 a 46%; velocidad de emergencia de radícula, de 20.39 a 9.88 radículas.día⁻¹; velocidad de parte aérea, 6.3 a 2.29 plántulas día⁻¹, respiración, 16.13 a 6.63 nmol CO₂ g⁻¹ s⁻¹ y conductividad eléctrica, 32 a 97.1 µs cm⁻¹g⁻¹. Las semillas inmaduras de 45 d poseen capacidad de germinar, aunque 10% menos que la semilla madura de 55 y 65 DPP, y con menor vigor. La germinación y la viabilidad fueron iguales en las cosechas a los 55 y 65 DPP, edades en las que tampoco hubo diferencias significativas en conductividad eléctrica y contenido de humedad de la semilla.

Palabras clave: temperatura, humedad relativa, germinación, respiración, vigor, conductividad eléctrica.

2.1. Introducción

En el manejo comercial de semillas hortícolas los factores más importantes que reducen su viabilidad son las altas humedad ambiental, temperatura, y sobre todo, el alto contenido de humedad de la propia semilla (Copeland y McDonald, 2001). La importancia de éste factor en la preservación de las semillas radica en el papel del agua en los procesos fisiológicos que determinan el vigor y la longevidad de las semillas, así como en el desarrollo de insectos y hongos de almacén (Santacruz *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

En semillas ortodoxas, el contenido de humedad (CH) es probablemente el factor más importante que determina su longevidad. Si se reduce el CH, se reduce también la respiración y se desacelera el envejecimiento de la semilla, por lo que se prolonga su viabilidad. Según la FAO (1991), con contenidos de humedad oscilando entre 0 y 4%, el almacenamiento es muy seguro, siempre y cuando se haga en condiciones herméticas; de 8 a 9%, hay una importante reducción en la actividad de insectos; de 12 a 14% se inicia la posibilidad de desarrollo de hongos; de 18 a 20% la semilla puede calentarse (debido a una tasa alta de respiración y liberación de energía); y de 45 a 60% empieza la germinación.

Según Walters *et al.* (2005) con la deshidratación ocurren varias funciones, esencialmente bioquímicas, protectoras de las paredes y organelos celulares, sin embargo, también puede haber efectos perjudiciales que desvanecen los efectos protectores y fomentan daños en las células de la semilla. Por tanto, es necesario conocer los procesos que ocurren al cambiar el nivel de hidratación, así como los mecanismos adversos que dan lugar a efectos deletéreos.

Algunos cambios fisiológicos en los tejidos celulares pueden estar asociados con el envejecimiento fisiológico de las semillas, estos pueden ser: (1) La pérdida de reservas nutritivas debida a la respiración, por ejemplo, la disminución de las proteínas y los azúcares no reductores mientras se incrementan los azúcares reductores y ácidos grasos libres. (2) Acumulación de subproductos tóxicos de la respiración o inhibidores del crecimiento. (3) Pérdida de actividad de los sistemas enzimáticos. (4) Pérdida en la capacidad de las proteínas desecadas para recombinarse y formar moléculas protoplásmicas activas en una rehidratación ulterior. (5) Deterioro de membranas celulares semipermeables. (6) Peroxidación de lípidos, lo que hace que se liberen radicales libres que reaccionan y dañan a otros componentes celulares. (7) Alteraciones del ADN nuclear, que producen mutaciones genéticas y daño fisiológico (Palma *et al.*, 2000; Copeland y McDonald, 2001; Delouche, 2002). No está claro todavía hasta que punto estos efectos originan deterioro, pero se ha sugerido que la producción de radicales libres es el primer efecto del envejecimiento y del daño que sufren los diversos sistemas de la célula.

Estos mecanismos se pueden presentar durante el almacenamiento causando el deterioro de la semilla, lo que disminuye el porcentaje de germinación, la velocidad de crecimiento de la plántula y la tolerancia a condiciones adversas (Bradford, 2004). Un síntoma del deterioro de semillas es la disminución del vigor. El vigor de semillas y el deterioro están fisiológicamente ligados, en forma recíproca o inversa con la calidad de semillas. El deterioro tiene una connotación negativa, mientras que el vigor tiene una connotación positiva; el vigor disminuye a medida que el deterioro aumenta. Deterioro es el proceso de envejecimiento y muerte de las semillas, y vigor es el principal

componente de la calidad afectado por el proceso de deterioro. La relación entre germinación con deterioro y vigor es similar (Delouche, 2002).

Cualquiera que sea el mecanismo preciso del deterioro de semillas, se coincide que en las semillas ortodoxas, la pérdida de viabilidad es un fenómeno regido en gran medida por la respiración. Es probable que las condiciones que reducen la tasa de respiración sin dañar la semilla, prolonguen su vida en almacén, algunas de estas condiciones se pueden propiciar con bajos valores de contenido de oxígeno, humedad y de la temperatura.

En tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) es común observar que la semilla almacenada pierde rápidamente la viabilidad con temperaturas de almacenamiento superiores a 30 °C, como ocurre frecuentemente en bodegas de campos agrícolas. No obstante, existe la tecnología para lograr condiciones de almacenamiento adecuadas para preservar la calidad biológica de las semillas por largos periodos, pero su alto costo la hace poco accesible para la mayoría de los usuarios, particularmente en los países en desarrollo (Copeland y McDonald, 2001).

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de diferentes temperaturas y humedades relativas durante el almacenamiento de semillas de tomate de cáscara cosechadas en diferentes etapas de desarrollo sobre sus características de germinación, vigor, respiración y conductividad eléctrica.

2.2. Materiales y métodos

Se utilizó semilla de tomate de cáscara variedad CHF1-Chapingo producida en invernaderos de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México, a 2250

m de altitud, durante el ciclo primavera-verano de 2005. La semilla se obtuvo de 120 frutos cosechados en diferentes momentos del desarrollo y se secaron a la sombra durante 8 días.

Experimentos de almacenamiento

Se generaron cinco ambientes (tratamientos) de almacenamiento (Cuadro 1), en frascos de plástico de 14 x 14 x 24 cm a los que se les agregó en la base una solución saturada de cloruro de sodio o sílica gel para modificar la humedad relativa en su interior. A 4 cm arriba de la base se colocó una malla de alambre en un soporte de madera, donde se colocaron las semillas. Los frascos se colocaron tanto en un cuarto de germinación como en un cuarto frío para obtener las temperaturas a evaluar. Como testigo se utilizó semilla expuesta a temperatura y humedad relativa de una bodega, sin climatización. Se utilizaron sensores HOB0 H8-032-08 (Onset Computer Corporation, EE. UU.) para medir la temperatura y humedad relativa de los ambientes de almacenamiento. Se usó semilla cosechada a los 45, 55 y 65 días después de polinización.

Cuadro 1. Condiciones de temperatura y humedad relativa de los ambientes de almacenamiento evaluados en semillas de tomate de cáscara.

Ambiente	Temperatura (°C)	HR (%)	Sustrato y lugar de almacenamiento
1	23.8 ± 0.3	81.4 ± 2.9	Cloruro de sodio en cuarto de germinación
2	23.8 ± 0.3	24.1 ± 0.8	Sílica gel en cuarto de germinación
3	5.3 ± 0.4	81.4 ± 2.9	Cloruro de sodio en cuarto frío
4	5.3 ± 0.4	24.1 ± 0.8	Sílica gel en cuarto frío
5	18.2 ± 5	41.2 ± 10	Testigo (bodega sombreada)

Establecimiento del experimento y diseño experimental

En bolsas de tela porosa (tul de seda) se colocaron muestras de 100 semillas; las bolsas se depositaron sobre la malla de alambre en el interior de los frascos; éstos se sellaron herméticamente y se colocaron en los diferentes ambientes de

almacenamiento. La evaluación de la calidad física y fisiológica, respiración y conductividad eléctrica se hizo en 2005 y 2006 en los laboratorios de Análisis de Semillas y Fisiotecnia del Colegio de Postgraduados, ubicados en Montecillo, Edo. de México. El diseño experimental fue de bloques completos al azar con arreglo factorial de tratamientos, con cuatro repeticiones. Los tratamientos se conformaron con la combinación de tres edades de la semilla (45, 55 y 65 días después de polinización), tres tiempos de almacenamiento (0, 4 y 8 meses) y cinco ambientes de almacenamiento.

Variables evaluadas

Contenido de humedad

Se calculó con la fórmula de Bewley y Black (1994), se tomaron cuatro repeticiones de 100 semillas, se pesaron y posteriormente se deshidrataron durante 72 h a 72 °C en una estufa (Thelco 31480, EE. UU.).

Calidad fisiológica

Para la prueba de germinación se utilizaron cuatro repeticiones de 100 semillas. Las semillas se colocaron en cajas petri con papel filtro humedecido, y se metieron en una germinadora SD8900 (Seedburo Inc., EE. UU.) a 25 ± 1 °C por 8 d, según las normas de la ISTA (2004). Como variables de vigor de semillas, en este experimento se midió la velocidad de emergencia de radícula y parte aérea con la fórmula de Maguire (1962), la cual consiste en contabilizar cada 24 h el número de radículas o parte aérea emergida. Además, al final de la prueba se determinaron el porcentajes de germinación y de viabilidad (sumando el número de plántulas normales + anormales).

Respiración

La respiración se evaluó en cuatro repeticiones de 100 semillas colocadas al azar en cajas petri cada 24 h durante 7 d. En cada muestreo se midió la actividad respiratoria de la semilla ($\text{nmol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$) con un aparato de fotosíntesis CI-301PS (CID Inc., Canadá), y se calculó el promedio de la tasa de respiración por tratamiento.

