



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS**

EXPRESIÓN FISIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL DETERIORO NATURAL Y ARTIFICIAL DE SEMILLAS DE *Physalis ixocarpa* Brot.

JUAN MANUEL PICHARDO GONZÁLEZ

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

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

La presente tesis titulada: **EXPRESIÓN FISIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL DETERIORO NATURAL Y ARTIFICIAL DE SEMILLAS DE *Physalis ixocarpa* Brot.**, realizada por el alumno: Juan Manuel Pichardo González, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

DR. ÓSCAR J. AYALA GARAY

ASESOR:

DR. VÍCTOR A. GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

ASESOR:

DR. J. ALFREDO CARRILLO SALAZAR

ASESOR:

DR. AURELIANO PEÑA LOMELÍ

ASESOR:

DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

ASESOR:

DR. GABINO GARCÍA DE LOS SANTOS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Marzo de 2010

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, gracias por permitirme alcanzar una meta más en la vida y por otorgarme la gracia de vivir.

Al **Colegio de Postgraduados** por ofrecerme la oportunidad de haber logrado una formación académica y por las facilidades otorgadas para realizar la presente tesis.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el financiamiento con la beca que me ha permitido realizar mis estudios de doctorado.

Al **Dr. Oscar Javier Ayala Garay** por su excelente conducción del presente trabajo de tesis como consejero, por sus consejos, asesorías, recomendaciones y su paciencia para llevar el trabajo a buen termino, por su apoyo académico y moral en todo momento y por su entrañable amistad que tengo con él desde la maestría.

Al **Dr. Víctor A. González Hernández** por su valiosa participación como asesor, por la acertada dirección que le dio al presente trabajo gracias a sus excelentes asesorías, sugerencias, recomendaciones y aportaciones en todos los aspectos que contribuyeron en gran medida al buen termino de la presente tesis.

Al **Dr. José Alfredo Carrillo Salazar** por su valiosa participación como asesor, por sus excelentes asesorías, aportaciones, sugerencias y recomendaciones que mejoraron mucho el presente trabajo, sobretodo en los aspectos de modelación del deterioro de semilla, yo quiero agradecerle infinitamente su paciencia que tuvo conmigo.

Al **Dr. Aureliano Peña Lomelí** por su valiosa participación como asesor, por sus recomendaciones y aportaciones al presente documento, por haber proporcionado la semilla de tomate de cáscara con la que se realizó el trabajo de investigación y por las facilidades brindadas en la Universidad Autónoma Chapingo para la realización de la presente tesis.

A la **Dra. Alejandrina Robledo Paz** por su valiosa participación como asesora, por sus valiosas asesorías y acertadas aportaciones al trabajo de tesis que lo mejoraron en gran medida, en especial en los aspectos bioquímicos y fisiológicos del deterioro de semillas.

Al **Dr. Gabino García de los Santos** por su valiosa participación como asesor, por sus valiosas asesorías, recomendaciones y aportaciones que mejoraron la tesis, en especial en los aspectos de calidad, conservación y deterioro de semillas.

Al **Dr. César Mateo Flores Ortiz** de la UNAM, FES-Iztacala por sus valiosas aportaciones, asesorías y recomendaciones, sobretodo en la determinación de ácidos grasos en semillas, y por los apoyos y facilidades que se me brindaron en los laboratorios de la UBIPRO para la realización del trabajo de investigación.

Al **Dr. Ignacio Pérez Camacho** por haberme proporcionado datos e información valiosos que sirvieron para realizar el capítulo de modelación de la presente tesis.

A la **M.C. Claudia Pérez Mendoza** por sus valiosas recomendaciones y aportaciones que ayudaron a mejorar el presente trabajo de tesis.

Al **Ing. Misael Jorge Ayala Villegas** por sus valiosas recomendaciones que ayudaron a mejorar el presente documento.

Al **Programa de Semillas y al Colegio de Postgraduados** por haberme brindado siempre los laboratorios, equipos y materiales necesarios para la investigación.

A los señores **Juan Herrera Hernández y Toribio Dehesa Santillán**, por el apoyo brindado durante el desarrollo de la presente tesis.

DEDICATORIA

**A MIS PADRES:
Cristina González Rangel
Erasmó Pichardo Torres**

Por su amor hacia mis hermanos y a mí, por todas las actividades y esfuerzos que realizan día con día, por los grandes valores que nos han enseñado, por los consejos que siempre me dan para ser mejor persona, por el amor que yo tengo para ellos y por el aliento de superación que siempre me han dado a mi y a mis hermanos.

**A MIS HERMANOS:
Adrián, Elia, Pepe, Fernando, Hugo y Rodrigo**

Por el amor que yo tengo hacia ellos y ellos hacia mí, por ser además de mis hermanos mis amigos, que junto con mis padres hemos estado unidos siempre en las buenas y en las malas.

**A MIS SOBRINOS:
Miriam, Diana y José de Jesús**

**A MIS ABUELITOS:
Guadalupe Torres y Teodoro Pichardo ^(†)
Concepción Rangel y Ramón González ^(†)**

Por el amor que tengo para ellos, por sus consejos y buenos ejemplos que consolidan los pilares de nuestra familia.

A MI TÍA PAULA Y A JOSÉ

Por apoyarme siempre en mis estudios y por el gran cariño y agradecimiento que tengo para ellos por ayudarme a salir adelante.

A MI TÍA LUPE, A MI TÍO CUCO, A MI TÍO SALOMÓN Y A LA FAMILIA SÁNCHEZ

Por el gran cariño que tengo para ellos, por lo buenas personas que han sido conmigo y con mi familia.

A TODOS MIS TÍOS, TÍAS, PRIMAS, PRIMOS Y A MI CUÑADO SERGIO

**A MIS AMIGOS:
Alejandra Elizarrarás, Juan Ángel Guerrero, Jaime Zavala, Claudia Pérez, Rosario Tovar, Juan Manuel Malpica, Oscar Rodríguez, José Marín, Edgar Brenes, Teresa Rivero, Evelia Hernández, Susana Ramírez, Lupita Carrillo y Alejo Rodríguez**

A TODOS MIS PROFESORES

CONTENIDO

	Página
CONTENIDO	i
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vii
SUMMARY	viii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivo general	3
1.2. Objetivos particulares.....	3
1.3. Hipótesis	3
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos bioquímicos de las semillas viables	4
2.1.1. Acumulación de reservas	4
2.1.2. Germinación	4
2.2. Almacenamiento de semillas	5
2.3. Características que afectan la longevidad de la semilla	7
2.3.1. Estado de desarrollo de la semilla	7
2.3.2. Ausencia de daño mecánico	7
2.3.3. Ausencia de deterioro fisiológico	7
2.3.4. Ausencia de hongos e insectos	7
2.3.5. Viabilidad inicial	8
2.4. Factores que influyen en la longevidad de semillas durante el almacenamiento	8
2.4.1. Humedad relativa y temperatura	8
2.4.2. Contenido de humedad de la semilla	9
2.4.3. Humedad de equilibrio	9
2.5. Asociación entre el contenido de humedad de la semilla y la temperatura de almacenamiento	9
2.6. Vigor de la semilla	10
2.6.1. Prueba de germinación	11

2.6.2.	Prueba de envejecimiento acelerado	11
2.7.	Deterioro natural de las semillas	12
2.8.	Biomoléculas relacionadas con la composición y función de las membranas celulares	14
2.8.1.	Lípidos	14
2.8.2.	Funciones de los lípidos	14
2.8.3.	Ácidos grasos	15
2.8.4.	Lípidos estructurales de las membranas	15
2.8.5.	Lípidos de almacenamiento	17
2.9.	Manifestaciones del deterioro en las semillas	18
2.9.1.	Alteraciones en membranas	18
2.9.2.	Cambios en la respiración	20
2.10.	Índices para la evaluación de la peroxidación lipídica en las semillas	21
2.11.	Predicción del deterioro de las semillas	21
2.12.	Modelación de la predicción del deterioro en semillas	22
2.13.	LITERATURA CITADA	24
CAPÍTULO III. ÁCIDOS GRASOS Y CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE TOMATE DE CÁSCARA DURANTE EL DETERIORO NATURAL		30
	RESUMEN	30
3.1.	INTRODUCCIÓN	31
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.4.	CONCLUSIONES	45
3.5.	LITERATURA CITADA	46
CAPÍTULO IV. ÁCIDOS GRASOS, RESPIRACIÓN Y CALIDAD FISIOLÓGICA EN SEMILLAS DE TOMATE DE CÁSCARA DETERIORADAS ARTIFICIALMENTE		49
	RESUMEN	49
4.1.	INTRODUCCIÓN	50
4.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	52
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56

4.4.	CONCLUSIONES	67
4.5.	LITERATURA CITADA	68
CAPÍTULO V. UN MODELO DEL DETERIORO DE SEMILLA DE TOMATE DE CÁSCARA		71
	RESUMEN	71
5.1.	INTRODUCCIÓN	72
5.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	75
5.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
5.4.	CONCLUSIONES	87
5.5.	LITERATURA CITADA	88
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL		90
6.1.	PERSPECTIVAS	93
6.2.	LITERATURA CITADA	94
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES GENERALES		95
ANEXOS		97

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
Cuadro 3.1.	Cuadrados medios y significancia estadística en el contenido de ácidos grasos, germinación, velocidad de emergencia de radícula y actividad respiratoria de semillas de tomate de cáscara almacenadas hasta por 7 años sin control de clima	36
Cuadro 3.2.	Coeficientes de correlación entre las variables evaluadas en semillas de tomate de cáscara almacenadas en distintos años en una bodega sin control de clima	43
Cuadro 4.1.	Cuadrados medios y significancia estadística en el contenido de ácidos grasos, germinación y velocidad de emergencia de radícula de semillas de tomate de cáscara, en siete tratamientos de deterioro artificial	57
Cuadro 4.2.	Efecto de la temperatura y humedad relativa en el contenido de ácidos grasos, en la germinación y el vigor de semillas de tomate de cáscara sometidas a tratamientos de deterioro artificial	59
Cuadro 4.3.	Cuadrados medios y significancia estadística de la germinación en papel filtro y actividad respiratoria de semillas de tomate de cáscara envejecidas en siete niveles de HR a 50 °C	61
Cuadro 5.1.	Calibración de parámetros del modelo de viabilidad propuesto por Ellis y Roberts (1980) para ajustar el modelo a los datos de porcentaje de viabilidad de la semilla (v) de tomate de cáscara almacenada en una bodega sin control de clima ubicada en Texcoco, Estado de México, del 2000 al 2005	83

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 3.1. Contenido de ácidos grasos en semillas de tomate de cáscara con deterioro natural hasta por 7 años en almacenamiento sin control de clima. A) Linoleico y B) Esteárico	38
Figura 3.2. Efecto del tiempo de almacenamiento en características fisiológicas de semillas de tomate de cáscara. A) Germinación y B) Velocidad de emergencia de radícula	39
Figura 3.3. Respiración en semillas de tomate de cáscara almacenadas hasta por 7 años en una bodega sin control de clima	41
Figura 4.1. Cromatógrama de ácidos grasos presentes en semillas de tomate de cáscara	56
Figura 4.2. Efecto de la humedad relativa en el envejecimiento acelerado de semillas de tomate de cáscara almacenadas a 50 °C. A) Germinación, B) Velocidad de emergencia de la radícula y C) Cinética respiratoria de las semillas a las 72 h después de la imbibición	63
Figura 4.3. Cinética respiratoria de semillas (mL CO ₂ g ⁻¹ h ⁻¹) a 72 h después del inicio de la imbibición sobre: A) Porcentaje de germinación y B) Velocidad de emergencia de radícula	66
Figura 5.1. Diagrama de flujo del modelo de viabilidad de semilla de tomate de cáscara variedad CHF1-Chapingo, almacenada en una bodega sin control de clima ubicada en Texcoco, Estado de México, México	79
Figura 5.2. Porcentaje de viabilidad de semillas de tomate de cáscara (v) sin calibración de parámetros, modelada (línea continua) y datos observados (puntos con desviación estándar)	81

Figura	Página
Figura 5.3. Contenido de agua en la semilla de tomate de cáscara (C, %). Datos modelados sin calibrar lambda (línea continua superior); datos observados (puntos con desviación estándar) y datos modelados con lambda calibrado (línea continua inferior).....	82
Figura 5.4. Porcentaje de viabilidad de semillas de tomate de cáscara (v) con la calibración combinada de C_H , C_W y K_i con el método de Marquardt, modelado (línea continua) y observado (puntos con desviación estándar)	84
Figura 5.5. Porcentaje de viabilidad de semillas de tomate de cáscara (v) con la calibración combinada de C_H , C_W y K_i con el método Simplex, modelado (línea continua) y observado (puntos con desviación estándar).....	86
Figura A1. Plantas de tomate de cáscara de la var CHF1-Chapingo producidas en invernadero.....	97
Figura A2. Frutos de tomate de cáscara de la var CHF1-Chapingo cosechados en invernadero.....	97
Figura A3. Prueba de germinación en papel filtro.....	97
Figura A4. Prueba de germinación en ágar bacteriológico.....	97
Figura A5. Prueba de viabilidad con tetrazolio en semillas con envejecimiento acelerado.....	98
Figura A6. Macerado de semillas enteras de tomate de cáscara para la extracción de ácidos grasos	98
Figura A7. Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro masas (GC-MS).....	98
Figura A8. Equipo de cómputo conectado al (GC-MS) mostrando las curvas de los ácidos grasos cuantificados.....	98

EXPRESIÓN FISIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL DETERIORO NATURAL Y ARTIFICIAL DE SEMILLAS DE *Physalis ixocarpa* Brot.

Juan Manuel Pichardo González, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2010

México es centro de origen del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.), el cual ocupa el cuarto lugar dentro de las especies olerícolas. La investigación en esta especie es escasa, particularmente en los procesos que ocasionan el deterioro de las semillas almacenadas, fenómeno que provoca una pérdida anual hasta de 10 % de germinación. La presente investigación se llevó a cabo en tres fases. En la primera se evaluaron respiración y contenido de ácidos grasos y su correlación con pérdida de germinación y vigor en semillas deterioradas de *P. ixocarpa* var. CHF1-Chapingo, almacenadas hasta por siete años en una bodega sin control de clima. En la segunda fase, se evaluaron las mismas variables en semillas sometidas a envejecimiento acelerado (deterioro artificial). Finalmente, en la tercera fase se elaboró un modelo matemático para estimar la viabilidad de semillas almacenadas en una bodega sin control de temperatura ni humedad relativa ubicada en el Valle de México. En la primera fase se encontró que semilla almacenada hasta por siete años perdió capacidad germinativa a una tasa anual de 11 %. El ácido linoleico mostró una disminución constante conforme aumentó el tiempo de almacenamiento, de tal manera que al séptimo año la disminución fue del 94 %. La actividad respiratoria también mostró un decremento constante desde el primer año de almacenamiento. La germinación correlacionó positivamente con velocidad de emergencia de radícula ($r = 0.99$; $P \leq 0.01$), actividad respiratoria ($r = 0.79$; $P \leq 0.01$) y contenido del ácido linoleico ($r = 0.78$; $P \leq 0.01$); así, tanto la actividad respiratoria como el contenido del ácido linoleico están involucrados en la disminución de la germinación y vigor conforme aumenta el tiempo de almacenamiento. En la segunda fase se observó que los tratamientos de envejecimiento acelerado no cambiaron significativamente la composición de ácidos grasos en las semillas. El tratamiento de 50 °C combinado con 65 % de humedad relativa provocó una disminución promedio de 63 % en la germinación, así como un decremento en la respiración a valores inferiores a 0.1 mL de CO₂ g⁻¹ h⁻¹. De igual manera, la velocidad de emergencia de radícula disminuyó 75 % al subir la temperatura de 45 a 50 °C. La respiración correlacionó positivamente con la pérdida de germinación ($r = 0.84$; $P \leq 0.01$) y velocidad de emergencia de radícula ($r = 0.98$; $P \leq 0.01$); así, la disminución de respiración fue la principal causante del deterioro en semillas envejecidas artificialmente. Finalmente, en la tercera fase se mostró que la predicción del contenido de humedad de la semilla en el rango de 5 a 14 %, adecuado para preservar la longevidad de la semilla. La mejor calibración de la ecuación de viabilidad de Ellis y Roberts fue cuando se optimizaron simultáneamente C_H, C_W, y K_i con el método Simplex en donde los cambios en los parámetros fueron menores a 4.6 %, el error fue 3.4 % y R² alto. La viabilidad de la semilla fue mayor o igual a 85 % hasta 263 d de almacenamiento y se alcanzó el 50 % de viabilidad en cuatro años y cinco meses.