Conductividad eléctrica

El efecto de los años de almacenamiento en la permeabilidad de las membranas celulares se determinó en la solución de imbibición de las semillas mediante la conductividad eléctrica ($\mu\text{scm}^{-1}\text{g}^{-1}$) que se midió en cuatro repeticiones de 100 semillas tomadas al azar, que se pesaron y colocaron en 60 mL de agua desionizada a 25 °C durante 24 h, con un aparato de conductividad Modelo 72729 (Oakton, Singapur).

Análisis estadístico de los datos

En cada variable se realizó un análisis de varianza en el que los factores fueron edad de la semilla, tiempo y ambientes de almacenamiento, así como sus respectivas comparaciones. Para las comparaciones de medias se utilizó la prueba de Tukey, mediante el programa estadístico SAS versión 6.03 (SAS Institute, 1993).

2.3. Resultados y discusión

Sólo la combinación de temperatura relativamente alta (23.8 °C) con alta humedad relativa (81.4%) redujo la capacidad germinativa y viabilidad de las semillas de tomate de cáscara, efecto que se asoció con una mayor conductividad eléctrica y

mayor contenido de humedad de la semilla (Cuadro 2). Es decir, si se enfría el almacén a 5 °C o baja la HR a $\leq 41\%$, se evita el deterioro de estas semillas.

En el quinto tratamiento (23.8 °C y 81.4% de HR) la conductividad eléctrica (CE) aumentó notablemente, debido a la altas temperatura y alta humedad relativa, lo que provocó lixiviación de solutos y deterioro de la semilla. El comportamiento anterior se debe a que tales condiciones provocaron que el contenido de humedad de la semilla se triplicara, de 5.7 a 15.2. Es decir, el equilibrio higroscópico de la semilla cambió en función de la temperatura y humedad relativa del almacén, como lo señalaron Copeland y McDonald (2001). De acuerdo con la FAO (1991), cuando la semilla tiene un contenido de humedad del 10 al 12%, ésta puede desarrollar algunos hongos internos, y cuando tiene de 18 a 20% puede calentarse (debido a una tasa rápida de respiración y liberación de energía). En este experimento la respiración fue baja debido a que después de 4 o más meses de almacenada en el tratamiento cinco, la semilla ya estaba muerta y no respiraba.

La baja germinación registrada a 23.8 °C y 81.4% HR, se atribuye a las alteraciones en las membranas, ya que en estas condiciones hubo mayor pérdida de solutos puesto que la solución de imbibición presentó mayor conductividad eléctrica; dicha conductividad mide de forma indirecta la integridad de las membranas. En los demás ambientes no se observó una tendencia clara en la conductividad eléctrica, pues entre ellos no hubo diferencias significativas. Esto podría indicar que la prueba es un buen parámetro para medir el grado de deterioro de la semilla, ya que cuando las semillas son puestas a embeber ocurre lixiviación de solutos hacia el medio líquido, de modo que habría mayor deterioro de las membranas cuanto más solutos lixivien. De

Souza *et al.* (2003) reportaron que las membranas celulares son las primeras estructuras en exhibir las alteraciones degenerativas que caracterizan al deterioro de semillas, y pueden acarrear la lixiviación de azúcares, aminoácidos, electrolitos y otras sustancias solubles en agua. También Parrish y Leopold (1978) afirmaron que el incremento de solutos en el agua de imbibición al extenderse el tiempo de almacenamiento, puede ser resultado de una membrana más permeable.

Cuadro 2. Ambientes de almacenamiento (temperatura y humedad relativa) evaluados en semillas de tomate de cáscara.

T	HR	V	G	Vrad	Vpa	R	CE	CH
18.2 ± 5	41.2 ± 10	81.44 a	69.83 a	20.39 a	6.30 a	16.13 a	32.01 b	5.70 bc
5.3 ± 0.4	81.4 ± 2.9	79.67 a	66.28 a	19.26 a	5.80 a	15.03 a	34.48 b	7.37 b
23.8 ± 0.3	24.1 ± 0.8	78.00 a	65.83 a	19.04 a	5.91 a	15.15 a	36.80 b	2.69 c
5.3 ± 0.4	24.1 ± 0.8	77.56 a	64.94 a	19.42 a	5.81 a	14.93 a	37.42 b	3.85 c
23.8 ± 0.3	81.4 ± 2.9	46.00 b	29.28 b	9.88 b	2.29 b	6.63 b	97.14 a	15.17 a

Medias con letras iguales entre hileras no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05).

T=temperatura (°C); HR=humedad relativa (%); V=viabilidad (%); G=germinación(%); Vrad=velocidad de emergencia de radícula (radículas.día⁻¹); Vpa=velocidad de parte aérea (plántulas.día⁻¹); R=respiración (nmol CO₂ g⁻¹ s⁻¹); CE=conductividad eléctrica (μs cm⁻¹g⁻¹); CH=contenido de humedad de la semilla (%).

Los resultados también permiten inferir que con sílica gel y cuartos fríos se puede lograr las mejores condiciones de almacenamiento; esto sería suficiente para conservar la calidad fisiológica de las semillas de tomate de cáscara.

En cuanto al estado de desarrollo de la semilla (Cuadro 3), se observó que las semillas inmaduras de 45 d ya poseen capacidad de germinar, aunque 10% menos que la semilla madura; además, esta semilla inmadura también posee menor vigor que las

semillas maduras de 55 o 65 DPP. Esto coincide parcialmente con lo señalado por Martínez *et al.* (2004) quienes indicaron que el mayor porcentaje de germinación en semillas de tomate de cáscara se alcanza a los 63 DPP. Un comportamiento similar fue observado por Modi y White (2004) en semillas de tomate Cherry, cuya germinación evolucionó de 5, 38, 68 a 72%, a los 14, 28, 42 y 56 DPP, respectivamente. Por tanto, sólo hasta después de los 45 d la semilla puede ser extraída del fruto para lograr alta germinabilidad (>74%).

Cuadro 3. Efecto del estado de desarrollo (45, 55 y 65 DPP) de la semilla de tomate de cáscara.

	V	G	Vrad	Vpa	R	CE	CH
65 DPP	77.43 a	61.83 a	17.02 ab	5.27 ab	14.03 ab	44.30 a	6.96 a
55 DPP	74.33 a	63.23 a	19.95 a	5.79 a	14.35 a	45.10 a	6.96 a
45 DPP	65.83 b	52.63 b	15.82 b	4.61 b	12.34 b	53.31 a	6.96 a

Medias con letras iguales entre hileras no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05).

DPP=días post-polinización; V=viabilidad (%); G=germinación(%); Vrad=velocidad de emergencia de radícula (radículas.día⁻¹); Vpa=velocidad de parte aérea (plántulas.día⁻¹); R=respiración (nmol CO₂ g⁻¹ s⁻¹); CE=conductividad eléctrica (µscm⁻¹g⁻¹); CH=contenido de humedad de la semilla (%).

La germinación y la viabilidad fueron iguales en las cosechas a los 55 y 65 DDP, edades en las que tampoco hubo diferencias significativas en conductividad eléctrica y contenido de humedad de la semilla. Sin embargo, debe considerarse que el contenido de humedad aquí reportado no es el del momento de cosecha sino después de secar el ambiente.

En cuanto al efecto del tiempo de almacenamiento (Cuadro 4), se observó que el almacenamiento de 4 y 8 meses redujo la germinabilidad en 33 y 22% y la viabilidad en

16 y 21%; también duplicó la conductividad eléctrica y elevó en 2 a 2.5% el contenido de humedad de la semilla. Al duplicar el almacenamiento de 4 a 8 meses se abatió la germinación, la viabilidad, la velocidad de emergencia de radícula y respiración, sin afectar la velocidad de la parte aérea.

Las tasas de respiración decrecieron conforme se incrementó el tiempo de almacenamiento (Cuadro 4). Dichas reducciones coinciden con los decrementos en germinación y vigor discutidos anteriormente, lo que sugiere que durante el deterioro también se afectaron las mitocondrias y su función respiratoria, con las consecuentes reducciones en la producción de la energía necesaria para la elongación del eje embrionario, como lo señalaron Ferguson *et al.* (1990). Woodstock *et al.* (1984) midieron la respiración de embriones de soya (*Glycine max* L) con alto y bajo vigor después de 4 y 24 h de imbibición, y encontraron menores tasas respiratorias en embriones de bajo vigor en ambos periodos de imbibición, lo que también asociaron con reducciones en la cantidad y eficiencia de las mitocondrias.

Cuadro 4. Efecto del tiempo de almacenamiento (0, 4 y 8 meses) de la semilla de tomate de cáscara.

	V	G	Vrad	Vpa	R	CE	CH
0 meses	85.33 a	77.83 a	23.90 a	6.24 a	17.63 a	26.60 b	5.42 b
4 meses	68.80 b	44.33 c	17.76 b	2.76 b	12.61 b	57.72 a	7.90 a
8 meses	63.47 c	55.53 b	11.12 c	6.68 a	10.49 c	58.40 a	7.54 a

Medias con letras iguales entre hileras no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05).

V=viabilidad (%); G=germinación(%); Vrad=velocidad de emergencia de radícula (radículas.día⁻¹); Vpa=velocidad de parte aérea (plántulas.día⁻¹); R=respiración (nmol CO₂ g⁻¹ s⁻¹); CE=conductividad eléctrica (μscm⁻¹g⁻¹); CH=contenido de humedad de la semilla (%).

En cuanto a las interacciones de las diferentes variables evaluadas (Cuadros A1.1 al 6 del anexo), se observó que éstas presentan poca importancia debido a que su porcentaje es bajo (columna 4), a excepción de la interacción entre ambientes y tiempo de almacenamiento.

La combinación de 23.8 °C, 81.4% HR y 8 meses de almacenamiento redujo la capacidad germinativa, viabilidad, respiración, velocidad de parte aérea y velocidad de emergencia de radícula de las semillas de tomate de cáscara, efecto que se asoció con una mayor conductividad eléctrica (Cuadro 5).

Cuadro 5. Interacción entre ambientes y tiempo de almacenamiento

T	HR	TIEMPO	V	G	Vrad	Vpa	R	CE	CH
18.2 ± 5	41.2 ± 10	8 meses	74.00 A	64 A	15.18 AB	7.22 A	14.52 A	41.5 B	11.46 A
18.2 ± 5	41.2 ± 10	4 meses	74.16 A	57.33 A	20.89 A	3.89 BC	13.43 A	43.59 B	6.81 A
18.2 ± 5	41.2 ± 10	0 meses	83.66 A	77.33 A	21.77 A	7.02 AB	17.52 A	28.92 B	5.76 A
5.3 ± 0.4	24.1 ± 0.8	8 meses	72.00 AB	61.00 A	14.65 AB	6.45 AB	14.29 A	45.14 B	5.13 A
5.3 ± 0.4	24.1 ± 0.8	4 meses	77.33 A	60.16 A	21.79 A	4.16 ABC	13.65 A	37.72 B	5.15 A
5.3 ± 0.4	24.1 ± 0.8	0 meses	85.33 A	79.00 A	21.87 A	7.16 A	17.90 A	26.6 B	4.47 A
5.3 ± 0.4	81.4 ± 2.9	8 meses	75.33 A	66.00 A	15.62 AB	6.70 AB	14.98 A	40.51 B	4.97 A
5.3 ± 0.4	81.4 ± 2.9	4 meses	80.00 A	56.83 A	21.22 A	3.89 BC	12.90 A	34.02 B	6.60 A
5.3 ± 0.4	81.4 ± 2.9	0 meses	82.66 A	75.66 A	21.45 A	6.59 AB	17.14 A	30.31 B	6.50 A
23.8 ± 0.3	24.1 ± 0.8	8 meses	74.66 A	64.00 A	14.31 AB	7.19 A	14.52 A	41.43 B	4.68 A
23.8 ± 0.3	24.1 ± 0.8	4 meses	75.66 A	56.16 A	20.82 A	3.91 BC	13.41 A	40.04 B	4.41 A
23.8 ± 0.3	24.1 ± 0.8	0 meses	75.00 A	65.00 A	19.43 A	5.28 AB	14.72 A	45.35 B	3.34 A
23.8 ± 0.3	81.4 ± 2.9	8 meses	22.33 C	6.00 B	3.63 C	0.37 D	1.94 B	126.54 A	11.2 A
23.8 ± 0.3	81.4 ± 2.9	4 meses	51.00 B	23.16 B	8.84 BC	1.85 CD	5.25 B	104.56 A	14.58 A
23.8 ± 0.3	81.4 ± 2.9	0 meses	84.83 A	76.83 A	22.43 A	6.64 AB	17.4 A	27.29 B	9.23 A

Medias con letras iguales entre hileras no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05).

T=temperatura (°C); HR=humedad relativa (%); V=viabilidad (%); G=germinación(%); Vrad=velocidad de emergencia de radícula (radículas.día⁻¹); Vpa=velocidad de parte aérea (plántulas.día⁻¹); R=respiración (nmol CO₂ g⁻¹ s⁻¹); CE=conductividad eléctrica (µscm⁻¹g⁻¹); CH=contenido de humedad de la semilla (%).

2.4. Conclusiones

Entre los ambientes de almacenamiento evaluados sólo hubo deterioro significativo cuando se combinó la temperatura de 23.8 °C con una alta humedad relativa de 81.4%. Este comportamiento provocó disminución en viabilidad, germinación y respiración de la semilla, mientras que la conductividad eléctrica de la solución de imbibición aumentó. El comportamiento anterior se debe a que las elevadas temperatura y humedad relativa incrementaron en tres veces el contenido de humedad de la semilla, de 5.7 a 15.2%. Estos cambios se atribuyen a cambios en el metabolismo, la disminución en la respiración podría resultar en insuficiencia de sustratos respiratorios para la germinación. Por ello se considera que un signo temprano de envejecimiento de la semilla es la disminución significativa de su tasa respiratoria y el deterioro de las membranas.

El almacenamiento de las semillas por 4 y 8 meses redujo la germinabilidad en 33 y 22% y la viabilidad en 16 y 21%; también duplicó la conductividad eléctrica y elevó en 2 a 2.5% el contenido de humedad de la semilla.

En cuanto al estado de desarrollo de la semilla, las semillas inmaduras de 45 d ya poseen capacidad de germinar, aunque 10% menos que la semilla madura. La germinación y la viabilidad fueron iguales en las cosechas a los 55 y 65 DDP, edades en las que tampoco hubo diferencias significativas en conductividad eléctrica y contenido de humedad de la semilla.

2.5. Literatura citada

- Bewley, JD, and M Black. 1994. Seeds, Physiology of Development and Germination. Plenum Press. Second Ed, New York. USA. 445 p.
- Bradford KJ. 2004. Seed production and quality. Department of Vegetable Crop and Weed Science. University of California. Davis, CA. USA. 134 p.
- Copeland OL and MB Mcdonald. 2001. Principles of Seed Science and Technology. 4th edition. Kluwer Press, New York. USA. 488 p.
- Delouche J C. 2002. Germinación, deterioro y vigor de semillas. Seed News 6: 6
- De Souza L, E Lazarini, ME De Sá y WV Valério F. 2003. Armazenamento de sementes de soja dessecadas e avalicao da qualidade fisiologica, bioquimica e sanitaria. Rev. Bra. Sementes 25 (2): 97-105.
- FAO. 1991. Guía para la Manipulación de Semillas Forestales. Estudio FAO-Montes. Roma, Italia. 502 p.
- Ferguson J M, DM Tekrony and DB Egli. 1990. Changes during early soybean seed and axes deterioration. I. Seed quality and mitochondrial respiration. Crop Sci. 30: 175-179.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. International rules for seed testing. Rules 2004. ISTA editions Zurich. Switzerland. 243 p.
- Martinez, SJ, A Peña L y D Montalvo H. 2004. Producción y Tecnología de Semilla de Tomate de Cáscara. Boletín técnico # 4. Programa Nacional de Investigación y Servicio en Olericultura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 36 p.

- Maguire J. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2: 176-177.
- Modi, AT, and BJ White. 2004. Water potential of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) placenta and seed germination in response to desiccation during fruit development. *Seed Sci. Res.* 14: 249-257.
- Palma RMP, HA Lopez y JC Molina M. 2000. Condiciones de almacenamiento y germinación de semillas de *Cenchrus ciliaris* L y *Andropogon gayanus* Kunth. *Agrociencia* 34: 41-48.
- Parrish DJ and AC Leopold. 1978. On the mechanism of ageing in soybean seeds. *Plant Physiol.* 61:365-366.
- Santacruz VA, A Muñoz O, F Castillo G y A Larqué-Saavedra. 1997. Germinación de semillas de maíz, frijol, cacahuate y ajonjolí almacenados en diferentes ambientes y tipos de envases. *Agrociencia* 31: 177-185.
- SAS Institut Inc. 1993. SAS/STAT User's Guide Release 6. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina. USA. 164 p.
- Walters C, LM Hill and LJ Wheeler. 2005. Dying while dry: Kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. *Integrative and Comparative Biology* 45:751–758
- Woodstock LW, K Furman and T Solomos. 1984. Changes in respiratory metabolism during aging in seeds and isolated axes of soybean. *Plant Cell Physiol.* 25: 15-26.

CAPITULO 3. INDICADORES MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS DEL DETERIORO DE SEMILLAS DE TOMATE DE CÁSCARA

Resumen

En México, el tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) ocupa el quinto lugar entre las especies hortícolas, la investigación en esta especie es escasa, en especial la relacionada con el deterioro de la semilla. Por tanto, se estudió el efecto del deterioro por envejecimiento natural en semillas de tomate de cáscara var CHF1-Chapingo, almacenadas 1, 2, 3 y 5 años a 18.2 ± 5 °C y $41.2 \pm 10\%$ de humedad relativa. Después de 5 años, la viabilidad decreció de 84.5 a 50.8%, la velocidad de emergencia de la radícula de 79 a 34.3 radículas d^{-1} , la velocidad de emergencia en arena de 29.1 a 15.3 plántulas d^{-1} y la conductividad eléctrica subió de 31 a 80 $\mu s\ cm^{-1}$. Además, el peso de mil semillas bajó de 1360 a 1140 mg a los 5 años y el peso de 20 plántulas después de 10 d de sembradas disminuyó de 1306 a 876 mg. Las pérdidas en germinación de la semilla aumentaron linealmente al aumentar el tiempo de almacenamiento, con una tasa de reducción de 8.7% anual. La semilla de tomate de cáscara sólo se puede conservar en esas condiciones por 3 años con un vigor medio y 65.8% de germinación, y sólo por un año con un alto vigor y 80% germinabilidad.