Palabras clave: tomate verde, modelo, ácidos grasos, respiración, envejecimiento acelerado, almacenamiento.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EXPRESSION OF NATURAL AND ARTIFICIAL SEED DETERIORATION OF *Physalis ixocarpa* Brot.

Juan Manuel Pichardo González, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2010

Mexico is origin center of husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.), which occupies the fourth place among the horticultural species. The investigation in this species is still scarce, particularly about the processes that cause seed deterioration in stored seeds, phenomenon that provoke a annual loss of 10 % in the germination. The investigation was carried out in three phases. In the phase one, the respiration and content of fatty acids were correlationated with the loss of germination and vigor in *P. ixocarpa* seeds var. CHF1-Chapingo stored from two months as far as seven years in a store without control of both, temperature and relative humidity. In the second phase the same variables were evaluated in seeds with accelerated aging (artificial seed deterioration). Finally, in the third phase, a mathematical model was elaborated to estimate the viability of seeds stored in a store without control of both, temperature and relative humidity. It store is localized in the Valley of Mexico. In the first phase was found that the seed stored as far as seven years missed germinative capacity in a rate annual of 11 %. The linoleic acid showed a constant decrease in accordance with the time of storage, in such a way that in the seventh year showed a decreased of 94 %. The respiratory activity also showed a constant decrease since the first year of storage. The germination correlated positively with the speed of root emergence ($r = 0.99$; $P \leq 0.01$), respiratory activity ($r = 0.79$; $P \leq 0.01$) and content of linoleic acid ($r = 0.78$; $P \leq 0.01$). In this way both, the respiratory activity and content of linoleic acid are involved in the decrease of the germination and vigor in accordance with the increase of the time of storage. In the second phase was observed that the treatments of accelerated aging did not change significantly the fatty acids content in seeds. The treatment of 50 °C with 65 % of relative humidity caused a decrease average of 63 % in germination and a decrease in respiration with values lower than 0.1 mL of CO₂ g⁻¹ h⁻¹. Similarly, the speed of root emergence decreased 75 % when the temperature increased from 45 to 50 °C. The respiration correlated positively with the loss of germination ($r = 0.84$; $P \leq 0.01$) and speed of root emergence ($r = 0.98$; $P \leq 0.01$). In this way, the decrease in the respiration was the main factor that caused deterioration in husk tomato seeds aged artificially. Finally, in the third phase, the mathematical model showed that the prediction of seed moisture was in a rank from 5 to 14 %, what is adequate to protect the seed longevity. The best calibration of the Ellis and Roberts viability equation was when C_H, C_W, and K_i were simultaneously optimized with the Simplex method, which, the changes in these parameters were smaller than 4.6 %, the error was 3.4 % and the R² was high. The seed viability was major or equal than 85 % until 263 d of storage and reached 50 % of viability at fourth years and five months.

Key words: husk tomato, model, fatty acids, respiration, accelerated aging, storage.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.), es una solanácea importante en México y Guatemala como ingrediente esencial para la preparación de platillos regionales, especialmente en forma de salsa preparada con sus frutos y chile molido, que mejoran el sabor de la comida, estimulan el apetito y atenúan el sabor picante del chile. La infusión de las cáscaras (cálices) se agrega a la masa de tamales y buñuelos para mejorar su consistencia esponjosa; también se utiliza para dar sabor al arroz blanco y para ablandar las carnes rojas (Oliver y Rojas, 2004). Se cree que es originaria del Centro de México en donde aún se encuentran poblaciones arvenses y domesticadas. Algunos hallazgos arqueológicos prueban que su uso como alimento de la población mexicana se remonta a tiempos precolombinos (Oliver y Rojas, 2004).

En México, el tomate de cáscara ocupa el quinto lugar entre las especies hortícolas, superada únicamente por el chile, jitomate, papa y cebolla (Peña y Santiaguillo, 1999); en el 2008 se sembraron tanto en temporal como en riego 46,900 ha y se produjeron 609,470 t de fruto con un rendimiento medio de 13.4 t ha⁻¹ (SIAP, 2009). La superficie cosechada se ha incrementado desde 1932 y adquirió importancia a Nivel Nacional en la década de los sesenta, ya que antes sólo se cultivaba en los estados del centro del país. A partir de la década de los ochenta, se inició su exportación tanto en fresco como industrializado a los Estados Unidos de Norteamérica (Pérez y Granados, 2001) y para la década de los noventa, su cultivo se extendió a 26 de los 32 Estados de la República Mexicana (Peña y Santiaguillo, 1999).

A pesar de su importancia, la investigación en esta especie es escasa, en especial en aspectos relacionados con los procesos fisiológicos y bioquímicos provocados por el envejecimiento que reducen la capacidad de germinación de las semillas almacenadas o deterioradas. Pérez-Camacho *et al.* (2008) encontraron una tasa de 9 % anual de reducción en la germinación de semilla de tomate de cáscara almacenada en condiciones naturales de bodega. Los autores atribuyeron esta tasa de reducción de la viabilidad o deterioro de la semilla a la disminución de reservas y energía disponible para el crecimiento, así como a cambios en la composición química de las membranas. Sin embargo, de manera general el deterioro de semillas también involucra la pérdida

de la actividad enzimática, alteraciones genéticas, peroxidación de lípidos y la producción de radicales libres oxidativos los que afectan la estructura y función de las membranas, causando alteraciones en la permeabilidad (Priestley, 1986).

Durante el almacenamiento, todas las semillas sufren deterioro, el cual depende de la temperatura y humedad de almacenamiento, de la humedad inicial de la semilla y la especie (Chiu *et al.*, 2002). Las pruebas de laboratorio de deterioro controlado o envejecimiento acelerado (EA) son usadas para evaluar la calidad fisiológica de las semillas (vigor), con el supuesto de que el proceso de deterioro artificial es similar al deterioro natural (Nogarajan y Pandita, 2001).

En las pruebas de EA, el contenido de humedad de las semillas se incrementa y las semillas se incuban a altas temperaturas por un periodo de algunos días, antes de ser transferidas a las condiciones de una prueba de germinación estándar. La capacidad de un lote de semillas para sobrevivir al envejecimiento artificial se correlaciona con su vigor y potencial de longevidad en el almacenamiento (Bradford, 2004).

De manera general, el método de EA se usa con éxito en algunas especies, independientemente de que las semillas se encuentren en un estado anormal después del tratamiento, en términos de sus parámetros celulares como el metabolismo de los ácidos nucleicos y estructura de las membranas. La recomendación que da la International Seed Testing Association (ISTA) en cuanto al uso de estos métodos, comprende principalmente a las especies agronómicas de semilla grande (granos), admitiendo una correlación baja entre el envejecimiento artificial y la calidad de los lotes de semilla pequeña como semillas de flores, hortalizas y pastos (Halmer, 2000). Especialistas en semillas de diferentes grupos de investigación (Avendaño *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2006) consideran que la utilización de la técnica de EA para evaluar la calidad fisiológica de semillas de hortalizas (brócoli, zanahoria y pepino) lleva a encontrar efectos contradictorios, produciendo comúnmente porcentajes de germinación más altos que los testigos sin envejecer. Tradicionalmente el tratamiento conocido como EA consiste en aplicar 41 °C y 100 % humedad relativa (HR), durante periodos determinados de tiempo que consideran entre 24 y 72 h (Delouche y Baskin,

1973). Sin embargo, combinaciones de otros niveles de temperatura y HR, en otras especies de hortalizas no se han probado.

En este contexto, la presente investigación tuvo los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Estudiar los procesos bioquímicos y fisiológicos involucrados en el deterioro natural y artificial de semillas de tomate cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.).

Objetivos particulares

- Evaluar el deterioro de semillas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.), almacenadas en condiciones de bodega sin control de clima, y su relación con las características fisiológicas y bioquímicas durante la germinación.
- Determinar el efecto del deterioro artificial de semilla de *P. ixocarpa* en la composición de ácidos grasos, respiración, germinación y vigor.
- Modelar el deterioro natural de semillas de tomate de cáscara en condiciones de almacenamiento sin control de temperatura ni de humedad relativa, que permita estimar cuando se alcanza el 85 y 50 % de viabilidad de la semilla.

Hipótesis

- Las alteraciones fisiológicas y bioquímicas causadas por el deterioro reducen la capacidad de germinación y vigor de las semillas de tomate de cáscara almacenadas en condiciones “naturales” o de bodega sin control de temperatura ni de humedad relativa.
- Las alteraciones fisiológicas y bioquímicas causadas por el deterioro artificial en condiciones de laboratorio son similares a las causadas por el deterioro natural.
- La disminución del contenido de ácidos grasos en la semilla está relacionado con la pérdida de germinación tanto en semillas con deterioro natural como en semillas deterioradas artificialmente.
- La disminución de la viabilidad de las semillas de tomate de cáscara causada por el deterioro natural es predecible con un modelo matemático basado en variables ambientales de almacenamiento.

CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspectos bioquímicos de las semillas viables

2.1.1. Acumulación de reservas

Durante el desarrollo de las semillas, el endospermo suele crecer con más rapidez que el embrión después la fecundación. Este acumula compuestos de reserva 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 las semillas que el embrión, aun en las semillas maduras. En otras, el embrión va absorbiendo las reservas nutritivas del endospermo durante las últimas fases del desarrollo, hasta que el endospermo desaparece cuando la semilla es madura (Ohto *et al.*, 2007).

2.1.2. Germinación

La germinación puede ser definida como la emergencia del embrión de la semilla, determinada por una variedad de actividades anabólicas y catabólicas, incluyendo respiración, síntesis de proteínas y movilización de reservas después de la absorción de agua. La presencia de oxígeno es necesaria para permitir la respiración aeróbica mientras haya una temperatura adecuada que favorezca que los distintos procesos metabólicos procedan (Desai *et al.*, 1997). Durante la imbibición de la semilla madura ocurre una reactivación de los sistemas metabólicos existentes complementados por la síntesis de nuevos componentes que reanudan la expansión de las células (alargamiento de radícula) y la división celular. El desarrollo de semilla y la germinación son dos fases fisiológicas distintas del ciclo de vida de una planta; sin embargo, ambas están relacionados con las reservas. El desarrollo de la semilla es esencialmente anabólico, se caracteriza 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 (Kobayashi *et al.*, 2003).

Botánicamente la germinación empieza cuando la semilla seca empieza a absorber agua y es completada cuando el embrión se elonga y la radícula es empujada a través de la semilla o cubierta del fruto. La imbibición o la entrada de agua, es un fenómeno estrictamente físico. La emergencia de la plántula, es causada por el crecimiento del embrión, soportado por las reservas almacenadas en las semillas tales como los triacilgliceroles, que son lípidos de almacenamiento en semillas de muchos tipos de plantas, los cuales proporcionan energía y precursores biosintéticos durante la germinación (Bradford y Bewley, 2003; Nelson y Cox, 2006). Después de la imbibición, el metabolismo se reanuda rápidamente, inicialmente usando enzimas y reservas sintetizadas durante el desarrollo y conservados en la semilla seca. Nuevos genes pronto son transcritos, y se elaboran enzimas y nuevos componentes celulares (Bradford y Bewley, 2003). La respiración durante la germinación usa la sacarosa almacenada y una serie de compuestos que contienen galactosa llamados los oligosacáridos serie rafinosa (Bradford y Bewley, 2003).

2.2. Almacenamiento de semillas

El almacenamiento se puede definir como la conservación de las semillas viables desde el momento de la recolección hasta que se necesitan para la siembra. Cuando estas se pueden sembrar inmediatamente después de la recolección, no se requiere almacenamiento (Copeland y McDonald, 2001).

Cada especie tiene una fecha idónea prevista de siembra, lo más habitual es que sea necesario almacenar la semilla durante periodos de tiempo diversos que se pueden clasificar de la manera siguiente: a) hasta un año, cuando la producción de semilla se efectúa con periodicidad anual, pero es necesario esperar la temporada idónea para la siembra; b) de 1 a 5 años o más, cuando una especie fructifica en abundancia a intervalo de varios años y debe recolectarse en un año semilla buena y suficiente para satisfacer las necesidades anuales en los años intermedios, en los que la producción de semilla es escasa y c) 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 y las condiciones del almacenamiento; sin embargo, en especies que se

almacenan en ambientes óptimos, el tiempo de almacenamiento se suele medir en decenios (Walters *et al.*, 2005).

Los recursos y medios proyectados están relacionados con la cantidad de semilla que se va a almacenar y con la duración del almacenamiento. Construir 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. También es un gasto innecesario recolectar, extraer y limpiar la semilla cuando las condiciones de almacenamiento son tales que el 90% de ella muere antes de llegar al campo (Copeland y McDonald, 2001).

El periodo durante el cual la semilla puede seguir siendo viable sin germinar depende mucho de su calidad al momento de la recolección, el tratamiento al que se somete entre la recolección y el almacenamiento y las condiciones en que se almacena. No obstante, la longevidad de las distintas semillas puede variar aun cuando reciban un tratamiento idéntico y se les almacene en las mismas condiciones. En la actualidad se distinguen dos tipos principales de semillas:

Ortodoxas. Semillas que pueden secarse hasta un contenido de humedad (CH) bajo, de alrededor de 5% (peso en húmedo), y almacenarse perfectamente a temperaturas bajas o inferiores a 0 °C durante largos períodos.

Recalcitrantes. Semillas que no pueden sobrevivir si se secan 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 (Roberts, 1973).

Dentro de éstos 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. Asimismo, se puede establecer 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).

2.3. Características que afectan la longevidad de la semilla

2.3.1. 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).

2.3.2. Ausencia de daño mecánico

Las semillas que resultan dañadas mecánicamente durante la extracción, limpieza, separación, etc. pierden pronto 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. Por tal motivo debe procurarse 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).

2.3.3. Ausencia de deterioro fisiológico

La manipulación deficiente durante el tránsito o durante el procesamiento, deteriora fisiológicamente las semillas aún cuando no existan daños mecánicos o por microorganismos. Las semillas ortodoxas deben disponer de ventilación suficiente para evitar la respiración rápida y el calentamiento excesivo (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

2.3.4. 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 estos organismos 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 por hongos e insectos se lleva a cabo con mucha rapidez (Desai *et al.*, 1997; Copeland y McDonald, 2001).

2.3.5. Viabilidad inicial

Los lotes de semilla que inicialmente tienen viabilidad y capacidad de germinación altas, presentan mayor longevidad durante el almacenamiento 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 de ser 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).

2.4. Factores que influyen en la longevidad de semillas durante el almacenamiento

2.4.1. Humedad relativa y temperatura

Los dos factores más importantes que influyen en la duración de vida de las semillas durante el almacenamiento, son la humedad relativa y la temperatura. Los efectos de la humedad relativa (y sus subsecuentes efectos sobre la humedad de la semilla) y temperatura del ambiente de almacenamiento, son altamente interdependientes. La mayoría de las semillas de los cultivos pierden su viabilidad en humedades relativas cercanas a 80% y temperaturas de 25 a 30 °C, pero pueden mantenerse 10 años o más en humedades de 50% o menos y a una temperatura de 5 °C o menos (Copeland y McDonald, 2001).

Los factores que más influyen en el deterioro durante el almacenamiento son: la humedad relativa, la temperatura del almacén, el tiempo de almacenamiento y la composición gaseosa del ambiente. De éstos, la humedad es el de mayor importancia y

generalmente se le asocia con incremento en la contaminación por hongos (Roberts, 1981; Harein y Davis, 1992).

Harrington (1972) sugirió las siguientes dos reglas para asegurar un óptimo almacenamiento de semilla: 1) por cada 1 % en la reducción de la humedad de la semilla, se duplica la vida de la semilla, y 2) cada 5 °C en reducción de la temperatura de almacenamiento se duplica la vida de la semilla.

2.4.2. Contenido de humedad de la semilla

Harrington (1972) reconoce que existen algunas aclaraciones a las reglas para asegurar un óptimo almacenamiento. Primero, la regla referente al contenido de humedad de la semilla no es aplicable arriba de 14 o debajo de 5 % de humedad de la semilla. Las semillas almacenadas con contenidos de humedad arriba de 14 % incrementan su respiración, calor e invasión de hongos que reducen la viabilidad de las semillas más rápidamente. Debajo de 5 % de contenido de humedad de la semilla ocurre un rompimiento de la estructura de las membranas que acelera el deterioro. Esto es probablemente consecuencia de la reorientación de las capas hidrofílicas de la membrana debido a la pérdida de moléculas de agua que son necesarias para retener la configuración. Por ello, el almacenamiento de la mayoría de las semillas con un contenido de humedad entre 5 y 6 % parece ser ideal para la obtener la máxima longevidad (Copeland y McDonald, 2001).

2.4.3. Humedad de equilibrio

La naturaleza higroscópica de las semillas les permite mantener el contenido de humedad de equilibrio con alguna humedad relativa del ambiente determinada. El equilibrio se logra cuando las semillas ya no pierden ni absorben humedad (Copeland y McDonald, 2001).

2.5. Asociación entre el contenido de humedad de la semilla y la temperatura de almacenamiento

Humedades relativas altas incrementan el contenido de humedad de las semillas, el cual resulta en eventos bioquímicos tales como la actividad enzimática hidrolítica,

aumento de respiración e incremento de los ácidos grasos libres. Altas temperaturas aumentan la velocidad de los procesos, en los cuales ocurren muchas reacciones enzimáticas y metabólicas, causando una mayor velocidad de deterioro. Sin embargo, el contenido de humedad de la semilla es considerado el factor más crítico para mantener la longevidad de esta. Aunque el contenido de humedad de la semilla y la temperatura están interrelacionados, las temperaturas altas aceleran el deterioro de semillas con alto contenido de humedad debido al incremento de la actividad metabólica de los sustratos y enzimas hidrolizados. Las temperaturas altas ejercen solamente un mínimo efecto deteriorativo en semillas con baja humedad. Las semillas con baja humedad se almacenan bien en temperaturas arriba de 25 °C, pero si se aumenta el contenido de humedad, se almacenan bien solamente si la temperatura se reduce a 10 °C o menos. Por ello, aunque temperatura y humedad relativa interactúan para determinar la longevidad de la semilla, el control de la humedad relativa y su subsecuente efecto en el contenido de humedad de la semilla, es más crítico que la temperatura para alcanzar condiciones óptimas de almacenamiento (Copeland y McDonald, 2001).

2.6. Vigor de la semilla

El vigor ha sido definido como la sumatoria total de aquellas propiedades de las semillas que determinan el nivel de actividad y el comportamiento de éstas o de un lote de semillas durante la germinación y emergencia de las plántulas. Las semillas que muestran un buen comportamiento son consideradas de alto vigor, y aquellas que presentan un pobre comportamiento son de bajo vigor (ISTA, 2004).

El vigor juega un papel muy importante durante el almacenamiento de semillas. Las que son vigorosas poseen un mayor potencial de almacenamiento y se preservan bien por largos periodos hasta que pierden su viabilidad, ya que la viabilidad tiende a reducirse gradualmente durante el almacenamiento. El vigor es un término usado para estimar la calidad de las semillas; cuando están vigorosas producen plántulas uniformes, fuertes y sanas que tienen mejor establecimiento en campo y muestran relativamente mayor longevidad (Doijode, 2001).

El vigor de semillas generalmente es evaluado por las siguientes pruebas: crecimiento de plántulas, velocidad de germinación, medición de solutos en semillas, consumo de oxígeno y liberación dióxido de carbono (actividad respiratoria), tetrazolio, prueba de la actividad del ácido glutámico descarboxilasa (GADA) y diferentes tipos de pruebas de estrés, entre otras (Doijode, 2001).

2.6.1. Prueba de germinación

Esta prueba es una de las más ampliamente usadas para estimar la germinabilidad de las semillas. Usualmente la germinación se establece en papel, arena o en otro medio con condiciones cálido-húmedas. Estima el máximo porcentaje de semilla capaz de desarrollarse en plántulas sanas. Los procesos de germinación varían para diferentes cultivos y han sido estandarizados por la International Seed Testing Association (ISTA) y la Association of Official Seed Analysts (AOSA) (Mullen, 2003).

2.6.2. Prueba de envejecimiento acelerado

La prueba estándar de germinación con frecuencia sobreestima la germinación que ocurre en el campo, porque las condiciones en este para la germinación son usualmente más estresantes que aquellas usadas para la prueba de germinación en laboratorio. Se han desarrollado diversas pruebas de vigor que estiman la calidad de un lote de semillas que será sembrado en campo.

La prueba de envejecimiento acelerado es una de las pruebas de vigor de semillas más comunes, y en esta las semillas son expuestas a altas temperaturas (41 °C aproximadamente) y 100 % de humedad relativa por 3 a 5 días, seguida de una prueba de germinación en condiciones óptimas. Esta prueba es usada para estimar el potencial de germinación en las condiciones de estrés que la misma confiere (Mullen, 2003). Asimismo, permite estimar el deterioro que la semilla sufre en almacenes y el vigor de la misma, y puede aplicarse a cualquier tipo de semilla ya que esta prueba puede producir información de calidad en forma constante (Delouche y Baskin, 1973; Copeland y McDonald, 2001).

Esta prueba frecuentemente se lleva a la par o se mide con un ensayo de velocidad de emergencia, la cual consiste en poner a germinar semillas en arena o en papel. Diariamente se cuenta el número de plántulas normales emergidas hasta alcanzar una población constante. Posteriormente, mediante una expresión matemática se calcula la velocidad de emergencia, según la cual el lote con mayor velocidad, será el más vigoroso (Copeland y McDonald, 2001).

Para especies de semilla relativamente pequeña, como la mayoría de las hortalizas, la prueba de envejecimiento acelerado puede presentar ciertas limitaciones; ya que las semillas pequeñas absorben agua más rápida y desuniformemente durante el periodo de envejecimiento, lo que puede acelerar el proceso de deterioro o resultar en un comportamiento variable entre las semillas de una muestra, interfiriendo en la precisión de los resultados (Bhering *et al.*, 2006). En virtud de lo anterior, Jianhua y McDonald (1996) propusieron un método modificado usando soluciones salinas saturadas en sustitución de agua, lo que permite reducir las humedades relativas en la prueba, obteniéndose niveles específicos de humedades relativas dependiendo de la solución utilizada. Además esto permite la absorción de agua a una velocidad e intensidad más baja, por lo que el proceso de deterioro es menos drástico. La eficiencia de este procedimiento ha sido probada en semillas de chile (*Capsicum annuum* L.) (Panobianco y Marcos-Filho, 1998) y en semillas de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Bennet *et al.*, 2001).

2.7. Deterioro natural de las semillas

Las semillas son capaces de sobrevivir como organismos viables regenerativos hasta que el tiempo y el lugar sean adecuados para empezar una nueva generación. Sin embargo, como cualquier otra forma de vida, ellas no pueden retener su viabilidad indefinidamente y eventualmente se deterioran y mueren (Copeland y McDonald, 2001; Doijode, 2001).

La semilla de cualquier especie presenta su más alto nivel de vigor y potencial germinativo en la madurez fisiológica, desde la cual se inicia un proceso continuo e irreversible de deterioro hasta perder su capacidad germinativa. Por lo que, el deterioro

de una semilla se puede entender como una serie de cambios en el tiempo, que afectan funciones vitales y su desempeño, hasta causar su muerte (Bradford, 2004). La calidad de las semillas disminuye con el tiempo y la tasa de deterioro varía en diferentes especies y depende de las condiciones ambientales durante el almacenamiento y el tiempo que estas permanezcan almacenadas (Doijode, 2001; Salinas *et al.*, 2001; Chiu *et al.*, 2002).

Existen diferentes mecanismos de deterioro de semilla en diferentes condiciones de almacenamiento; ya que mientras en temperaturas bajas existe daño por radicales libres que puede ser el evento primario del deterioro de semilla, la pérdida de viabilidad de las semillas en altas temperaturas esta íntimamente relacionada a la inactivación de las proteínas térmicas (Sun *et al.*, 1998).

Un factor que influye en la conservación de la viabilidad de la semilla es la cantidad y calidad de las sustancias químicas contenidas en el embrión y en los tejidos (Niembro, 1990). Las causas que originan el deterioro de dichas sustancias y que conllevan a la pérdida de vigor y la germinabilidad de las semillas son diversas y aún no se conocen. Sin embargo, como las estructuras subcelulares están compuestas por lípidos y proteínas, con el paso del tiempo la membrana celular gradualmente se va deteriorando perdiendo así su capacidad selectiva. Este deterioro se lleva a cabo a consecuencia de la autoxidación de los lípidos, en semillas con reservas de aceites, formando peróxidos que activan algunas enzimas y que afectan la viabilidad y vigor de las semillas (Priestley, 1986; Niembro, 1991).

El proceso de deterioro es irreversible, el cual no puede prevenirse o revertirse, pero este puede ser lento en condiciones específicas. Es mayor en condiciones inapropiadas de almacenamiento, tales como alta temperatura y alto contenido de humedad de semilla. La evidencia del deterioro se relaciona con la decoloración de semillas, pobre germinación, pobre crecimiento de plántulas, producción de gran cantidad de plántulas anormales y pobre rendimiento. Los cambios fisiológicos que se registran en las semillas son reducción de la respiración, pérdida de la actividad enzimática y daño en las membranas (Doijode, 2001).

2.8. Biomoléculas relacionadas con la composición y función de las membranas celulares

2.8.1. Lípidos

El término lípido abarca un enorme rango de compuestos con diversas estructuras y funciones biológicas. Probablemente los lípidos más familiares son los ácidos grasos que contienen fosfolípidos y glicolípidos que juegan importantes roles en la organización y función en todas las membranas celulares. Los lípidos también son una de las fuentes más comunes de energía de almacenamiento en plantas y son particularmente abundantes en semillas (Murphy, 2001).

Los lípidos de almacenamiento son una forma conveniente de energía, se encuentran en la mayoría de los organismos, son relativamente compactos y tienen un valor calorífico mucho más alto que las proteínas y los carbohidratos. Posiblemente todas las semillas contienen algunos lípidos de almacenamiento. En semillas de colza (*Brassica napus*) y girasol (*Helianthus annuus* L.) la proporción de lípidos almacenados es tan alta que puede representar el 50 % del peso total de la semilla. Los lípidos almacenados son movilizados por las lipasas, las cuales llevan los ácidos grasos de todas las tres posiciones de la molécula de triacilglicerol. Las lipasas no están presentes en la mayoría de las semillas secas y probablemente son sintetizadas *de novo*, en los primeros días después de la germinación (Murphy, 2001).

2.8.2. Funciones de los lípidos

Las principales funciones biológicas de los lípidos son servir como: 1) componentes de la membrana, una parte importante de los lípidos celulares se emplean para formar membranas lipídicas, los tabiques que dividen los compartimentos y unas paredes pasivas, las cuales son selectivas al paso de determinadas sustancias. Las lipoproteínas sirven para entrecruzar la membrana exterior y las capas de peptidoglucano; 2) una forma fundamental de almacenamiento de carbono y energía; 3) precursores de otras sustancias importantes; 4) aislantes que previenen choques térmicos, eléctricos y físicos; 5) recubrimientos protectores que evitan infecciones y

pérdidas o entradas excesivas de agua; 6) vitaminas y hormonas en algunos casos y 7) transporte de ácidos grasos (Melo y Cuamatzi, 2008).

2.8.3. Ácidos grasos

Un ácido graso es un ácido carboxílico alifático de cadena larga. Raramente se encuentran libres en la naturaleza ya que más bien se hallan en forma esterificada como componentes mayoritarios de los diferentes lípidos. Se han identificado más de 100 ácidos grasos diferentes en los lípidos de los microorganismos, plantas y animales. Estos ácidos grasos orgánicos que poseen de 4 a 24 átomos de carbono, tienen un solo grupo carboxilo y una “cola” prolongada no polar. En las plantas superiores y en los animales, los ácidos grasos predominantes son los de las especies de C₁₆ y C₁₈: palmítico, oleico, linoleico y esteárico. Los ácidos grasos con menos de 14 o más de 20 átomos de carbono son raros (Murphy, 2001; Melo y Cuamatzi, 2008).

Los ácidos grasos frecuentemente son descritos en la literatura por medio de nombres triviales tales como ácidos “oleico”, “palmítico” o “estérico”. Recientemente se ha establecido una forma de describir diferentes ácidos grasos por medio de una nomenclatura sistemática en términos de la longitud de su cadena carbonada y el número y localización de dobles ligaduras en dicha cadena. Una tercer forma de describir a los ácidos grasos es usando un sistema numérico, donde primero se representa la longitud de la cadena, seguido por el número de las dobles ligaduras en el ácido graso. Por ejemplo, 18:1 representa un ácido graso con 18 carbonos y una sola doble ligadura. De esta forma, la representación de los cuatro principales ácidos presentes en plantas y en semillas son: palmítico (16:0), esteárico (18:0), linoleico (18:2) y oleico (18:1) (Murphy, 2001).