Palabras clave: *Physalis ixocarpa*, deterioro de semillas, germinación, respiración, vigor, membranas celulares

3.1. Introducción

Durante el almacenamiento se presentan mecanismos que deterioran la semilla, que disminuyen el porcentaje de germinación, la velocidad de crecimiento de la plántula y la tolerancia a condiciones adversas (Bradford, 2004). Otros síntomas de la semilla deteriorada incluyen: crecimiento anormal, daños en estructuras principales de las plántulas, pérdida de compuestos solubles debido a excesiva permeabilidad de la membrana, reducción de la actividad enzimática, daño oxidativo al ADN y a las proteínas y producción de sustancias tóxicas como ácidos grasos libres (Basavarajappa *et al.*, 1991). La generación de radicales libres y la peroxidación de lípidos daña la integridad física de las membranas que, a su vez, causa pérdida de compartimentación celular y la expulsión de solutos (Bradford, 2004).

El deterioro de la semilla está asociado con cambios en su metabolismo; por ejemplo, la disminución de carbohidratos que ocurre con la edad de la semilla podría resultar en insuficiencia de sustratos respiratorios para la germinación o en la incapacidad para usarlos; así, un signo del deterioro de la semilla es una disminución significativa de su tasa respiratoria (Bernal y Leopold, 1992; Cruz-Pérez *et al.*, 2003). La relación entre la actividad respiratoria de una semilla durante las primeras horas de germinación y su estado de deterioro es difícil de establecer, pero dicha relación se aprecia más claramente después de la emergencia de la radícula (Cruz-Pérez *et al.*, 2003).

México es centro de origen de las especies del género *Physalis*, las cuales forman parte de sus platillos desde épocas precolombinas, sobre todo en forma de salsas y ensaladas. La superficie cosechada de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*

Brot) ha aumentado desde 1932, adquirió importancia en la década de los setenta y desde los ochenta se exporta en fresco o industrializado a los EE. UU. (Pérez y Granados, 2001). En México, el tomate de cáscara ocupa el quinto lugar entre las especies hortícolas, con una superficie sembrada en 2003 de 48,639 ha distribuidas en 26 Estados, con un rendimiento medio de 12.362 t ha⁻¹ (SAGARPA, 2003).

La investigación en esta especie es escasa, en especial la relacionada con los aspectos que determinan la calidad de la semilla y su deterioro; empíricamente se calcula que por cada año de almacenamiento la semilla pierde hasta 20% de su germinación. Este aspecto es importante en los programas de mejoramiento genético y de conservación de germoplasma. El conocimiento detallado de las características morfológicas y fisiológicas de la semilla de esta especie podría ayudar a identificar los factores involucrados en su deterioro. Por ello, el objetivo de este trabajo fue cuantificar el efecto del envejecimiento de la semilla de tomate de cáscara almacenada en condiciones naturales sobre sus características de germinación, vigor, disponibilidad de reservas, respiración, integridad y permeabilidad de membranas.

3.2. Materiales y métodos

En el estudio se usó semilla de tomate de cáscara de la variedad CHF1-Chapingo, producida durante el temporal en primavera-verano de los años 2000, 2002, 2003 y 2004 (equivalentes a 5, 3, 2 y 1 años de almacenamiento) en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, en Texcoco, Edo. de México, a 2250 m de altitud. El manejo del cultivo fue el mismo en cada año de producción; transplante a campo abierto en la primera semana de abril, a una densidad de

población de 30 000 plantas ha^{-1} y cosecha de semilla en la segunda semana de junio. La semilla cosechada se secó al ambiente durante dos semanas, se limpió en una mesa de gravedad (Seedburo Inc., EE. UU.) y se almacenó en botes de aluminio abiertos en una bodega sin control de clima (18.2 ± 5 °C; $41.2 \pm 10\%$ humedad relativa).

Experimentos y variables medidas

Los análisis de calidad física, fisiológica, cinética de imbibición, respiración, y permeabilidad de las membranas de semillas se hicieron en mayo y junio de 2005 en los laboratorios de Análisis de Semillas, Fisiotecnia y Microscopia Electrónica del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Edo. de México. Los tratamientos fueron las cuatro edades de la semilla tomada de lotes mediante muestreos independientes, se utilizaron 100 semillas por parcela que se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones.

Características físicas de las semillas

El porcentaje de humedad de la semilla se calculó con la fórmula de Bewley y Black (1994). Las semillas se deshidrataron 72 h a 72 °C en una estufa (Thelco 31480, EE. UU.) y después se determinó el peso de la biomasa seca.

Para obtener el peso de mil semillas (P1000S), se aplicó el procedimiento estándar propuesto por la ISTA (2004), se usaron ocho repeticiones, de 100 semillas, las cuales se pesaron en una balanza Ohaus (Pine Brook, China), con precisión de 0.001 g.

Calidad fisiológica de semillas

Para la prueba de germinación, las semillas se depositaron en cajas petri con papel filtro humedecido y se colocaron en una germinadora SD8900 (Seedburo Inc., EE. UU.) a 25 ± 1 °C en oscuridad, por 8 días (d), según las normas de la ISTA (2004). Se midió la velocidad de emergencia de radícula (VERad) con la fórmula de Maguire (1962) que consiste en contabilizar cada 24 h el número de radículas emergidas. También se midieron, al final de la prueba, los porcentajes de germinación (G) y viabilidad (Vi) que considera el número de plántulas normales y plántulas anormales.

Para evaluar el vigor de la semilla de los lotes, se utilizó la prueba de velocidad de emergencia en arena. Las semillas se sembraron en un semillero con arena esterilizada a 1 cm de profundidad a humedad a saturación. Cada 24 h se registraron las plántulas emergidas, y la velocidad de emergencia de plántulas (VEA) se calculó con la fórmula de Maguire (1962). Al final de la prueba (10 d después de la siembra) se evaluó el porcentaje de emergencia (PE). Se secaron 20 plantas tomadas al azar por repetición en una estufa modelo 31480 (Thelco, EE. UU.) y se pesaron sus biomásas secas (PS, en mg).

Cinética de imbibición y respiración

Para evaluar la cinética de imbibición (CI) se colocaron al azar las 100 semillas en cajas petri cada 24 h durante 7 d y en cada muestreo se pesó la biomasa fresca y seca para calcular el contenido de humedad. Los resultados se graficaron para obtener la curva de cinética de imbibición durante la germinación.

Antes de secar las semillas, se midió la actividad respiratoria de la semilla ($\text{nmol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$) en cada repetición con un aparato de fotosíntesis CI-301PS (CID Inc., Canadá) y se calculó el promedio de la tasa de respiración por tratamiento.

Permeabilidad de las membranas

El efecto de los años de almacenamiento en la permeabilidad de las membranas celulares se determinó en la solución de imbibición de las semillas mediante: conductividad eléctrica (CE) y potencial osmótico. La CE ($\mu\text{scm}^{-1} \text{ g}^{-1}$) se midió en las semillas que se pesaron y colocaron en 60 mL de agua desionizada a 25 °C durante 24 h, con un aparato de conductividad Modelo 72729 (Oakton, Singapur).

El potencial osmótico se midió en cuatro repeticiones de 200 semillas tomadas al azar en 2 mL de agua desionizada a 24 °C por 24 h, con un osmómetro calibrado de presión de vapor modelo 5500 (Wescor Inc., EE. UU.). Los resultados se convirtieron en MPa según la fórmula de Van't Hoff (1887, citado por Salisbury y Ross, 1994).

Análisis estadístico de los datos

En todas las variables se obtuvieron promedios y desviaciones estándar por tratamiento en Microsoft Excel 2003. De tales promedios se obtuvieron curvas polinomiales mediante el programa Model Maker.

Estudio histológico de las membranas

Para observar las membranas en el microscopio electrónico, se imbibieron 20 semillas al azar por tratamiento en agua por 24 h. Se fijaron muestras de tejido en una

solución de glutaraldehído a 25% y amortiguador fosfato 0.1 M, a pH de 7.1; el tiempo de fijación fue 30 min a 4 °C. Las resinas se prepararon con dióxido de vinilciclohexano, ether diglicidil de polipropilenglicol, anhídrido succínico nonenil y dimetilaminoetanol. Para los cortes (60 a 90 nm espesor) se usó un ultramicrotomo Reichert (Mod 570, Austria) con navaja de diamante; la tinción se hizo con acetato de uranilo y citrato de plomo y las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss (EM9, Alemania) y las imágenes se imprimieron en película Kodak 4489 electrón 7 x 7 cm (EE. UU.).

3.3. Resultados y discusión

Efecto del deterioro en la germinación y vigor de la semilla

El contenido de humedad no varió entre edades de la semilla, lo cual significa que todas estuvieron en equilibrio con el ambiente; su valor promedio fue 5.2% que se considera bajo y que no interviene en el proceso de la evolución de las otras variables medidas. En cambio, todas las variables de germinación y vigor disminuyeron linealmente durante los años de almacenamiento, como lo evidencian tasas constantes de deterioro, excepto en el peso seco de la plántula (Figura 1). Todos los modelos lineales presentaron un alto grado de ajuste ($R^2 > 0.97$), o sea que fueron confiables para predicción en las condiciones experimentales; además, son inéditos en esta especie.

Estos resultados concuerdan con Delouche (2002) quien señaló que la semilla de cualquier especie presenta su más alto nivel de vigor y potencial germinativo al alcanzar la madurez fisiológica, a partir de la cual se inicia un proceso continuo e

irreversible de deterioro hasta perder su capacidad germinativa. Así, el deterioro de una semilla se podría entender como una serie de cambios con tiempo, que afecta funciones vitales y su desempeño, hasta causar su muerte (Bradford, 2004).

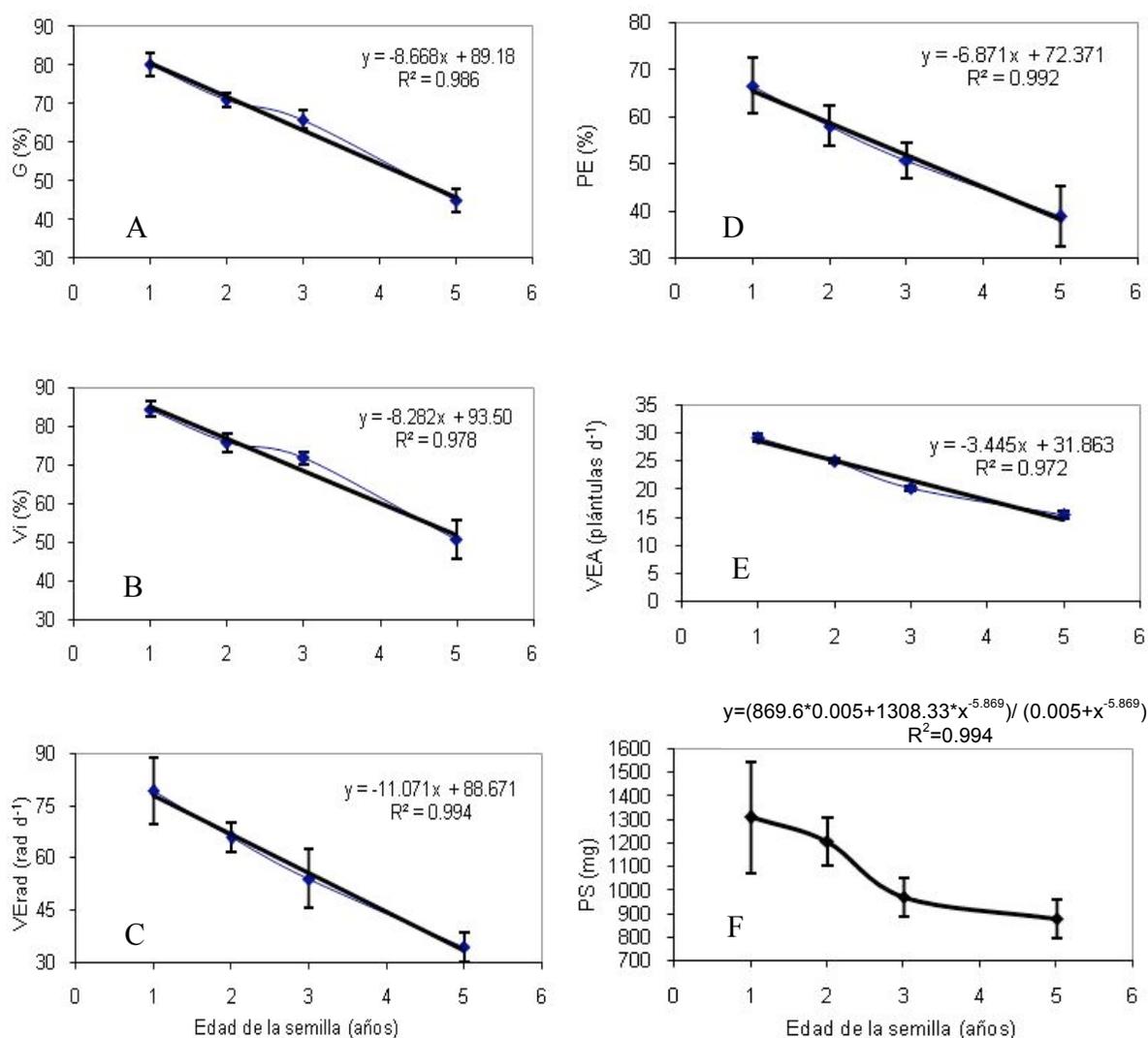


Figura 1. Efecto de la edad de la semilla en variables de germinación (A-C) y de vigor (D-F) del tomate de cáscara. El almacenamiento de la semilla se hizo durante 1, 2, 3 y 5 años, a 18.2 °C y 41.2% de humedad relativa. G=germinación, Vi=viabilidad, PE=porcentaje de emergencia en arena, VERad=velocidad de emergencia de radícula, VEA=Velocidad de emergencia en arena, PS=peso seco de 20 plántulas. Las barras indican error estándar (n = 4).

La germinación que se inició con un valor estimado de 89% a la cosecha tuvo una tasa de pérdida de 8.7% por año en las condiciones experimentales (Figura 1A y Cuadro 1), esto significa que en dos años, las semillas de tomate de cáscara reducen su germinabilidad en cerca de 30%, lo que probablemente significaría baja emergencia en campo.

Para el mismo lote de semillas se calculó un valor de viabilidad inicial a la cosecha de 93.5% y una tasa anual de pérdida de 8.3% (Figura 1B y Cuadro 1). De esta manera, alrededor de 5% de las semillas vivas no germinan en una plántula normal en las condiciones de una prueba estándar de germinación. Así, la tasa de pérdida de viabilidad fue ligeramente menor que la de germinación.

Cuadro 1. Tasa anual de reducción y valor estimado al momento de cosecha de las variables de calidad fisiológica de semilla de tomate de cáscara.

Variable	Tasa anual de reducción (%)	Valor calculado al momento de cosecha
Germinación (%)	8.7	89.2
Viabilidad (%)	8.3	93.5
Emergencia de plántula en arena (%)	6.9	72.4
Velocidad de emergencia en arena (plántulas d ⁻¹)	3.4	31.9
Velocidad de emergencia de radícula (radículas d ⁻¹)	11.1	88.7

En la evaluación de la germinación en arena para medir el porcentaje de emergencia (PE), se estimó un valor inicial a la cosecha de 72.4% (Cuadro 1). Es decir, la germinabilidad en este sustrato fue 17% inferior a la germinación estándar; pero la tasa de pérdida anual en emergencia fue 6.9%, menor que las tasas de pérdida en germinación y viabilidad (Cuadro 1). Las diferencias entre germinación y emergencia son provocadas porque las condiciones de la prueba de germinación son más estables (25 ± 1 °C) que las del semillero donde se hizo la prueba de vigor (21.4 ± 10.4 °C). Además, en arena la plántula debe vencer la resistencia del sustrato, ya que en el

semillero se sembró a una profundidad de 1 cm y las plántulas tuvieron que crecer más para poder ser registrados como emergidas (Bradford, 2004). Finalmente, el envejecimiento también causó pérdidas en el peso seco de plántulas derivadas de la semilla (Figura 1F) pero no lineales como en los casos anteriores, sino que hubo un mayor deterioro entre el segundo y tercer año de almacenamiento que en los demás años.

Contenido de reservas de la semilla

El peso de 1000 semillas (P1000S) de tomate de cáscara disminuyó exponencialmente (Figura 2); así, la mayor reducción ocurrió en los primeros dos años. Según el modelo matemático, al momento de la cosecha el P1000S debió ser 1846.3 mg, lo cual significa que en dos años perdió 35% de sus reservas; tal reducción debió causar la disminución de 20% en el peso seco de la plántula, entre el segundo y tercer año de edad, como se mostró en la Figura 1F.

Según Copeland y McDonald (2001), una causa de la pérdida de germinación en lotes almacenados durante varios años, es el consumo de reservas de la semilla. Asimismo, Basavarajappa *et al.* (1991) obtuvieron que durante el envejecimiento natural de la semilla de maíz se reduce el contenido total de reservas, como carbohidratos y proteínas, y esta es una causa importante de que el crecimiento y desarrollo de la nueva plántula sean afectados al avanzar el proceso de deterioro de la semilla. Sin embargo, Cruz-Pérez *et al.* (2003) detectaron en semillas de maíz que al no haber cambios significativos en el peso seco del endospermo, las reducciones de reservas no siempre ocurren.

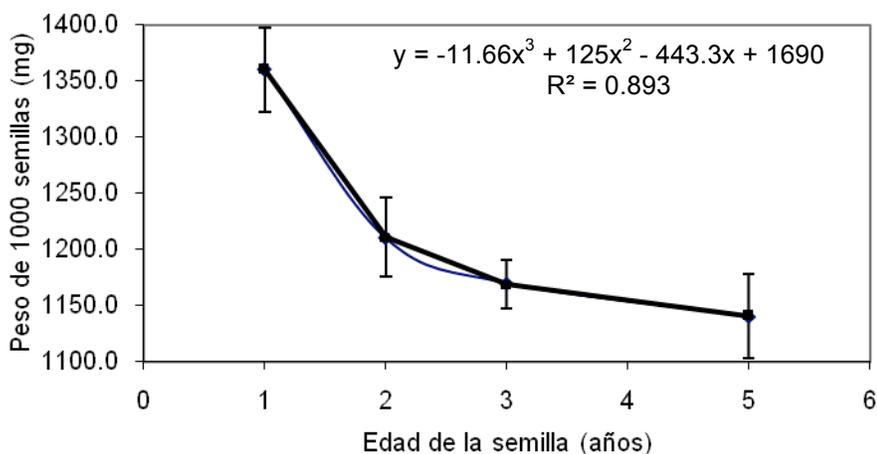


Figura 2. Peso de 1000 semillas de tomate de cáscara almacenadas durante 1, 2, 3 y 5 años a 18.2 °C y 41.2% de humedad relativa. Las barras indican error estándar (n = 4).