2.8.4. Lípidos estructurales de las membranas

La característica arquitectónica central de las membranas biológicas es una doble capa lipídica que constituye una barrera al paso de las moléculas polares y de iones. Los lípidos de las membranas son anfipáticos; un extremo de la molécula es hidrofóbico y el otro hidrofílico. Las interacciones hidrofóbicas entre ellos y las hidrofílicas con el agua, dirigen su empaquetamiento hacia la formación de láminas llamadas bicapas

membranas. Nelson y Cox (2006) describen cinco tipos de generales de lípidos de membrana:

a) Glicerofosfolípidos

También llamados fosfoglicéridos, son lípidos de membrana en los que las regiones hidrofóbicas están compuestos por dos ácidos grasos unidos al glicerol y un grupo de cabeza muy polar unido por un enlace fosfodiéster al tercer carbono. Los glicerofosfolípidos, como derivados del ácido fosfatídico, se nombran según el alcohol polar en el grupo de cabeza. Por ejemplo, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina tienen colina y etanolamina en sus grupos polares de cabeza.

b) Galactolípidos y Sulfolípidos

Es el segundo grupo de lípidos de membrana y son los que predominan en las células vegetales. Los residuos de galactosa están unidos por un enlace glucosídico con el tercer carbono de un 1,2-diacilglicerol. Los galactolípidos están localizados en las membranas tilacoides (membranas internas) de los cloroplastos; constituyen del 70-80 % de los lípidos totales de membrana en plantas vasculares. Son probablemente, los lípidos de membrana más abundantes en la biosfera y carecen del fosfato característico de los fosfolípidos. En los sulfolípidos, el sulfonato del grupo cabeza es portador de una carga negativa, lo mismo que el grupo fosfato de los fosfolípidos. Las membranas vegetales también contienen sulfolípidos, en los que un residuo de glucosa sulfonado se une a un diacilglicerol por medio de un enlace glucosídico. Los cloroplastos también contienen sulfolípidos.

c) Fosfolípidos

Lípidos en los que las cadenas alquílicas muy largas están unidas mediante enlace éter al glicerol a ambos extremos. Los fosfolípidos se degradan en los lisosomas.

d) Esfingolípidos

Son derivados de la esfingosina, también tienen una cabeza polar y dos colas apolares; a diferencia de los glicerofosfolípidos, estos están compuestos por una

molécula amino-alcohol de cadena larga esfingosina o uno de sus derivados, una molécula de ácido graso de cadena larga y un grupo de cabeza polar unido por enlace glucosídico en algunos casos y por enlace fosfodiéster en otros. La ceramida es la unidad estructural fundamental común de todos los esfingolípidos. Hay tres clases de esfingolípidos, todas ellas derivadas de la ceramida, pero que difieren en sus grupos de cabeza: a) las esfingolielinas, contienen fosfocolina o fosfoetanolamina como grupo de cabeza polar y se hallan presentes en las membranas plasmáticas de las células animales; b) los glucoesfingolípidos, que se encuentran principalmente en la cara externa de la membrana plasmática, tienen uno o más azúcares en su grupo de cabeza conectados directamente al -OH en C-1 de la porción ceramida y no contienen fosfato, los globósidos, son glucoesfingolípidos neutros con dos o más azúcares y, c) los cerobrósidios, los cuales tienen un único azúcar unido a la ceramida. Los esfingolípidos también se degradan en los lisosomas.

e) Esteroles

Son lípidos estructurales que se hallan presentes en la mayoría de las células eucarióticas. Son compuestos que se caracterizan por tener un sistema rígido de cuatro anillos hidrocarbonados fusionados. El colesterol, es el principal esteroles en células animales; el estigmasterol se encuentra en plantas (Nelson y Cox, 2006).

2.8.5. Lípidos de almacenamiento

Las grasas y los aceites, utilizados casi universalmente como formas de almacenamiento en frutos y semillas de las plantas y en tejidos de los animales, son compuestos derivados de los ácidos grasos. Los ácidos grasos son derivados hidrocarbonados con un nivel de oxidación bajo. Nelson y Cox (2006) mencionan que los ácidos grasos de almacenamiento son:

a) Triacilgliceroles

Son los lípidos más sencillos obtenidos a partir de los ácidos grasos. Los triacilgliceroles están compuestos por tres ácidos grasos unidos por un enlace éster con un glicerol. Los que contienen el mismo tipo de ácido graso en las tres posiciones se

denominan según el ácido grasos que contienen. La triestearina, la tripalmitina y la trioleína son ejemplos de triacilgliceroles, que contienen respectivamente, 16:0, 18:0 y 18:1. En la mayoría de las células eucarióticas, los triacilgliceroles forman una base separada de gotitas microscópicas oleosas en el citosol acuoso que sirven como depósito de combustible metabólico. Los triacilgliceroles se almacenan en las semillas de muchos tipos de plantas, proporcionando energía y precursores biosintéticos durante la germinación de semillas.

b) Las grasas.

La mayoría de las grasas naturales son mezclas complejas de triacilgliceroles sencillos y mixtos. Los aceites vegetales, tales como el aceite de maíz y el de oliva están compuestos mayoritariamente por triacilgliceroles con ácidos grasos insaturados, por lo que son líquidos a temperatura ambiente. Se convierten industrialmente a grasas sólidas por hidrogenación catalítica que reduce algunos de los dobles enlaces a enlaces sencillos y otros a dobles enlaces trans.

c) Las ceras.

Las ceras biológicas son ésteres de ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados (de 14 a 36 átomos de carbono) con alcoholes de cadena larga (de 16 átomos de carbono). Sus puntos de fusión (60 a 100 °C) son generalmente más elevados que los triacilgliceroles (Nelson y Cox, 2006).

2.9. Manifestaciones del deterioro en las semillas

2.9.1. Alteraciones en membranas

El envejecimiento se produce entre otras cosas a causa de los daños que sufren las membranas (celulares y de orgánulos: mitocondrias, plastidios, etc.), las enzimas y la cromatina (ADN y ARN mensajero). Estos daños son, muy posiblemente, causados por la acción de radicales libres y productos derivados, originados por peroxidación de los lípidos de las membranas y de las sustancias de reserva, los cuales actúan directamente durante el envejecimiento en seco o interfieren en reacciones producidas en los primeros momentos de la imbibición, por ejemplo, en la respiración

(Besnier,1989). La pérdida en la integridad de las membranas es probablemente el primer cambio deteriorativo durante el envejecimiento de semillas de maíz. Dicha pérdida provoca: la reducción del nivel de fosfolípidos, de la actividad de la peroxidasa y el ascorbato; incremento del nivel de ácidos grasos libres y malonaldehído; la formación de lípidos conjugados y la reducción en el contenido de sustancias de reserva como carbohidratos, proteínas y fosfolípidos (Basavarajappa *et al.*, 1991).

a) Peroxidación no enzimática de los ácidos grasos

Un gran número de especies de oxígeno reactivo tales como el peróxido de hidrógeno, el anión radical superóxido y el radical hidroxilo, entre otras, son generadas en la semilla durante el envejecimiento, las cuales causan peroxidación de lípidos. Estos radicales libres inducen peroxidación no enzimática, la cual tiene el potencial de dañar las membranas, siendo esta la mayor causa del deterioro de las semillas almacenadas (McDonald, 1999; Melo y Cuamatzi, 2008).

Los enlaces dobles de las cadenas de los ácidos grasos son muy vulnerables a las reacciones con agentes oxidantes fuertes, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical aniónico superóxido (O_2^-) o el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Estas sustancias son formas tóxicas del oxígeno; la oxidación convierte el ácido graso en hidroperóxido (ROOH). Los lípidos más propensos a este cambio son los de tipo compuesto, como los fosfolípidos y los glicerofosfolípidos presentes en las membranas biológicas, los cuales contienen en abundancia ácidos grasos insaturados. La peroxidación de lípidos de la membrana puede ocasionar, a su vez, la oxidación de las proteínas de la membrana, lo cual puede provocar graves efectos sobre la estructura y funcionamiento de la membrana celular. Las células vivas se protegen contra este daño detoxificando los agentes oxidantes originales o los hidroperóxidos de lípidos (Melo y Cuamatzi, 2008).

b) Peroxidación enzimática de los ácidos grasos

Entre los efectos dañinos que provoca la peroxidación, cabe destacar, lo que en la naturaleza es un fenómeno normal, cierta peroxidación de ácidos grasos, catalizada por enzimas específicas. Los sustratos de estas enzimas son ácidos grasos poliinsaturados; dichos ácidos se convierten en (hidro) peróxidos intermediarios que se

utilizan como precursores para la biosíntesis de sustancias bioactivas en plantas (Melo y Cuamatzi, 2008).

2.9.2. Cambios en la respiración

El deterioro de la semilla también 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. Por lo que, un signo de deterioro de la semilla es la reducción significativa de la tasa respiratoria (Bernal-Lugo 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 se aprecia más claramente después de la emergencia de la radícula (Cruz-Pérez *et al.*, 2003). La reducción de la actividad metabólica y de la respiración se asocian con el rompimiento de la estructura de la membrana, particularmente en la mitocondria (Copeland y McDonald, 2001).

Benamar *et al.* (2003) mencionan que en mitocondrias aisladas de semillas de chícharo (*Pisum sativum* L.) envejecidas artificialmente, a las 22 h de imbibición, son severamente afectadas en sus funciones, puesto que exhiben tasas reducidas de oxidación y controles respiratorios. Lo anterior puede deberse a que las membranas externas e internas pueden ser las primeras en sufrir lesiones resultado del envejecimiento. Esos resultados sugieren que las funciones de las mitocondrias de las semillas envejecidas son obstaculizadas para la producción de ATP, lo que se refleja en la baja velocidad y porcentaje de germinación de las semillas.

El envejecimiento natural de semilla de maíz (*Zea mays* L.) reduce el contenido total de carbohidratos y proteínas de reserva. Una causa importante de la muerte de una semilla es la pérdida severa de reservas en el embrión. Por lo tanto, el crecimiento y desarrollo de una nueva plántula son afectados a medida que avanza el proceso de deterioro de una semilla, expresándose en anormalidades y daños en sus estructuras principales (Basavarajappa *et al.*, 1991).

2.10. Índices para la evaluación de la peroxidación lipídica en las semillas

La peroxidación de los ácidos grasos afecta procesos vitales en las semillas. Por ello, se han implementado diferentes técnicas para la detección de la peroxidación de ácidos grasos en semillas correlacionándolos con el tiempo, ya sea de manera natural o por medio de la inducción del envejecimiento acelerado, principalmente por:

- a) La detección de ácidos grasos saturados e insaturados durante el envejecimiento utilizando el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) (Harman y Mattick, 1976; Halistones y Smith, 1988; Pucacka, 1998).
- b) Detección de productos secundarios de la peroxidación de ácidos grasos como el ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Stewart y Bewley, 1980).
- c) La presencia de radicales libres *in situ* con la prueba de spin por resonancia electrónica paramagnética (EPR). Con la prueba no destructiva de spin, se han estudiado cambios de permeabilidad de membranas en semillas íntegras envejecidas (Hepburn *et al.*, 1986). También, esta técnica se ha empleado en diferentes estructuras de la semilla como testa y ejes embrionarios (Khan *et al.*, 1996; Golovina *et al.*, 1997).
- d) Medición de la permeabilidad de la membrana por el registro de la conductividad eléctrica después de la imbibición de las semillas. Se ha observado que la peroxidación de los lípidos de la membrana incrementa la salida de compuestos iónicos de la misma (Halistones y Smith, 1988).
- e) Detección de la actividad enzimática. Este método es específico de enzimas encargadas de detoxificar a las células de especies reactivas de oxígeno, como la superóxido-dismutasa, lipoxigenasas y peroxidasas (Sacandé *et al.*, 2000).

2.11. Predicción del deterioro de las semillas

La predicción del deterioro de semillas puede ser extraordinariamente valioso para compañías semilleras y bancos de germoplasma permitiendo tomar las medidas necesarias para evitar la pérdida de viabilidad de semillas por deterioro. Se ha sugerido que el deterioro de las semillas puede ser predicho por ecuaciones matemáticas si se conocen sus características morfológicas, anatómicas, su germinación, contenido de

humedad inicial, la temperatura y la humedad relativa del ambiente de almacenamiento (Roberts, 1973; 1986).

Ellis y Roberts en 1980 desarrollaron un enfoque para la estimación potencial de la viabilidad de la semilla relacionando las condiciones de almacenamiento por medio de la ecuación de la viabilidad de semilla, el cual es un método cuantitativo para medir y estimar la viabilidad en función del tiempo de almacenamiento a una temperatura y contenido de humedad dados. Este método puede ser aplicado en condiciones estandarizadas de almacenamiento y para controlar pruebas de deterioro (Bradford, 2004).

La aplicación de la ecuación de la viabilidad de la semilla requiere del conocimiento de la vida almacenable a temperatura y contenido de humedad para cada especie. Esta ecuación contiene constantes que tienen que ser derivadas de experimentos para cada especie para predecir la almacenabilidad de semillas de esas especies a través de un amplio rango de condiciones. En la producción de semillas, con la aplicación de esta ecuación se pueden hacer ensayos controlados de deterioro en laboratorio para usarse como prueba de vigor y para predecir el almacenamiento potencial de un lote de semillas (Bradford, 2004).

2.12. Modelación de la predicción del deterioro en semillas

Un modelo es una representación simplificada de un sistema, usualmente en una forma matemática o computable (Rossiter, 2003). Los modelos se utilizan para: representar el conocimiento actual, categorizar prioridades en investigación, probar hipótesis y planificar, tomar decisiones y predecir (rendimiento, fecha de cosecha, etc.) (Carrillo, 2006).

Rossiter (2003) menciona tres tipos de modelos usados en la agricultura:

- a) Modelo dinámico de simulación. Un modelo donde el tiempo está explícitamente incluido en la formulación del modelo. El modelo produce el estado de un sistema a través del tiempo, y es conducido por una serie de tiempo de datos de entrada, usualmente climatología.

- b) Modelo empírico. Un modelo que se refiere a predicciones de datos basados en experiencias previas, no intentando modelar las causas físicas.
- c) Modelo mecanístico. Un modelo que trata de representar las causas físicas de las respuestas a ciertas condiciones.

En un modelo mecanístico los procesos cuantificados descansan sobre bases físicas o fisiológicas que obedecen a leyes o principios derivados del conocimiento científico (Addiscott y Tuck, 2001). Los modelos mecanísticos son dinámicos, o sea, que se pueden modificar a medida que aumenta el conocimiento que se adquiere referente a un sistema en particular (Passioura, 1996).

Las etapas para la creación y aplicación de un modelo son: a) estructurar el modelo; b) considerar las ecuaciones matemáticas; c) crear el modelo; d) calibrar el modelo; e) realizar un análisis de sensibilidad; f) validar el modelo y g) optimizar el modelo (Carrillo, 2006).

2.13. LITERATURA CITADA

- Addiscott, T. M. and G. Tuck. 2001. Non-linearity and error in modeling soil process. *European Journal of Soil Science*. 52: 129-138.
- Avendaño L. A. N., M. Quintana C. y S. C. Gómez C. 2006. Pruebas de emergencia en campo en lotes de semilla de zanahoria y brócoli. *In: Santacruz V. A., L. Córdoba T., J. C. Molina M. (Compiladores). Memoria del XXI Congreso de Fitogenética, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México: pp. 231.*
- 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 Science and Technology*. 19: 279-286.
- Benamar A., C. Tallon and D. Macherel. 2003. Membrane integrity and oxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing. *Seed Science Research*. 13: 35-45.
- Bennett, M. A., A. F. Evans, and E. M. 2001. Saturated salt accelerated aging (SSAA) test for assessing and comparing sh2 and sweet corn seed lots. *In: Congress of ISTA, 26. Abstracts appendix. ISTA. Angers. pp. 11.*
- Bernal-Lugo I. and A. C. Leopold. 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiology*. 98: 1207-1210.
- Besnier R., F. 1989. *Semillas biología y tecnología*. Ed. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. 637 p.
- Bhering, M. C., D. C. Fernández D., D. De souza V., and D. D. Portocarrero N. 2006. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de pimenta. *Revista Brasileira de Sementes*. 28 (3): 64-71.
- Bradford, K. J., and J. D. Bewley. 2003. *Seeds: Biology, Technology, and Role in Agriculture*. *In: Chrispeels M. J., and D. E. Sadava (eds). Plants, Genes, and Crop Biotechnology. Second Edition. Jones and Bartlett Publishers. Boston. USA. pp: 212-239.*
- Bradford K. J. 2004. *Seed Production and Quality*. Firths edition. Department of Vegetable Crop and Weed Science. University of California. Davis, CA. USA. 134 p.

- Carrillo S. J. A. 2006. Apuntes del curso Métodos para la predicción del rendimiento y calidad de la producción. Orientación en Fisiología Vegetal. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Copeland O. L. and M. B. McDonald. 2001. Principles of seed science and technology. Fourth edition. Kluwer Press, New York . 409 p.
- Cruz-Pérez A. B., V. A. González-Hernández, M. C. Mendoza y M. L. Ortega-Delgado. 2003. Marcadores fisiológicos de la tolerancia al envejecimiento de semilla en maíz. *Agrociencia*. 37: 371-381.
- Chiu, K. Y., C. L. Chen, and J. M. Sung. 2002. Effect of priming temperature on storability of primed *sh-2* sweet corn seed. *Crop Science*. 42: 1996-2003.
- Delouche, J.C. and C. C. Baskin. 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology* 1(2): 427-452.
- Desai B. B., P. M. Kotecha and D. K. Salunkhe. 1997. *Seeds Handbook: Biology, Production, Processing and Storage*. Marcel Dekker. New York, USA. 626 p.
- Doijode S. D. 2001. *Seed Storage of Horticultural Crops*. Food Products Press. Binghamton, NY. USA. 339 p.
- Ellis R. H. and E.H. Roberts. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*. 45:13-30.
- Golovina E., A. Tikhonov and F. Hoekstra. 1997. An electron paramagnetic resonance spin-probe study of membrane-permeability changes with seed aging. *Plant Physiology*. 114: 383-389.
- Halistones, M. and M. Smith. 1988. Lipid peroxidation in relation to decline vigour in seed of soya (*Glycine max* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Plant Physiology*. 133: 452-456.
- Halmer P. 2000. Commercial seed treatment technology. *In*: Black M. and J. D. Bewley (eds.). *Seed Technology and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press. Sheffield, UK. pp. 257-286.
- Harein, P. K., and R. Davis. 1992. Control of stored-grain insects. *In*: *Storage and Cereal Grains and Their Products*. 4th ed. Sauer, D. B. (ed.). American Association of Cereal Chemistry. St. Paul, Minnesota. USA. pp: 491-534.

- Harman, G. and L. Mattick. 1976. Association of lipid oxidation with seed ageing and death. *Science*. 206: 323-324.
- Harrington, J. F. 1972. Seed storage and longevity. *In*: T. T. Kozlowski (ed). *Seed Biology*. Vol. 3. Academic Press. New York. USA. pp 145-240.
- Hepburn H., B. Goodman, D. McPhail, S. Matthews and A. Powell. 1986. An evaluation of EPR measurements of the organic free radical content of individual seeds in the non-destructive testing of seed viability. *Journal of Experimental Botany*. 37: 1675-1684.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. *International Rules for Seed Testing*. Rules. 2004. ISTA editions, Zurich, Switzerland. 243 p.
- Jianhua, Z., and M. D. McDonald. 1996. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. *Seed Science and Technology*. 25 (1): 123-131.
- Khan M., G. Hendry, N. Atherton and C. Vertucci-Witers. 1996. Free radical and lipid accumulation and lipid peroxidation in testas of rapidly aged soybean seeds: a light-promoted process. *Seed Science Research*. 6: 101-107.
- 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.
- Martínez J. J., J. Martínez S., J. E. Rodríguez P. y G. M. Peña O. 2006. Relación entre pruebas de calidad fisiológica de semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.) con el establecimiento en almácigo. *In*: Santacruz V. A., L. Córdoba T., J. C. Molina M. (Compiladores). *Memoria del XXI Congreso de Fitogenética*, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México: pp. 230.
- McDonald M. B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*. 27: 177-237.
- Melo R., V. y O. Cuamatzi T. 2008. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Segunda edición. Reverté. México, D.F. 406 p.
- Mullen, R. C. 2003. *Crop Science. Principles and Practice*. Fourth Edition. Pearson Custom Publishing. USA. 353 p.

- Murphy D. J. 2001. Plant lipids – Their metabolism, function and utilization. *In: Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Lea P. J. and R. C. Leegood (eds). Second Edition. Chichester, England. pp. 119-135.
- Nelson D. L. y M. M. Cox. 2006. Lehninger Principios de Bioquímica Cuarta Edición. Traducido por C. M. Cuchillo. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1119 p.
- Niembro R. A. 1990. La composición química de las semillas y su efecto en la conservación. *In: Memoria del Seminario-Taller sobre Investigaciones en semillas Forestales octubre 1988*. Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal (CONIF). Bogotá Colombia pp. 111-118.
- Niembro R. A. 1991. Causas que originan el envejecimiento de las semillas de las plantas leñosas. Revisión Seminario. Universidad Autónoma de Campeche. Campeche, México. 16 p.
- Nogarajan S., V. K. Pandita. 2001 Improvement in germination characteristics in artificially aged seeds tomato by osmoconditioning. *Seed Research* 29:136-140.
- Ohto, M., S. L. Stone, and J. J. Harada. 2007. Genetic control of seed development and seed mass. *In: Bradford K. J., and H. Nonogaki (eds). Seed Development, Dormancy and Germination. Annual Plant Reviews, Volume 27*. Blackwell Publishing. Oxford UK. pp: 1-24.
- Oliver G. R. y M. Rojas M. 2004. Tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. Ex hornem., *Physalis philadelphica* L.) *In: Taboada S. M. y R. Oliver G. (eds). Cultivos alternativos en México. Primera Edición. Editorial AGT Editor. México, D.F. pp 153-169.*
- Panobianco, M., and J. Marcos Filho. 1998. Comparacao entre métodos para avaliacao da qualidade fisiológica de sementes de pimentao. *Revista Brasileira de Sementes*. 20 (2): 306-310.
- Passioura J. B. 1996. Simulation models: science, snake oil, education, or engineering. *Agronomy Journal* 88: 690-694.
- Peña L. A., H. J. F. Santiaguillo. 1999. Variabilidad genética de tomate de cáscara en México. *Boletín Técnico No. 2. Programa Nacional de Investigación en Olericultura*. UACH, Chapingo, México. 26 p.

- Pérez-Camacho I., O. J. Ayala-Garay, V. A. González-Hernández, J. A. Carrillo-Salazar, A. Peña-Lomelí y G. García-de los Santos. 2008. Indicadores fisiológicos del deterioro de semillas de tomate de cáscara. *Agrociencia* 42: 891-901.
- Pérez, M. L., y J. Granados A. 2001. Fertilización nitro-fosfórica en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) de riego en Irapuato, Guanajuato, México. *Acta Universitaria* 11: 19-25.
- Priestley D. A. 1986. Seed aging: Implications for seed storage and persistence in the soil. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press. Ithaca NY USA. 304 p.
- Pucacka, S. 1998. Changes in membrane fatty acid composition during desiccation of seeds of silver maple. *Seed Science and Technology*. 26: 535-540.
- Roberts E. H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*. 1: 499- 514.
- Roberts E. H. 1981. Physiology of aging and its application to drying and storage. *Seed Science and Technology*. 9: 359-372.
- Roberts E. H. 1986. Quantifying seed deterioration. *In: McDonald M. B. and C. J. Nelson (eds.). Physiology of Seed Deterioration*. Crop Science Society of America Special Publication 11. Madison WI. USA. pp. 101-123.
- Rossiter D.G. 2003. Biophysical models in land evaluation. *In: Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Preprint 11-June-2003. EOLSS Publishers Co. Ltd. London UK. pp. 1-16.
- Sacandé M., J. Buitink and F. Hoestra. 2000. A study of water relations in neem (*Azadirachta indica*) seed that is characterized by complex behavior. *Journal of Experimental Botany*. 51(341): 635-643.
- Salinas, A. R., A. M. Yoldjian, R. M. Cravioto y V. Bisaro. 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 36(2): 371-379.
- SIAP. 2009. Anuario del Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeanuadim.html. Consultado el 10 de marzo de 2010.

- Stewart, R. and P. Bewley. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*. 65: 245-248.
- Sun, W. Q., P. Davidson, and H. S. O. Chan. 1998. Protein stability in the amorphous carbohydrate matrix: relevance to anhydrobiosis. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1425: 245-254.
- Walters C., L. M. Hill and L. J. Wheeler. 2005. Dying while Dry: Kinetics and Mechanisms of Deterioration in Desiccated Organisms. *Integrative and Comparative Biology*. 45: 751-758.

CAPÍTULO III. ÁCIDOS GRASOS Y CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE TOMATE DE CÁSCARA DURANTE EL DETERIORO NATURAL

RESUMEN

En México, el tomate de cáscara ocupa el quinto lugar en superficie sembrada entre las especies hortícolas. Sin embargo, la investigación en esta especie es escasa, en especial la relacionada con los procesos de deterioro de la semilla. En esta investigación se evaluó el efecto del deterioro de semillas de tomate de cáscara var. CHF1-Chapingo sobre aspectos fisiológicos y bioquímicos durante la germinación; las semillas fueron almacenadas desde dos meses hasta siete años en una bodega sin control de clima a una temperatura de 18.2 ± 5 °C y $41.2 \pm 10\%$ de humedad relativa. Se encontró que la germinación, la velocidad de emergencia de radícula (vigor) y la actividad respiratoria decrecieron significativamente desde el primer año de almacenamiento, de manera que a los siete años la germinación y el vigor disminuyeron 99%, y la actividad respiratoria de la semilla embebida por 48 h disminuyó 78%. El contenido del ácido graso linoleico (insaturado) correlacionó positivamente con la germinación ($r = 0.78$; $P \leq 0.01$) y con la velocidad de emergencia de la radícula ($r = 0.79$; $P \leq 0.01$). La germinación correlacionó con la velocidad de emergencia de radícula ($r = 0.99$; $P \leq 0.01$) y con la actividad respiratoria a las 48 h del inicio de imbibición ($r = 0.79$; $P \leq 0.01$). Por esto, tanto la actividad respiratoria como el contenido del ácido linoleico están involucrados en la disminución de la germinación y vigor conforme aumenta el tiempo de almacenamiento.

Palabras clave: *Physalis ixocarpa*, ácidos grasos, deterioro de semillas, respiración, almacenamiento.

3.1. INTRODUCCIÓN

México es centro de origen de las especies del género *Physalis*, donde han formado parte de la gastronomía desde épocas precolombinas, sobre todo en forma de salsas y ensaladas (Pérez-Camacho *et al.*, 2008). El fruto de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) es importante en el país para la preparación de platillos regionales, ya sea en forma de salsas con chile que se usan como condimento de comidas preparadas, o como parte de diversos guisos (Oliver y Rojas, 2004). La superficie cosechada de tomate de cáscara adquirió importancia en la década de los setenta y a partir de la década de los ochenta se ha exportado tanto en fresco como industrializado a los Estados Unidos (Pérez y Granados, 2001); y en 2006 ocupó el quinto lugar entre las especies hortícolas con una superficie sembrada de 64,500 ha, con un rendimiento medio de 12.9 t ha⁻¹ (SIAP, 2006).

A pesar de lo anterior, la investigación en esta especie aún es escasa, en especial la relacionada con la calidad de la semilla y su deterioro. Según Pérez-Camacho *et al.* (2008), la germinación de semilla de tomate de cáscara almacenada en bodega sin refrigeración se reduce en 9 % anualmente. Este aspecto es importante considerarlo para establecer proyectos de almacenamiento de la semilla comercial, mejoramiento genético o bancos de germoplasma. El estudio de los procesos fisiológicos y bioquímicos de la semilla de tomate de cáscara podría explicar los factores involucrados en su deterioro.

La semilla de cualquier especie presenta su nivel más alto de vigor y potencial germinativo en la madurez fisiológica, desde la cual se inicia un proceso continuo e irreversible de deterioro hasta perder su capacidad germinativa (Delouche, 2002). El deterioro de una semilla puede entenderse como una serie de cambios en el tiempo que afectan sus funciones vitales y desempeño, hasta causar su muerte. Durante el almacenamiento, los mecanismos de deterioro de la semilla disminuyen la germinación, la velocidad de crecimiento de la plántula y la tolerancia a condiciones adversas (Bradford, 2004).

La tasa de deterioro varía entre especies y variedades; además depende de las condiciones ambientales y el tiempo de almacenamiento (Doijode, 2001; Salinas *et al.*, 2001); en condiciones de alta temperatura y alto contenido de humedad dicha tasa es alta.

En un lote de semillas el deterioro provoca decoloración, baja germinación y crecimiento de plántulas, producción de plántulas anormales y bajo rendimiento (Doijode, 2001). En la semilla individual se reduce la respiración y la actividad enzimática, y se dañan las membranas (Bernal y Leopold, 1992; Cruz-Pérez *et al.*, 2003; Doijode, 2001). Además, el deterioro de semillas involucra otros cambios bioquímicos y biofísicos, como la peroxidación de lípidos y estrés por radicales libres oxidativos, que son factores que contribuyen mayormente al deterioro de semillas, porque afectan la estructura y función de las membranas, inactivándolas y alterando su permeabilidad (Priestley, 1986; Wilson y McDonald, 1986; Hendry, 1993). El deterioro de la semilla también está asociado con la disminución de carbohidratos de reserva, lo que podría resultar en insuficiencia de sustratos respiratorios para la germinación o en la incapacidad para usarlos, por lo que un síntoma de deterioro de la semilla es la disminución significativa de la tasa respiratoria (Bernal y Leopold, 1992; Cruz-Pérez *et al.*, 2003).

En esta investigación se evaluó el deterioro de semillas de tomate de cáscara, almacenadas en condiciones de bodega sin control de clima, y su relación con las características fisiológicas y bioquímicas durante la germinación.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de tomate de cáscara de la variedad CHF1-Chapingo producidas a campo abierto durante los ciclos de producción primavera-verano: 2000, 2003, 2004, 2006 y 2007 (equivalentes a 7, 4, 3, 1 años y 2 meses de almacenamiento), en Chapingo, Estado de México, y en cada año de producción el manejo del cultivo fue el mismo. El trasplante a campo abierto fue en la primera semana de abril, a una densidad de 30 000 plantas ha⁻¹, y la cosecha de frutos se hizo en la segunda semana de junio. La semilla extraída del fruto se secó a temperatura ambiente bajo sombra y se benefició mediante limpieza y selección por tamaño, en una máquina de aire-zarandas (tipo LALS, Kamas[®]; Industri AB, Suecia). La semilla beneficiada se almacenó en bolsas de papel, en una bodega sin control de clima (18.2 ± 5 °C y 41 ± 10 % de HR).

Para determinar el contenido de humedad inicial, una muestra de semillas de cada periodo de almacenamiento se sometió a deshidratación por 72 h a 72 °C en una estufa (Central Scientific[®]; CENCO Instruments Corporation, EE. UU.). Con la biomasa en fresco y seco se determinó el contenido de humedad con la fórmula de Bewley y Black (1994).

Determinación del contenido de ácidos grasos

A la semilla de cada periodo de almacenamiento se le determinó el contenido de ácidos grasos. La extracción de ácidos grasos se hizo mediante el método de Priestley y Leopold (1979) (Figura A6), y la reacción de transesterificación por el método de Morrison y Smith modificado por Priestley *et al.* (1985). La evaluación de los tratamientos (edades de la semilla) se hizo conforme a un diseño completamente al azar con tres repeticiones de 20 mg de semilla.