Otra variable relacionada con el vigor de la semilla es la respiración, la cual es controlada por la cantidad de sustratos respirables como los glúcidos (Lambers *et al.*, 1991). En tomate de cáscara se observó que las semillas secas (antes de ser embebidas) de todos los tratamientos presentaron una tasa promedio de 1.1 nmol CO₂ g⁻¹ s⁻¹, sin diferencias estadísticas entre años de almacenamiento (datos no mostrados), mientras que el promedio de la respiración de las semillas a los 6 d de iniciada la imbibición fue 11.1 nmol CO₂ g⁻¹ s⁻¹ (Figura 3), debido a la reactivación del metabolismo. Entonces, durante el almacenamiento las semillas estaban respirando a tasas equivalentes al 10% respecto a la respiración alcanzada al sexto día de iniciada la imbibición.

Además, el almacenamiento redujo la tasa respiratoria de semillas medida en el día 6 de iniciada la imbibición, con una tendencia de sigmoideal inversa (Figura 3), ya que en el año 5 la tasa respiratoria fue sólo 46% de la tasa mostrada en semillas de 1 o 2 años; esta cinética respiratoria también muestra que desciende después de los 2

años de edad de la semilla, lo cual sugiere que la tasa respiratoria se afectó cuando las reservas de la semilla se redujeron en 35%, es decir, cuando cada semilla pesó menos de 1.25 mg (Figura 2), considerando el peso de la semilla como un indicador de su contenido de reservas.

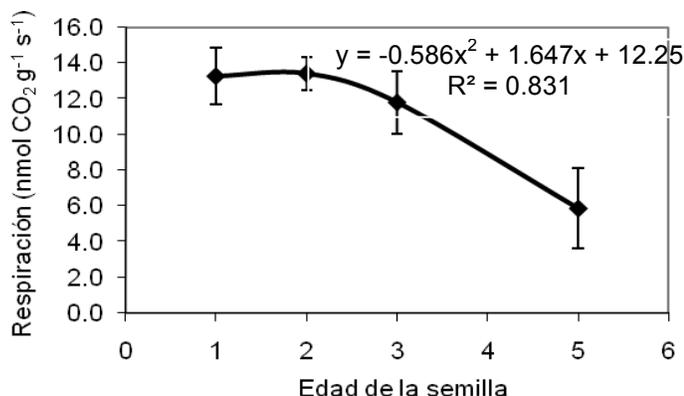


Figura 3. Cinética respiratoria de semillas de tomate de cáscara almacenadas durante 1, 2, 3 y 5 años a 18.2 °C y 41.2 % de humedad relativa, al sexto día del inicio de imbibición. Las barras indican error estándar (n = 3).

La respiración de la semilla provee energía requerida para la germinación (De Viseer *et al.*, 1990; Stewart *et al.*, 1990) y su intensidad depende de la funcionalidad de las mitocondrias (Morohashi *et al.*, 1981; Bewley y Black, 1994); por ello, las semillas vigorosas requieren mayor aporte energético que las no vigorosas (Ram y Wiesner, 1988). Puesto que en el presente estudio la respiración no se midió directamente en mitocondrias aisladas, no se puede saber si la disminución en la respiración por envejecimiento de la semilla podría deberse a anomalías en el aprovechamiento de las reservas usadas como sustratos, a la disponibilidad de éstas o al estado físico y fisiológico de las mitocondrias. Ferguson *et al.* (1990) también observaron que el deterioro de la semilla de soya (*Glycine max* L) redujo la tasa respiratoria y la velocidad

de emergencia de radícula, respuestas que se asociaron con la disminución del vigor de la semilla.

Además se encontró que conforme la semilla del tomate de cáscara envejecía, la radícula tardaba más en emerger, en particular al envejecer de 3 a 5 años (Figura 4).

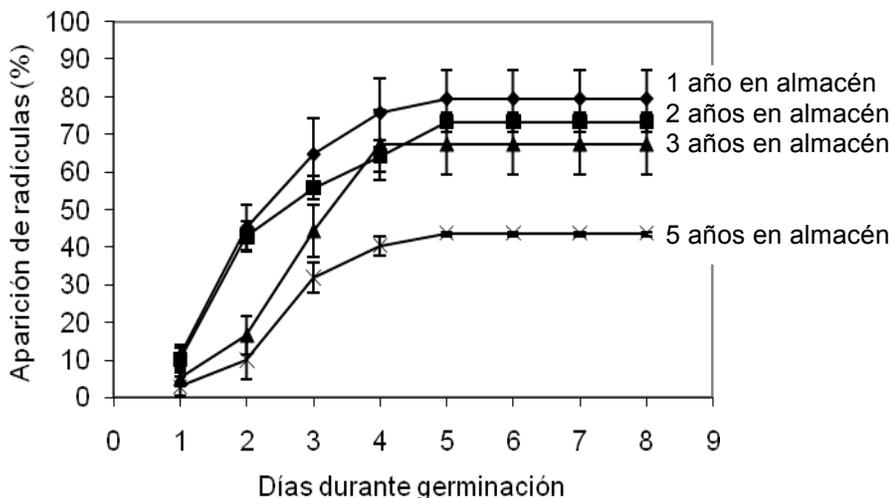


Figura 4. Cinéticas de aparición de radículas de semillas de tomate de cáscara con 1, 2, 3 y 5 años de almacenamiento a 18.2 °C y 41.2% de humedad relativa almacen, durante 8 d. Las barras indican error estándar (n = 4).

Permeabilidad de membranas y cinética de imbibición

La conductividad eléctrica (CE) de la solución de imbibición aumentó linealmente con la edad de las semillas a una tasa de $12.55 \mu\text{scm}^{-1}\text{g}^{-1}\text{año}^{-1}$ (Figura 5A), a la vez que el potencial osmótico (PO) de dicha solución decrecía a una tasa de $0.43 \text{ MPa año}^{-1}$. La pérdida de vigor se ha asociado con una permeabilidad creciente de las membranas celulares, y los lotes de semillas que muestran una alta germinación en laboratorio pero liberan grandes cantidades de electrolitos son considerados de bajo vigor en condiciones de estrés; por ello la CE se ha aceptado como indicador del vigor en semillas de algunas especies. En pepino (*Cucumis sativa* L.), por ejemplo, la

pérdida de viabilidad de semillas envejecidas a 38 °C y 100% humedad relativa, estuvo asociada con el aumento de la CE y la peroxidación de lípidos de la membrana (Smith y Berjak, 1995). Tanto el aumento en CE como la reducción en PO se consideran evidencias de un incremento en la permeabilidad de las membranas celulares de la semilla, y ello representaría pérdida de integridad fisiológica o física de las mismas. Según Bewley y Black (1994), la falta de integridad de las membranas en semillas se debe a una disminución de fosfolípidos, carbohidratos y proteínas, así como a la reducción en la actividad de la peroxidasa, durante el secado que ocurre en la maduración.

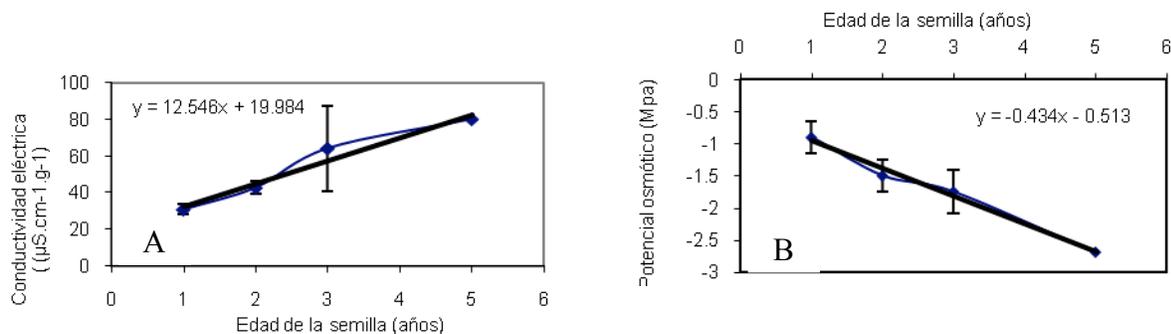


Figura 5. Conductividad eléctrica y potencial osmótico de la solución de imbibición durante 24 h de semillas de tomate de cáscara con 1, 2, 3 y 5 años de almacenamiento a 18.2 °C y 41.2% de humedad relativa. Las barras indican error estándar (n = 4).