El análisis de composición de ácidos grasos se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, Finnigan[®] MAT CAQ (Alemania) (Figura A7). Las condiciones cromatográficas fueron: inyección mediante el modo de “dispersión de partícula”, temperatura del inyector 200 °C, en una rampa de temperaturas del horno programada desde 100 °C (3 min al inicio) hasta 250 °C (por 4

min) con aumentos de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. La columna del cromatógrafo de gases fue del tipo DB-1 (Dimetilpolisiloxano). Se utilizó helio como gas acarreador, a una velocidad de 35 cm s^{-1} . Las condiciones del detector de masas fueron: temperatura de la línea de transferencia de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, intervalo de 20 a 400 reacciones de masa-carga (m/z), polaridad positiva, temperatura de la fuente de iones de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ionización de impacto electrónico a 70 electro-volts (eV). Se inyectaron $2\text{ }\mu\text{L}$ de la fase orgánica del extracto. Los ácidos grasos se identificaron con los tiempos de retención de estándares metílicos y con los patrones de fragmentación obtenidos de bibliotecas de referencia NIST (National Institute of Standards and Technology)

Germinación y vigor

A los lotes de semilla de los años evaluados se les hizo una prueba de germinación en papel filtro, con tres repeticiones de 50 semillas, de acuerdo con un diseño completamente al azar. Las semillas se depositaron en cajas petri con papel filtro humedecido (Figura A3) y colocadas en una germinadora SD8900[®] (Seedburo Inc., EE.UU.) a $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, con 12 h luz y 12 h oscuridad por 24 d (ISTA, 2004). En esta prueba se evaluó el porcentaje de germinación (G) y la velocidad de emergencia de radícula (VER); esta última como expresión del vigor de la semilla. La VER se calculó con la fórmula de Maguire (1962), que se basa en el número de radículas emergidas cada 24 h.

Medición de la actividad respiratoria

A la semilla de los distintos años de almacenamiento se le midió su cinética respiratoria con un cromatógrafo de gases modelo HP 5890[®] (Hewlet Packard, EE.UU.), a las 48 h de haber iniciado el proceso de imbibición-germinación. Tales mediciones se hicieron en tres repeticiones de 50 semillas, de acuerdo con un diseño completamente al azar. Las 50 semillas se colocaron en frascos de vidrio de 36 mL que se cerraron herméticamente con un tapón de plástico. Después de 1 h de haber sido tapados los frascos, se extrajo 1 mL de aire con CO_2 de cada frasco, con una jeringa para insulina, y se inyectó en el cromatógrafo de gases. El CO_2 liberado por respiración se calculó como el área bajo la curva de cada pico, y los datos se transformaron a mL h^{-1} .

Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se hicieron con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002). Previo al análisis, los datos de las variables medidas en porcentaje se transformaron con el arco seno $\sqrt{X/100}$. Se efectuaron pruebas de comparación de medias (Tukey, 0.05) y se hizo el análisis de correlación entre el porcentaje de germinación, la velocidad de emergencia de la radícula y la cinética de respiración. Las gráficas y las ecuaciones de las curvas se procesaron en la hoja de cálculo Microsoft Excel (EE. UU).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido inicial de humedad de las semillas de los años analizados fue 6 % en promedio, valor que es bajo y no interfiere con las variables medidas porque en semillas secas los procesos biológicos son más lentos que en semillas húmedas.

Contenido de ácidos grasos

La transesterificación realizada mediante cromatografía de gases acoplada con un espectrómetro de masas, permitió definir la presencia de los siguientes ácidos grasos en semillas de tomate de cáscara almacenadas en distintos años, con base a sus tiempos de retención: palmítico, linoleico, oleico, esteárico; no se detectó la presencia de otros ácidos en las semillas, ya que el método utilizado es específico para ácidos grasos (Priestley y Leopold, 1979; Priestley *et al.*, 1985).

Se encontró que la edad de las semillas afectó ($p \leq 0.05$) los contenidos de los ácidos linoleico y esteárico, así como ($p \leq 0.01$) la germinabilidad (G), la velocidad de emergencia de radícula (VER) y la actividad respiratoria (Cuadro 3.1). A diferencia de las variables G, VER y la actividad respiratoria que tuvieron bajos coeficientes de variación (≤ 16 %), los ácidos grasos presentaron altos coeficientes de variación (> 27 %), lo que se atribuye a la heterogeneidad entre lotes de semilla en cuanto a la composición de ácidos grasos.

Cuadro 3.1. Cuadrados medios y significancia estadística en el contenido de ácidos grasos, germinación, velocidad de emergencia de radícula y actividad respiratoria de semillas de tomate de cáscara almacenadas hasta por 7 años sin control de clima.

FV	GL	Ácidos grasos (mg g ⁻¹ de semilla)				G (%)	VER (rad d ⁻¹)	RESP (mL CO ₂ g ⁻¹ h ⁻¹)
		PAL	LIN	OLE	EST			
Edad	4	1.9 ns	4399.5 *	10.6 ns	0.3 *	1945.7 **	142.3**	0.07 **
Error	8	1.0	743.1	3.8	0.04	22.4	1.5	0.001
CV (%)		61.8	43.9	63.5	34.7	10.5	11.6	15.8

FV = Fuentes de variación; GL = Grados de libertad; PAL = Palmítico; LIN = Linoleico; OLE = Oleico; EST = Esteárico; G = Germinación; VER = Velocidad de emergencia de radícula; RESP = Respiración a las 48 h de imbibición; CV = Coeficiente de variación; *, ** = significativo con $p \leq 0.05$ y con $p \leq 0.01$, respectivamente; ns = No significativo.

Entre los ácidos grasos cuantificados, el linoleico fue el de mayor concentración con 83.7 a 95.2 %, seguido del oleico con 2.8 a 6.7 %, el palmítico con 1.4 a 7.7 % y el esteárico con 0.6 a 2.2 %; los dos primeros son insaturados y los otros dos saturados; es decir, en las semillas de tomate de cáscara hay mayor proporción de ácidos grasos insaturados que de saturados. Walters *et al.* (2005) encontraron resultados similares al cuantificar ácidos grasos en semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.), ya que cerca de 50 % de la materia seca de cotiledones fue lípidos, en los que predominaron linoleico y el oleico como ácidos grasos. También Gómez-Tejero *et al.* (2006) en semillas de *Swietenia macrophylla* King. y otras especies forestales encontraron una mayor proporción de ácidos grasos insaturados.

Los contenidos de ácido palmítico (saturado) y oleico (insaturado) fueron estadísticamente similares en semillas de todos los años de almacenamiento y con valores promedio de 1.65 y 62.03 mg g⁻¹ de semilla, respectivamente. En contraste, los contenidos de ácido linoleico (insaturado) y esteárico (saturado) sí mostraron diferencias estadísticas a través de los años de almacenamiento. El ácido linoleico (Figura 3.1A) mostró mayor concentración en los cuatro primeros años de almacenamiento y una reducción significativa de 94 % al séptimo año (5.4 mg g⁻¹ de semilla) con respecto a la semilla almacenada por 2 meses. Aunque no se evaluó la semilla de 5 y 6 años de edad, se aprecia la tendencia a una reducción rápida a partir de los tres años de haber sido almacenada. Tal reducción puede atribuirse a la formación de radicales libres que provocaron peroxidación de lípidos, ya que el linoleico por ser insaturado, es muy susceptible para convertirse en un ácido graso saturado (Priestley y Leopold, 1983). Al respecto, Sacandé *et al.* (2000) consideran que la presencia de dos dobles ligaduras en los carbonos lo hacen más ligero y polar, y por consiguiente, más susceptible al ataque de radicales libres que disminuyen su contenido en la semilla.

En esta investigación no se pudo confirmar la formación de radicales libres en las semillas almacenadas, por carecer de evidencias directas de resonancia electrónica paramagnética (Hepburn *et al.*, 1986) o de alguno de los productos secundarios de los ácidos grasos como el malodialdeído (Wilson y McDonald, 1986; Basavarajappa *et al.*,

1991); no obstante, la disminución del contenido del ácido linoleico (insaturado) puede ser una evidencia de peroxidación lipídica por radicales libres.

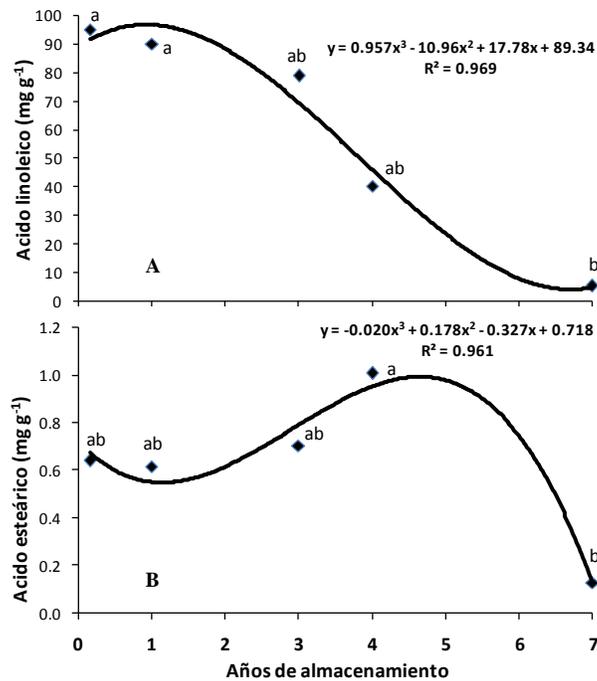


Figura 3.1. Contenido de ácidos grasos en semillas de tomate de cáscara con deterioro natural hasta por 7 años en almacenamiento sin control de clima. A) Linoleico y B) Esteárico. Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey, 0.05).

En forma similar, el ácido esteárico (Figura 3.1B) mostró una concentración promedio de 0.7 mg g^{-1} de semilla desde los dos meses de almacenamiento hasta el cuarto año de almacenamiento, pero al séptimo año se redujo significativamente a 0.13 mg g^{-1} de semilla, reducción equivalente a 87 % con respecto a la semilla almacenada durante 2 meses. Tal reducción significativa en el contenido del ácido esteárico (saturado) pudiera deberse a la actividad de enzimas de tipo desaturasa (Sacandé *et al.*, 2000).

Germinación y vigor

La semilla de tomate de cáscara almacenada por 2 meses tuvo la mayor germinación con 91 % (Figura 3.2A), valor que está dentro de la norma para semillas comerciales (ISTA, 2004). Un año después se registró una reducción de 44 % ($p \leq 0.05$) en la germinación con respecto a la semilla de 2 meses, y del primero al cuarto año no

hubo diferencias entre edades, con una reducción promedio de 37 % lo que las ubica fuera de la norma (ISTA, 2004). El almacenamiento por siete años resultó letal porque la germinación de semilla se redujo a 1 %. Estos resultados muestran que la germinación disminuye conforme aumenta el tiempo de almacenamiento, comportamiento similar a lo reportado por Cruz *et al.* (1995) en maíz (*Zea Mays L.*) y Pérez y Martínez (1994) para semillas en general.

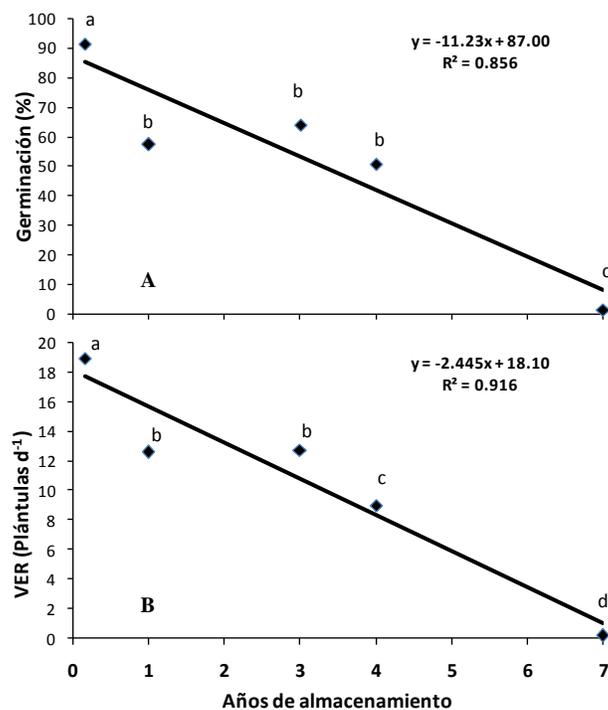


Figura 3.2. Efecto del tiempo de almacenamiento en características fisiológicas de semillas de tomate de cáscara. A) Germinación y B) Velocidad de emergencia de radícula. Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey, 0.05).

En tomate de cáscara, Pérez-Camacho *et al.* (2008) estimaron una pérdida de germinación de 8.7 % anual en semilla almacenada en bodega sin control de clima. En nuestro caso se estimó una pérdida anual de 11.2 %, superior a la encontrada por estos autores. Aunque las condiciones de almacenamiento usadas por los autores anteriores y las usadas en este trabajo fueron las mismas, las diferencias pueden deberse a que los años de medición fueron sólo cinco en el caso de estos autores y siete en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos durante el envejecimiento natural de la semilla de tomate de cáscara muestran que el contenido de ácido graso linoleico disminuye conforme aumenta el tiempo de almacenamiento, comportamiento similar a la germinación. Sin embargo, el modelo de la curva de esta última es lineal (Figura 3.2A), mientras que el del contenido de ácido graso linoleico es polinómico (Figura 3.1A). El ácido linoleico se mantiene a la baja en todos los años; no obstante, en los primeros años el decremento es lento, y del cuarto en adelante es rápido. De lo anterior se puede inferir que pequeños decrementos en el contenido de este ácido graso pueden disminuir significativamente la germinación. La peroxidación lipídica asociada con el envejecimiento ha sido estudiada en diversas especies como soya (*Glycine max* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cacahuate (*Arachis hypogaea*) y girasol (*Helianthus annuus* L.) (Buchvarov y Gantcheff, 1984; Wilson y McDonald, 1986; Gidrol *et al.*, 1989), en las cuales se observó una disminución de ácidos grasos insaturados y de la germinación.

El vigor de las semillas, evaluado con el índice de velocidad de emergencia (VER), mostró el mayor valor en la semilla de 2 meses de almacenamiento, con 18.9 radículas d^{-1} (Figura 3.2B). Al año de almacenamiento se registró una reducción de 34 % con respecto a la semilla de 2 meses de almacenamiento, equivalente a 12.5 radículas d^{-1} . La disminución continuó hasta que al séptimo año sólo se observaron 0.17 radículas d^{-1} que equivale a una reducción de 99 % y pérdida anual de 2.4 %. Este valor es inferior al reportado por Pérez-Camacho *et al.* (2008) quienes encontraron una reducción anual de 11.1% en semillas de tomate de cáscara.

La VER tuvo el mismo comportamiento que la germinación; en ambas variables se observaron disminuciones constantes de sus valores desde el primer hasta el séptimo año de almacenamiento, lo que demuestra una alta correlación entre ellas. Según Ferguson (1995), el primer componente de calidad que muestra señales de deterioro es el vigor de las semillas, seguido por una reducción en la germinación y finalmente la muerte de las semillas.

Respiración

La semilla de 2 meses de almacenamiento registró la mayor actividad respiratoria a las 48 h de iniciada la imbibición con $0.5 \text{ mL de CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figura 3.3). Después de un año de almacenamiento la respiración durante la germinación disminuyó ($p \leq 0.05$) a $0.19 \text{ mL de CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, o 38 % con respecto a la respiración de la semilla de 2 meses. En semillas de más edad o tiempo de almacenamiento, la tasa de respiración fue igual o menor ($p \leq 0.05$) a la de un año. La curva del comportamiento de la actividad respiratoria de la semilla de tomate de cáscara muestra que su tasa respiratoria se reduce rápidamente en el primer año de edad, lo que puede atribuirse al deterioro de la semilla. En semillas de tomate de cáscara de la misma variedad (CHF1-Chapingo), Pérez-Camacho *et al.* (2008) reportaron que la respiración disminuye significativamente hasta después del segundo año de edad.

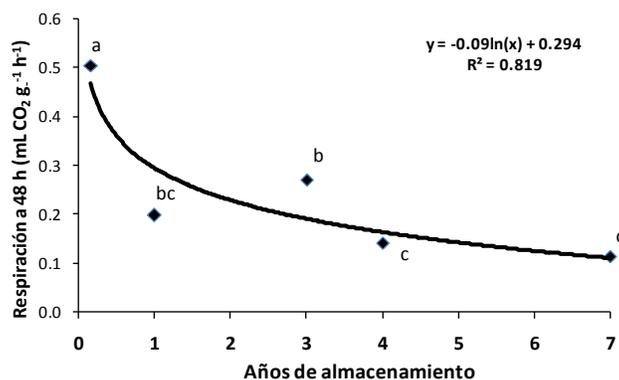


Figura 3.3. Respiración en semillas de tomate de cáscara almacenadas hasta por 7 años en una bodega sin control de clima. Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey, 0.05).

Bernal-Lugo y Leopold (1992) y Cruz-Pérez *et al.* (2003) mencionan que el deterioro de la semilla está asociado con cambios en su metabolismo, como la disminución de carbohidratos que ocurre con la edad de la semilla, lo cual podría resultar en insuficiencia de sustratos respiratorios para la germinación o en la incapacidad para usarlos. Por ello, un indicador confiable del deterioro de la semilla es la disminución de su tasa respiratoria. Copeland y McDonald (2001) y Cruz-Pérez *et al.* (2003) atribuyen la disminución de la actividad respiratoria en semillas envejecidas a un

decremento de la traslocación de los sustratos necesarios al eje embrionario y a la pérdida en reservas almacenadas. En la semilla de tomate de cáscara, Pérez-Camacho *et al.* (2008) encontraron que la disminución de reservas explica en gran parte la pérdida en la capacidad de germinación y vigor de la semilla deteriorada.

Esa reducción drástica de la respiración en semillas de un año de edad probablemente se manifestó debido a que las condiciones naturales de bodega sin control de clima (18.2 ± 5 °C y 41 ± 10 % de HR) no son apropiadas para el almacenamiento de estas semillas.

Aspectos fisiológicos del deterioro

Los resultados de esta investigación mostraron que la semilla nueva de sólo dos meses edad fue la que tuvo los valores más altos de germinación, velocidad de emergencia de radícula, respiración y contenido de ácido linoleico. Por el contrario, la germinación, vigor y contenido del ácido linoleico en las semillas de 7 años de edad, presentaron valores muy bajos (cerca de 0), por lo que estas características podrían ser consideradas como síntomas de deterioro en semillas de tomate de cáscara. De manera similar, Pérez-Camacho *et al.* (2008) en semillas de tomate de cáscara de la misma variedad (CHF1-Chapingo) y Delouche (2002) en semillas de varias especies, señalan que las semillas presentan su más alto nivel de vigor y potencial germinativo en la madurez fisiológica, a partir de la cual se inicia un proceso continuo e irreversible de deterioro hasta perder su capacidad germinativa. Por su parte Doijode (2001), Salinas *et al.* (2001) y Chiu *et al.* (2002) mencionan que la calidad de las semillas disminuye con el tiempo y la tasa de deterioro varía entre especies y depende de las condiciones ambientales durante el almacenamiento.

El análisis de correlación (Cuadro 3.2) mostró que la germinación correlacionó positivamente con la velocidad de emergencia de radícula (vigor) ($r = 0.99$; $P \leq 0.01$), la actividad respiratoria a las 48 h del inicio de imbibición ($r = 0.79$; $P \leq 0.01$) y el contenido del ácido graso linoleico ($r = 0.78$; $P \leq 0.01$). La velocidad de emergencia de radícula correlacionó positivamente con la respiración ($r = 0.81$; $P \leq 0.01$) y el contenido del ácido linoleico ($r = 0.79$; $P \leq 0.01$).

Cuadro 3.2. Coeficientes de correlación entre las variables evaluadas en semillas de tomate de cáscara almacenadas en distintos años en una bodega sin control de clima.

VARIABLES	VER	PAL	LIN	OLE	EST	RESP
GER	0.99 **	0.35	0.78 **	0.44	0.50	0.79 **
VER		0.34	0.79 **	0.43	0.44	0.81 **
PAL			0.25	0.69 **	0.48	0.05
LIN				0.69 **	0.39	0.54 *
OLE					0.45	0.09
EST						0.08

GER = Germinación; VER = Velocidad de emergencia de radícula; PAL = Palmítico; LIN = Linoleico; OLE = Oleico; EST = Esteárico; RESP = Respiración a las 48 h de inicio de imbibición; ** = Significancia de F a 0.01; * = Significancia de F a 0.05.

Esto confirma que la actividad respiratoria de las semillas de tomate de cáscara está estrechamente relacionada con la germinación y el vigor que son indicadores de la calidad fisiológica de la semilla. De esta forma la disminución de la calidad fisiológica se puede explicar por la disminución en la respiración que se traduce en una menor energía disponible para los procesos de germinación, como lo indican De Visser *et al.* (1990).

Se sugiere también que la cinética de la actividad respiratoria a las 48 h podría considerarse una prueba temprana de la calidad fisiológica de un lote de semillas, ya que se asocia linealmente con la germinación y la velocidad de emergencia de la radícula. Sundstrom y Edwards (1989) propusieron a la actividad respiratoria en semillas de chile (*Capsicum annuum* L.) como un indicador confiable del vigor de semilla, ya que tasas altas de respiración correlacionaron con germinación alta y con una rápida emergencia de radícula. Por su parte, Ferguson *et al.* (1990) observaron que el deterioro de la semilla de soya (*Glycine max* L.) redujo la tasa respiratoria y la velocidad de emergencia de radícula, comportamientos que fueron asociados con la pérdida de vigor de la semilla.

Como se señaló anteriormente, existe una disminución en el contenido del ácido linoleico conforme aumenta el tiempo de almacenamiento; sin embargo, el comportamiento de este ácido del primero al cuarto año no es similar al de la germinación y el vigor, puesto que estos disminuyen linealmente conforme aumenta el tiempo de almacenamiento hasta que ambos son prácticamente cero a los 7 años. Lo anterior demuestra que en la semilla nueva y la almacenada hasta tres años, las pequeñas disminuciones en el contenido del ácido linoleico se reflejan en una baja germinación y vigor. Es posible que esta disminución haya sido provocada por el deterioro de las semillas ocasionado a su vez por los radicales libres del ácido linoleico oxidado y que pudieron haber afectado a los lípidos de las membranas y a los de reserva, lo que posiblemente dio como resultado un daño a las membranas y también a las sustancias de reserva, como lo han señalado varios autores (Priestley, 1986; Wilson y McDonald, 1986; Bewley y Black, 1982; Hendry, 1993).

Se infiere que tanto la disminución de la respiración de las semillas provocada por una pérdida de reservas, como la peroxidación del ácido linoleico (insaturado) en las células de la semilla, son causantes del deterioro de semillas de tomate de cáscara almacenadas en condiciones naturales de bodega, lo que se reflejó en una baja en la germinación y vigor conforme aumentó el tiempo de almacenamiento.

3.4. CONCLUSIONES

La semilla de tomate de cáscara almacenada a 18.2 ± 5 °C y 41 ± 10 % de HR hasta por 7 años perdió capacidad germinativa a una tasa anual de 11.2 % que indujo la pérdida de 99 % al séptimo año. Asimismo, la velocidad de emergencia de radícula disminuyó a una tasa de 2.4 plántulas d^{-1} .

El ácido linoleico mostró una disminución constante conforme aumentó el tiempo de almacenamiento, pero con una cinética diferente a la de la germinación, ya que en los primeros tres años de almacenamiento no hubo variación estadística en el contenido de este ácido, mientras que al séptimo año presentó una disminución de 94 % respecto a la semilla almacenada durante dos meses.

En el primer año de almacenamiento la respiración disminuyó significativamente a 0.19 mL de $CO_2 g^{-1} h^{-1}$ (62 % con respecto a la semilla de 2 meses). La germinación correlacionó positivamente con la velocidad de emergencia de radícula ($r = 0.99$; $P \leq 0.01$), con la actividad respiratoria a las 48 h del inicio de imbibición ($r = 0.79$; $P \leq 0.01$) y con el contenido del ácido linoleico ($r = 0.78$; $P \leq 0.01$).

Por ello se infiere que tanto la actividad respiratoria como el contenido del ácido linoleico están involucrados en el deterioro natural de la semilla de tomate de cáscara, lo cual se refleja en la disminución de la germinación y vigor conforme aumenta el tiempo de almacenamiento.

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 Science and Technology*. 19: 279-286.
- Bernal-Lugo I. and A. C. Leopold 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiology*. 98: 1207-1210.
- Bewley J. D. and M. Black. 1982. *Biochemistry of seed in relation to germination*. Vol. 2. Berlin, Springer-Verlag.
- Bewley J. D. and M. Black. 1994. *Seeds. Physiology of Development and Germination*. Plenum Press. Second edition. New York, NY USA. 445 p.
- Bradford K. J. 2004. *Seed Production and Quality*. First edition. Department of Vegetable Crop and Weed Science. University of California. Davis CA. USA 134 p.
- Buchvarov P. and T. Gantcheff. 1984. Influence of accelerated and natural aging of free radicals levels in soybean seed. *Physiologia Plantarum*. 60:53-56.
- Copeland O. L. and M. B. McDonald. 2001. *Principles of Seed Science and Technology*. Fourth Edition. Kluwer Press, New York. USA. 467 p.
- Cruz G. F., V. A. González H., J. C. Molina M. y J. M. Vázquez R. 1995. Seed deterioration and respiration as related to DNA metabolism in germinating maize. *Seed Science and Technology* 23:477-486.
- Cruz-Pérez A. B., V. A. González-Hernández, M. C. Mendoza-Castillo y M. L. Ortega-Delgado. 2003. Marcadores fisiológicos de la tolerancia al envejecimiento de semilla en maíz. *Agrociencia* 37: 371-381.
- Chiu K. Y., C. L. Chen, and J. M. Sung. 2002. Effect of priming temperature on storability of primed *sh-2* sweet corn seed. *Crop Science*. 42: 1996-2003.
- 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 Physiology* 93:668-672.
- Doijode S. D. 2001. *Seed Storage of Horticultural Crops*. Food Products Press. Binghamton, NY. USA. 339 p.

- Ferguson J. M., D. M. TeKrony, and D. B. Egli. 1990. Changes during early soybean seed and axes deterioration. II. Lipids. *Crop Science* 30:179-182.
- Ferguson J. M. 1995. An introduction to seed vigour testing. *In: Seed vigour Testing Seminar*. Copenhagen. Zurich. International Seed Testing Association pp:1-9.
- Gidrol X., H. Serghini, A. Noubhani, B. Mocouot, and T. Mazliak. 1989. Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. I. Lipid peroxidation and membrane damage. *Physiologia Plantarum*. 76: 591-597.
- Gómez-Tejero J., J. Jasso-Mata, J. J. Vargas-Hernández y M. R. Soto-Hernández. 2006. Deterioro de semilla de dos procedencias de *Swietenia macrophylla* King., bajo distintos métodos de almacenamiento. *Ra Ximhai* 1(2): 223-239.
- Hendry G. A. F. 1993. Oxigen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Research*. 3: 141-153.
- Hepburn H., B. Goodman, D. McPhail, S. Matthews, and A. Powell. 1986. An evaluation of EPR measurements of the organic free radical content of individual seeds in the non-destructive testing of seed viability. *Journal of Experimental Botany* 37:1675-1684.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. International Rules for Seed Testing. Rules 2004. ISTA editions, Zurich, Switzerland. 243 p.
- Maguire J. D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*. 2: 176-177.
- Oliver G. R. y M. Rojas M. 2004. Tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex hornem., *Physalis philadelphica* L.) *In: Taboada S. M. y R. Oliver G. (eds.)*. Cultivos alternativos en México. Primera Edición. Editorial AGT Editor. México, D.F. pp. 153-169.
- Pérez-Camacho I., O. J. Ayala-Garay, V. A. González-Hernández, J. A. Carrillo-Salazar, A. Peña-Lomelí y G. García-de los Santos. 2008. Indicadores fisiológicos del deterioro de semillas de tomate de cáscara. *Agrociencia* 42: 891-901.
- Pérez F. G. y J. B. Martínez. 1994. Introducción a la fisiología vegetal. Mundi-Prensa. México, D.F. 250 p.

- Pérez M. L. y A. J. Granados. 2001. Fertilización nitro-fosfórica en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) de riego en Irapuato, Guanajuato, México. *Acta Universitaria*. 11: 19-25.
- Priestley D. A. and C. Leopold. 1979. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiology* 63: 726 – 729.
- Priestley D. A. and C. Leopold. 1983. Lipid changes during natural ageing of soybean seeds. *Physiologia Plantarum* 59: 467-470.
- Priestley D. A., B. Wermer, C. Leopold, and M. McBride. 1985. Organical free radical levels in seeds and pollen: the effects of hydration and aging. *Physiologia Plantarum* 64: 88–94.
- Priestley D. A. 1986. Seed aging: Implications for seed storage and persistence in the soil. Comstock Publishing Ass. Cornell University Press. Ithaca NY USA. 304 p.
- Sacandé M., J. Buitink, and F. Hoestra. 2000. A study of water relations in neem (*Azadirachta indica*) seed that is characterized by complex behavior. *Journal of Experimental Botany*. 51:635-643.
- Salinas A. R., A. M. Yoldjian, R. M. Cravioto y V. Bisaro. 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 36(2): 371-379.
- SAS Institute. 2002. User's Guide of SAS (Statistical Analysis System). SAS Institute Inc. Cary, N. C. USA. 550 p.
- SIAP. 2006. Anuario del Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeanuadim.html. Consultado el 23 de junio de 2009.
- Sundstrom F. J. and R. L. Edwards. 1989. Pepper seed respiration, germination, and seedling development following seed priming. *HortScience* 24:343-345.
- Walters C., P. Landré, L. Hill, F. Corbineu, and C. Bailly. 2005. Organization of lipid reserves in cotyledons of primed and aged sunflower seeds. *Planta*. 222: 397-407.
- Wilson D. O. and M. B. McDonald. 1986. The lipid peroxidation model of seed aging. *Seed Science and Technology*. 14: 269-300.

CAPÍTULO IV. ÁCIDOS GRASOS, RESPIRACIÓN Y CALIDAD FISIOLÓGICA EN SEMILLAS DE TOMATE DE CÁSCARA DETERIORADAS ARTIFICIALMENTE

RESUMEN

Las pruebas de envejecimiento artificial (EA) sirven para provocar el deterioro de semillas y como modelos para el estudio de este fenómeno. En este trabajo se evaluó el deterioro artificial de semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) de la variedad CHF1-Chapingo, y se correlacionó con el desempeño germinativo, contenido de ácidos grasos y tasa de respiración de las semillas. En un primer experimento se utilizaron semillas cosechadas en enero de 2007, las cuales se envejecieron artificialmente en 55, 65 y 75 % de humedad relativa (HR) a 45 y 50 °C durante 30 d. Se cuantificó el contenido de ácidos grasos mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, y se evaluó la germinación (%) y el vigor mediante la velocidad de emergencia de radícula (VER, radículas d⁻¹). En el segundo experimento se utilizaron semillas cosechadas en junio de 2007 y fueron envejecidas artificialmente en 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80 % de HR a 50 °C durante 30 d. Se evaluó la germinación y la VER, y se midió la actividad respiratoria a las 72 h de imbibición. Se encontró que los ácidos grasos no fueron afectados por el aumento de calor y humedad relativa, aunque si hubo disminución significativa de la germinación (63 % con el tratamiento de 50 °C y 65 % de HR) y de la VER (75 % al pasar de 45 °C a 50 °C en el Experimento 1, y de 34 % a 50 °C y 60 % de HR en el Experimento 2). La actividad respiratoria correlacionó con la disminución de la germinación ($r = 0.84$; $P \leq 0.01$) y la VER ($r = 0.98$; $P \leq 0.01$), por lo cual la pérdida de la calidad fisiológica de la semilla provocada por el deterioro se explica principalmente por la disminución de reservas y energía para la germinación (respiración).