La cinética de imbibición no mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las edades de la semilla de tomate de cáscara (Figura 6), lo que denota que no hubo diferencias de hidratación entre las semillas viejas y nuevas. En contraste, Cruz *et al.* (1995) observaron una relación directa entre la cinética de imbibición y el deterioro en semilla de maíz (*Zea mays* L). Según Gatica *et al.* (1995) y Cruz *et al.* (1995), la

absorción de agua presenta una cinética trifásica en las semillas de diferentes especies. En tomate de cáscara sólo se encontraron dos fases: la primera de las 0 a las 24 h y se llega a un máximo de absorción; la segunda inició a las 24 h y el contenido de humedad de la semilla tendió a mantenerse constante. Es posible que la primera fase de absorción de agua no se haya detectado en este experimento ya que el intervalo de mediciones fue 24 h, y la primera fase ocurre de 8 a las 12 h. Antes de imbibición (0 h), todas las semillas tenían un bajo contenido de agua (5%). La reparación de membranas celulares y del ADN y la síntesis de proteínas que usan los ARNm ocurren durante las primeras 8 a 12 h y, según Bewley (1997), la síntesis de mitocondrias y proteínas ocurre después de las 12 h, mientras que la movilización de reservas de la semilla, el alargamiento y división celular se dan después de 50 h de iniciada la imbibición.

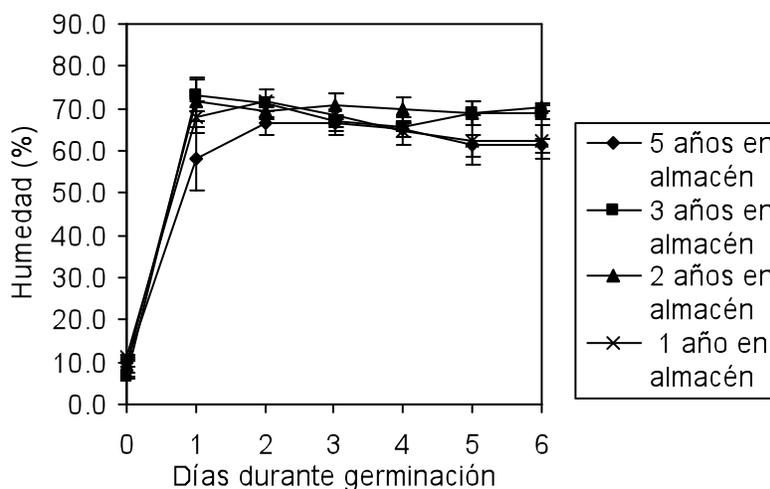


Figura 6. Cinética de imbibición en semillas de tomate de cáscara con 1, 2, 3 y 5 años en almacén, durante 6 días de imbibición. Las barras indican error estándar (n = 4).

Las observaciones histológicas realizadas al microscopio electrónico no evidenciaron diferencias anatómicas significativas de las membranas entre los

diferentes tratamientos (Figura 7), pues en semillas nuevas (Figura 7a) y viejas (Figura 7b) se detectaron poros en la membrana celular discontinua en frecuencias similares. Lo anterior contrasta con lo señalado por Robert y Sherlie (1985) quienes afirmaron que en semillas de soya existe una ruptura de membranas ocasionada por el envejecimiento de las semillas. En tomate de cáscara, la integridad física de las membranas y paredes celulares en la semilla no sufrió cambios observables conforme el periodo de almacenamiento se incrementó hasta 5 años. Es decir, el deterioro de la semilla de tomate de cáscara no se debió al daño físico de membranas de la semilla, pero sí a su mayor permeabilidad a los solutos debida posiblemente a la peroxidación de los lípidos de las membranas, observada en semillas de especies como maíz, cebolla y berenjena (McDonald, 2000).

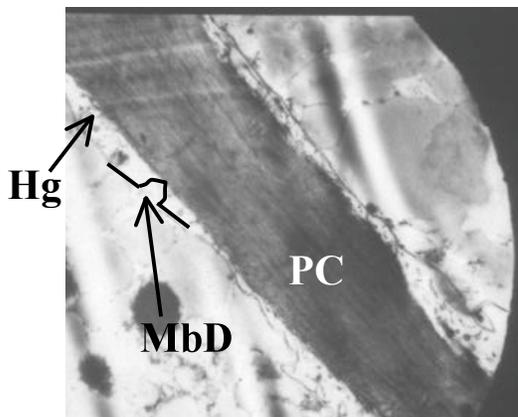


Figura 7a. Un año de edad

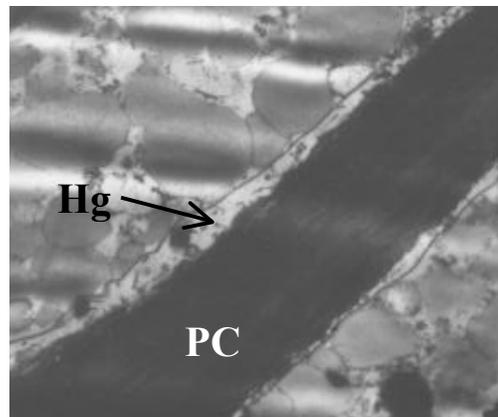


Figura 7b. Cinco años de edad

Figura 7. Observaciones al microscopio electrónico de transmisión de cortes de tejidos seminales de semilla de tomate de cascara almacenadas durante uno y cinco años a 18.2 ± 5 °C de temperatura y $41.2 \pm 10\%$ de humedad relativa. No existieron diferencias significativas entre los años de almacenamiento estudiados. Algunas peculiaridades se encuentran señaladas: MbD=membrana celular discontinua, Hg=hongos saprófitos, PC=pared celular.

3.4. Conclusiones

Las condiciones en las cuales la semilla de tomate de cáscara fue almacenada a 18.2 ± 5 °C de temperatura y $41.2 \pm 10\%$ humedad relativa causaron deterioro y reducciones en la germinación (8.7% anual), viabilidad (8.3% anual) y emergencia de plántula en arena (6.9% anual). Dichas reducciones se pueden explicar por la disminución de las reservas, la disminución de la energía disponible para los procesos de crecimiento y daños en las membranas celulares. En el caso de la disminución de reservas, la variable peso de mil semillas perdió 35% de su valor en los primeros dos años y la respiración sólo fue afectada hasta el 3er año de almacenamiento.

En cuanto a los daños ocasionados en la membrana por el deterioro, se encontró que la conductividad eléctrica de la solución de imbibición aumentó en $12.5 \mu\text{s cm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ año}^{-1}$ y el potencial osmótico disminuyó en $0.43 \text{ Mpa año}^{-1}$; sin embargo, no hubo diferencias entre edades de la semilla en la cinética de imbibición y en la integridad física de estas membranas, por lo tanto, es evidente que el deterioro de las semillas de tomate de cáscara provoca cambios en la composición química de las membranas que permiten escapar solutos.

3.5. Literatura citada

Basavarajappa, B. S., H. S. Shetty and H. S. Prakash. 1991. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Sci. Technol.* 19: 279-286.

Bradford K. J. 2004. *Seed Production and Quality*. Department of Vegetable Crop and Weed Science. University of California. Davis, CA. USA. 134 p.

- Bernal, L. I. and A. C. Leopold. 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiol.* 98: 1207-1210.
- Bewley, J. D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Bewley, J. D. and M. Black. 1994. *Seeds, Physiology of Development and Germination.* Plenum Press. Second Ed, New York. USA. 445 p.
- Copeland, O. L. and M. B. McDonald. 2001. *Principles of Seed Science and Technology.* 4th edition. Kluwer Press, New York. USA. 488 p.
- Cruz, G. F., V. A. González-Hernández, J. C. Molina, M. and J. M. Vázquez, R. 1995. Seed deterioration and respiration as related to DNA metabolism in germinating maize. *Seed Sci. Technol.* 23: 477-486.
- Cruz-Pérez, A. B., V. A. González-Hernández, M. A. Mendoza-Castillo y M. L. Ortega-Delgado. 2003. Marcadores fisiológicos de la tolerancia al envejecimiento de semilla en maíz. *Agrociencia* 37: 371-381.
- Delouche, J. C. 2002. Germinación, deterioro y vigor de semillas. *Seed News* 6: 6
- De Visser, R., H. M. Dekhuijzen and D. R. Verkerke. 1990. Control of seed respiration and growth in *Vicia faba* by oxygen and temperature: No evidence for an oxygen diffusion barrier. *Plant Physiol.* 93: 668-672.
- Ferguson, J. M., D. M. TeKrony and D.B. Egli. 1990. Changes during early soybean seed and axes deterioration: I. Seed quality and mitochondrial respiration. *Crop Sci.* 30: 175-179.
- Gatica, V. M., J. C. Molina M., A. Carballo C. y V. A. González-Hernández. 1995. Tasa respiratoria y vigor de semillas de girasol. *Rev. Fitotecnia Mex.* 18: 25-34.

- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. International Rules for Seed Testing. Rules 2004. ISTA editions, Zurich, Switzerland. 243 p.
- Lambers, H., A. van der Werf and H. Konings. 1991. Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. *In: Plant Roots. The Hidden Half.* Waisei, Y., P. Eshel and U. Kafkaki (eds). Marcel Dekker Inc., New York. USA. pp: 229-263.
- McDonald, M. B. 2000. Seed priming. *In: Seed Technology and its Biological Basis.* Black M. and J. D. Bewley (eds) Sheffield Academic Press, London. England. pp: 287-325.
- Maguire, J. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2: 176.
- Morohashi, Y., J. D. Bewley and E. C. Yeung. 1981. Biogenesis of mitochondria in imbibed peanut cotyledons: Influence of the axis. *J. Exp. Bot.* 32: 605-613.
- Pérez, M., L. y J. Granados A. 2001. Fertilización nitro-fosfórica en tomate de cáscara (*Phisallis ixocarpa* Brot) de riego en Irapuato, Guanajuato, México. *Acta Universitaria* 11: 19-25.
- Ram, C. and L. E. Wiesner. 1988. Effects of artificial ageing on physiological and biochemical parameters of seed quality in wheat. *Seed Sci. Technol.* 16: 579-587.
- Robert, L. T. and H. W. Sherlie. 1985. Reversal of the effects of aging in soybean seeds. *Plant Physiol.* 77: 584–586.
- SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2003. Anuario estadístico de la producción agrícola de Mexico. Centro de Estadística Agropecuaria. SAGARPA. D. F. México. 909 p.

- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1994. Difusión, termodinámica y potencial hídrico. *In:* Fisiología Vegetal. Salisbury F. y C. Ross (eds). Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V. México, D.F. pp: 29-46.
- Smith, M. T. and P. Berjak. 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation - tolerant and desiccation sensitive seeds. *In:* Seed Development and Germination. Kigel J., and G. Galili (eds). Marcel Dekker Inc., New York. USA. pp: 701-746.
- Stewart, R. C., A. Martin, L. Reding and S. Cerwick. 1990. Respiration and alternative oxidase in corn seedling tissues during germination at different temperatures. *Plant Physiol.* 92: 755-760.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

1. Conclusiones

La presente investigación aporta conocimiento sobre varios aspectos relacionados con el desarrollo y deterioro.

Durante el desarrollo de la semilla, el contenido de carbohidratos solubles aumentó de 33 a 118 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco, y el contenido de sacarosa en la semilla se incrementó de 13 a 25 $\mu\text{g g}^{-1}$.

En el metabolismo de la sacarosa, la enzima invertasa ácida tuvo niveles altos de actividad en etapas tempranas del desarrollo de la semilla, y luego fue disminuyendo continuamente para llegar a su mínima actividad a los 55 DPP. En cambio, la enzima sacarosa sintasa resultó indetectable en los primeros 15 DPP, para después incrementar y alcanzar su máxima actividad a los 35 DPP, y luego declinar teniendo niveles muy bajos después de 45 DPP.

Estos resultados evidencian que ambas enzimas sacarosa sintasa e invertasa ácida, están presentes y activas en la semilla de tomate de cáscara, que sirven para metabolizar la sacarosa que se usa en el crecimiento y acumulación de carbohidratos en la semilla, procesos que determinan la germinación y vigor de la semilla.

Entre los ambientes de almacenamiento evaluados sólo hubo deterioro significativo cuando se combinó la temperatura de 23.8 °C con una alta humedad relativa de 81.4%. Este comportamiento provocó disminución en viabilidad, germinación y respiración de la semilla, mientras que la conductividad eléctrica de la solución de imbibición aumentó. El comportamiento anterior se debe a que las elevadas temperatura y humedad relativa incrementaron en tres veces el contenido de humedad

de la semilla, de 5.7 a 15.2%. Estos cambios se atribuyen a cambios en el metabolismo, la disminución en la respiración podría resultar en insuficiencia de sustratos respiratorios para la germinación. Por ello se considera que un signo temprano de envejecimiento de la semilla es la disminución significativa de su tasa respiratoria y el deterioro de las membranas.

Las condiciones en las cuales la semilla de tomate de cáscara fue almacenada a 18.2 ± 5 °C de temperatura y $41.2 \pm 10\%$ humedad relativa causaron deterioro y reducciones en la germinación (8.7% anual), viabilidad (8.3% anual) y emergencia de plántula en arena (6.9% anual). Dichas reducciones se pueden explicar por la disminución de las reservas, la disminución de la energía disponible para los procesos de crecimiento y daños en las membranas celulares. En el caso de la disminución de reservas, la variable peso de mil semillas perdió 35% de su valor en los primeros dos años y la respiración sólo fue afectada hasta el tercer año de almacenamiento.

En cuanto a los daños ocasionados en la membrana por el deterioro, se encontró que la conductividad eléctrica de la solución de imbibición aumentó en $12.5 \mu\text{s cm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ año}^{-1}$ y el potencial osmótico disminuyó en $0.43 \text{ Mpa año}^{-1}$; sin embargo, no hubo diferencias entre edades de la semilla en la cinética de imbibición y en la integridad física de estas membranas, por lo tanto, es evidente que el deterioro de las semillas de tomate de cáscara provoca cambios en la composición química de las membranas que permiten escapar solutos.

2. Recomendaciones

En general esta información sugiere el planteamiento de nuevas líneas de investigación enfocadas a la búsqueda de información sobre el desarrollo y deterioro de las semillas de tomate de cáscara, ya que este cultivo representa un patrimonio cultural y natural para nuestro país.

En cuanto al deterioro será necesario estudiar aspectos relacionados con la estructura lipídica de las membranas para poder explicar la salida de solutos en la semilla imbibida, ya que las observaciones histológicas no muestran un deterioro físico de dichas membranas.

Sobre el desarrollo de la semilla será necesario estudiar en otras variedades y ambientes de producción tanto el desarrollo de la semilla misma como el de sus características de calidad fisiológica. Sobre todo porque existen reportes recientes que contradicen los resultados aquí obtenidos, en cuanto a que la semilla comienza a germinar después de los 35 días después de polinización.

Igualmente estudiar sobre las relaciones fuente-demanda (fruto y semilla) la distribución de carbono asimilado por la planta y su eficiencia productiva; lo anterior será un complemento de los resultados obtenidos en este trabajo sobre la actividad de sacarosa sintasa e invertasa.

ANEXOS

A1. Análisis de varianza correspondiente al capítulo 2. Deterioro artificial de semillas de tomate de cáscara.

Cuadro A1.1. Análisis de varianza de viabilidad en semillas de tomate de cáscara.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados (SC)	% de SC	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
E	2	4328.40	5	2164.20	40.27	0.0001
A	4	32019.02	37	8004.75	148.94	0.0001
T	2	15598.93	18	7799.46	145.12	0.0001
E*A	8	3323.37	4	415.42	7.73	0.0001
E*T	4	831.46	1	207.86	3.87	0.0053
A*T	8	19693.51	23	2461.68	45.80	0.0001
E*A*T	16	2476.08	3	154.75	2.88	0.0005
Total	179	86076.80	100			

E = Edades de la semilla (45, 55 y 65 Días después de polinización); A= Ambientes de almacenamiento (23.8 °C y 81.4% HR; 23.8 °C y 24.1%HR; 5.3 °C y 81.4%HR; 5.3 °C y 24.1%HR y 18.2 °C y 41.2%HR); T= Tiempo de almacenamiento (0, 4 y 8 meses).

Cuadro A1.2. Análisis de varianza de germinación en semillas de tomate de cáscara.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados (SC)	% de SC	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
E	2	3979.20	3	1989.60	31.01	0.0001
A	4	40877.86	36	10219.46	159.30	0.0001
T	2	34899.60	30	17449.80	272.01	0.0001
E*A	8	1866.13	2	233.26	3.64	0.0007
E*T	4	531.20	0	132.80	2.07	0.0883
A*T	8	22179.73	19	2772.46	43.22	0.0001
E*A*T	16	1775.46	2	110.96	1.73	0.0484
Total	179	115002.20	100			

Cuadro A1.3. Análisis de varianza de velocidad de radícula en semillas de tomate de cáscara.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados (SC)	% de SC	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
E	2	541.90	5	270.95	61.17	0.0001
A	4	2715.30	24	678.82	153.25	0.0001
T	2	4901.06	43	2450.53	553.21	0.0001
E*A	8	30.95	0	3.86	0.87	0.5406
E*T	4	984.43	9	246.10	55.56	0.0001
A*T	8	1531.82	13	191.47	43.23	0.0001
E*A*T	16	74.52	1	4.65	1.05	0.4080
Total	179	11384.50	100			

Cuadro A1.4. Análisis de varianza de velocidad de parte aérea en semillas de tomate de cáscara.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados (SC)	% de SC	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
E	2	42.35	3	21.17	22.38	0.0001
A	4	394.06	25	98.51	104.11	0.0001
T	2	553.37	35	276.68	292.40	0.0001
E*A	8	13.51	1	1.68	1.78	0.0854
E*T	4	97.67	6	24.41	25.81	0.0001
A*T	8	321.40	20	40.17	42.46	0.0001
E*A*T	16	14.53	1	0.90	0.96	0.5041
Total	179	1574.07	100			

Cuadro A1.5. Análisis de varianza de respiración en semillas de tomate de cáscara.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados (SC)	% de SC	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
E	2	141.16	2	70.58	22.23	0.0001
A	4	2200.69	38	550.17	173.25	0.0001
T	2	1617.87	28	808.93	254.73	0.0001
E*A	8	73.61	1	9.20	2.90	0.0052
E*T	4	30.09	1	7.52	2.37	0.0558
A*T	8	1160.94	20	145.11	45.70	0.0001
E*A*T	16	80.19	1	5.01	1.58	0.0831
Total	179	5761.84	100			

Cuadro A1.6. Análisis de varianza de conductividad eléctrica en semillas de tomate de cáscara.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados (SC)	% de SC	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
E	2	2986.94	1	1493.47	14.63	0.0001
A	4	111236.86	48	27809.21	272.40	0.0001
T	2	39593.81	17	19796.90	193.92	0.0001
E*A	8	2004.45	1	250.55	2.45	0.0165
E*T	4	850.38	0	212.59	2.08	0.0866
A*T	8	56572.76	24	7071.59	69.27	0.0001
E*A*T	16	2155.96	1	134.74	1.32	0.1942
Total	179	231332.54	100			