Palabras clave: *Physalis ixocarpa*, ácidos grasos, deterioro artificial de semillas, respiración.

4.1. INTRODUCCIÓN

El deterioro de semillas está relacionado con su edad, contenido de humedad, y con las condiciones de almacenamiento; es un proceso en el cual disminuye el porcentaje de germinación, la velocidad de crecimiento de plántulas y la tolerancia a condiciones adversas. Los síntomas de la semilla deteriorada incluyen: crecimiento anormal, daños en las 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 las proteínas, y producción de sustancias tóxicas (Bradford, 2004).

Los enlaces dobles de las cadenas de los ácidos grasos son muy vulnerables a las reacciones con agentes oxidantes fuertes, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical aniónico superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), formas tóxicas que oxidan los ácidos grasos y los convierten en hidroperóxidos (ROOH). Los lípidos más propensos a estas reacciones son los de tipo compuesto, presentes en las membranas biológicas, porque contienen abundantes ácidos grasos insaturados. La estructura y funcionamiento de la membrana se modifica cuando el daño oxidativo se extiende sobre las proteínas de la membrana (Melo y Cuamatzi, 2008). Lo anterior genera cambios en su permeabilidad, pérdida de fluidez e integridad (Dell'Aquila, 1994).

La falta de integridad de las membranas celulares en semillas se atribuye a la disminución de fosfolípidos, carbohidratos y proteínas, así como a la reducción en la actividad de la enzima peroxidasa durante el secado que ocurre en la maduración (Wallis *et al.*, 2000). La peroxidación lipídica es dañina para las semillas, en tres formas: destrucción de lípidos membranales, oxidación de radicales libres y formación de aldehídos citotóxicos que pueden inactivar proteínas (Bradford, 2004). Por lo anterior, se ha encontrado que los ácidos grasos de las membranas disminuyen conforme aumenta el deterioro de la semilla expresado como pérdida de calidad fisiológica (Wilson y McDonald, 1986; Walters *et al.*, 2005; Panobianco y Viera, 2007).

El deterioro de la semilla también está asociado con la disminución de carbohidratos que generalmente ocurre con la edad de la semilla. Este proceso puede

resultar en insuficiencia de los sustratos respiratorios para la germinación o en la incapacidad para usarlos; por ello, se considera que un signo del deterioro de la semilla es la disminución significativa de su tasa respiratoria (Cruz-Pérez *et al.*, 2003).

Las pruebas de laboratorio de deterioro controlado o envejecimiento acelerado son usadas para evaluar la calidad fisiológica de las semillas (vigor), con el supuesto de que el proceso de deterioro artificial es similar al deterioro natural (Nogarajan y Pandita, 2001), lo que ofrece la posibilidad de estudiar dicho fenómeno. La recomendación de la Asociación Internacional de Pruebas de Semillas (ISTA, 2004) en el uso de estos métodos, comprende principalmente a las especies agronómicas de semillas grandes (granos), y advierte que hay una correlación baja entre el envejecimiento artificial y la calidad en semillas pequeñas, como las de flores, hortalizas y pastos (Halmer, 2000). Sin embargo, no se han estudiado suficientes variantes en condiciones extremas de temperatura y humedad de deterioro en estas semillas.

México es centro de origen de especies del género *Physalis*. El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) forma parte de la cocina mexicana como ingrediente básico. La producción de esta hortaliza se ha incrementado en los últimos años; en 2006 ocupó el quinto lugar dentro de las especies hortícolas con un millón de toneladas (SIAP, 2006). La producción se destina tanto para el mercado nacional como para exportación, principalmente a Estados Unidos. A pesar de su importancia, los estudios relacionados sobre esta especie todavía son escasos, en especial la investigación relacionada con los aspectos de deterioro y calidad de semilla. Pérez-Camacho *et al.* (2008) estimaron una tasa anual de pérdida de germinación de 8.7 % por envejecimiento natural. Las razones de esta pérdida no han sido aun totalmente clarificadas.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del deterioro artificial de semilla de *P. ixocarpa* en la composición de ácidos grasos, respiración, germinación y vigor.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1

Se utilizó semilla de tomate de cáscara de la variedad CHF1-Chapingo (Figura A1), producida durante el ciclo otoño-invierno de 2006, en un invernadero con cubierta de plástico y sin control ambiental ubicado en Chapingo, Estado de México. La cosecha de frutos se hizo en la última semana de enero de 2007 (Figura A2). La semilla extraída del fruto se secó a temperatura ambiente bajo sombra y se benefició mediante limpieza y selección por tamaño en una máquina de aire-zarandas (tipo LALS, marca Kamas[®], Industri AB, Suecia). La semilla beneficiada se almacenó en bolsas de papel, en una bodega sin control de clima (18.2 ± 5 °C de temperatura y 41 ± 10 % de HR).

Durante 2007 se evaluaron seis tratamientos de envejecimiento acelerado aplicados a la semilla, más un testigo sin deterioro, para un total de siete tratamientos. Los seis tratamientos con envejecimiento resultaron de tres niveles de HR (55, 65 y 75 %) combinados con dos temperaturas (45 y 50 °C), impuestos durante 30 d como recomendaron Walters y Ross (1993). Para producir los niveles de HR indicados, se utilizaron recipientes de plástico de 267 mL con tapa hermética en cuyo interior se colocó una caja Petri con 5 g de semilla; enseguida se agregaron soluciones saturadas de cloruro de litio (LiCl) que se prepararon con 15.8, 12.6 y 9.6 g de LiCl y luego aforados a 50 mL de agua destilada. Las soluciones se colocaron dentro del recipiente de plástico de forma que rodearan a la caja Petri con la semilla, y una vez que se taparon herméticamente los tratamientos se pusieron a 45 y 50 °C en estufa durante 30 d. Como testigo se utilizó semilla sin envejecer almacenada a 18.2 ± 5 °C de temperatura y 41 ± 10 % de HR. Antes de aplicar la prueba de envejecimiento acelerado, la semilla se sometió a deshidratación por 72 h a 72 °C en una estufa (marca Central Scientific[®], CENCO Instruments Corporation, EE. UU.), y después se determinó su peso seco y su contenido de humedad con la fórmula de Bewley y Black (1994).

Inmediatamente después de aplicados los tratamientos de deterioro artificial se hizo una prueba de germinación para medir el efecto de éstos. Para esta prueba se sembraron tres repeticiones de 50 semillas por cada ambiente, distribuidos conforme a

un diseño completamente al azar. La siembra se hizo en agar bacteriológico estéril a 1 % (Figura A4), con las siguientes condiciones: 12 h luz y 12 h oscuridad (radiación $80 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), 70 % de HR y $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura, por 9 d. En esta prueba se evaluó el porcentaje de germinación (G) y la velocidad de emergencia de radícula (VER, radículas d^{-1}), esta última como expresión del vigor de la semilla. La VER se calculó con la fórmula de Maguire (1962), que se basa en el número de radículas emergidas cada 24 h.

Igualmente, a los tratamientos de semilla envejecida artificialmente se les determinó la peroxidación de ácidos grasos. La extracción y esterificación de ácidos grasos en semillas se hizo mediante el método de Priestley y Leopold (1979) (Figura A6), y la reacción de estratificación por el método de Morrison y Smith modificado por Priestley *et al.* (1985). Esta evaluación se hizo en un diseño completamente al azar con tres repeticiones.

El análisis de composición de ácidos grasos se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, ambos marca Finnigan[®] MAT CAQ (Alemania) (Figura A7). Las condiciones cromatográficas fueron: inyección mediante el modo de “dispersión de partícula”, temperatura del inyector $200 \text{ }^\circ\text{C}$, en una rampa de temperaturas del horno programada desde $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (3 min al inicio) hasta $250 \text{ }^\circ\text{C}$ (por 4 min) con aumentos de $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. La columna del cromatógrafo de gases fue del tipo DB-1 (Dimetilpolisiloxano). Se utilizó helio como gas acarreador, a una velocidad de 35 cm s^{-1} . Las condiciones del detector de masas fueron: temperatura de la línea de transferencia de $250 \text{ }^\circ\text{C}$, intervalo de 20 a 400 reacciones de masa-carga (m/z), polaridad positiva, temperatura de la fuente de iones de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ e ionización de impacto electrónico a 70 electro-volts (eV). Se inyectaron $2 \mu\text{L}$ de la fase orgánica del extracto. Los estándares metílicos de los ácidos grasos se identificaron con los tiempos de retención de estándares y con los patrones de fragmentación obtenidos de bibliotecas de referencia NIST (National Institute of Standards and Technology).

Experimento 2

Se utilizó semilla de la misma variedad, producida en campo abierto en Chapingo, México durante el ciclo primavera-verano 2007 y cosechada en la última semana de junio de 2007. La extracción, secado, beneficio y almacenamiento de las semillas fueron iguales que en el Experimento 1. Igualmente, se hizo una determinación de humedad de la semilla antes de aplicar la prueba de envejecimiento acelerado en septiembre de 2007.

En este caso la prueba de envejecimiento acelerado se hizo durante 30 d a una sola temperatura (50 °C) con siete niveles de humedad (50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80 % de HR), que se generaron con 17.5, 15.8, 14.2, 12.6, 11.1, 9.6 y 8.1 g de LiCl aforados a 50 mL de agua destilada. También se usaron lotes de semilla de 5 g en recipientes de plástico. Como testigo se utilizó semilla sin envejecer. En las semillas envejecidas se hizo una prueba de germinación en papel filtro (Figura A3), con tres repeticiones de 50 semillas, de acuerdo con un diseño completamente al azar; las condiciones de temperatura, luz y humedad fueron las mismas que el Experimento 1. En el Experimento 2 se evaluó el porcentaje de germinación (G) y la velocidad de emergencia de radícula (VER, radículas d⁻¹).

Además, a la semilla envejecida se le midió su cinética respiratoria con un cromatógrafo de gases modelo HP 5890[®] (Hewlett Packard, EE. UU.) a las 72 h de haber iniciado el proceso de imbibición-germinación. Tales mediciones se hicieron en tres repeticiones de 50 semillas, de acuerdo con un diseño completamente al azar. Las 50 semillas se colocaron en frascos de vidrio de 36 mL que se cerraron herméticamente con un tapón de plástico. El CO₂ de cada frasco se midió después de 1 h de haberlo tapado; se extrajo 1 mL de aire con CO₂ de cada frasco con una jeringa para insulina, y se inyectó en el cromatógrafo de gases. El CO₂ liberado por respiración se determinó calculando el área bajo la curva de cada muestra, y los datos se transformaron a mL h⁻¹.

Los análisis estadísticos se hicieron con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002). Los datos de las variables medidas en porcentaje se transformaron mediante la fórmula arco seno $\sqrt{X/100}$. Se efectuaron pruebas de comparación de

medias (Tukey, 0.05) y el análisis de regresión del porcentaje de germinación y la velocidad de emergencia de la radícula sobre la cinética de respiración. Además se ajustaron curvas sigmoidales a los datos observados con el programa Curve Expert 1.3. Las gráficas se elaboraron en una hoja de cálculo Microsoft Excel 2007.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido inicial de humedad de las semillas fue de 6 % en el Experimento 1, y de 7 % en el Experimento 2, valores que se consideran no interfieren con las variables respuesta porque en semillas secas los procesos biológicos son más lentos que en semillas húmedas.

Experimento 1

La transesterificación realizada mediante cromatografía de gases acoplada con un espectrómetro de masas, permitió definir la presencia de los siguientes ácidos grasos en semillas de tomate de cáscara, con base en el tiempo de retención: palmítico, linoleico, oleico, esteárico y heptadecanoico (estándar interno) (Figura 4.1). Con esta técnica no se detectó la presencia de otros ácidos en las semillas, ya que el método utilizado es específico para ácidos grasos (Priestley y Leopold, 1979; Priestley *et al.*, 1985).

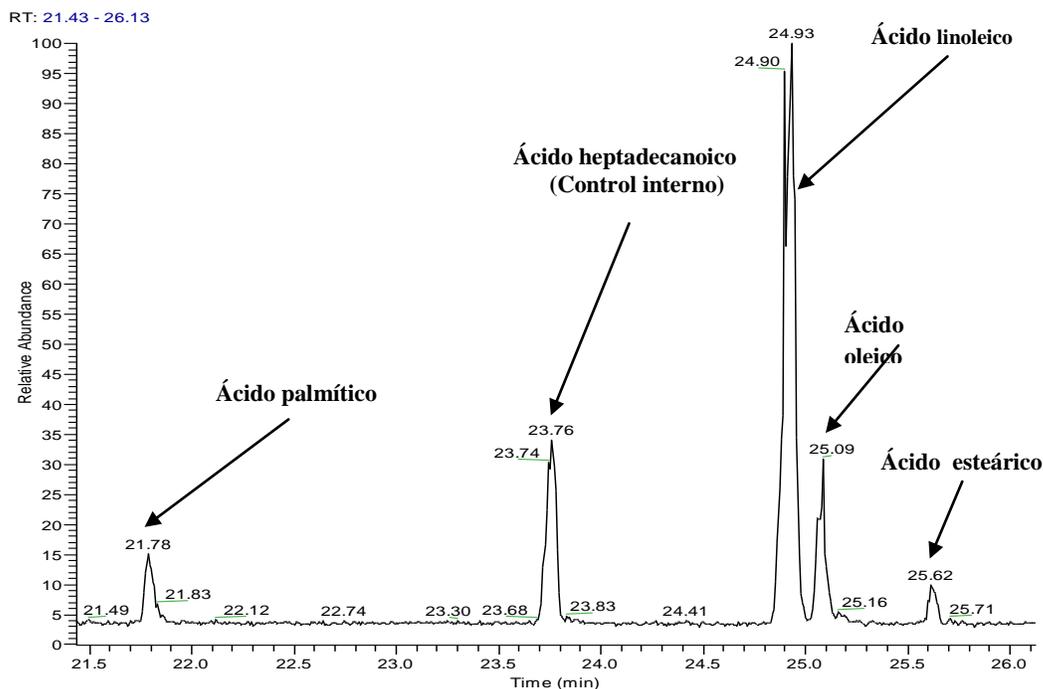


Figura 4.1. Cromatógrama de ácidos grasos presentes en semillas de tomate de cáscara. RT= tiempo de retención.

Los análisis de varianza de los contenidos de ácidos grasos y de la germinación en agar (Cuadro 4.1), mostraron que los tratamientos de envejecimiento no afectaron la composición de ácidos grasos de las semillas de tomate de cáscara, excepto al ácido palmítico ($P \leq 0.05$). En contraste, los tratamientos afectaron ($P \leq 0.01$) a la germinabilidad (G) y a la velocidad de emergencia de radícula (VER, radículas d^{-1}). En estas respuestas influyó que las variables G y VER tuvieron bajos coeficientes de variación ($\leq 15\%$), mientras que los ácidos grasos presentaron altos coeficientes de variación ($> 27\%$), lo que se atribuye a la heterogeneidad de las semillas en cuanto a su composición de ácidos grasos.

Cuadro 4.1. Cuadrados medios y significancia estadística en el contenido de ácidos grasos, germinación y velocidad de emergencia de radícula de semillas de tomate de cáscara, en siete tratamientos de deterioro artificial.

FV	GL	Contenido de ácidos grasos ($mg\ g^{-1}$ de semilla)				G (%)	VER (radículas d^{-1})
		Palmítico	Linoleico	Oleico	Estéarico		
Tratamientos	6	1.0 *	4039.9	22.4	0.1	1964.8 **	309.9 **
Error	12	0.2	1924.8	10.5	0.1	42.1	3.8
CV (%)		27.7	65.9	76.9	37.9	10.5	14.5

* = Significativo con $P \leq 0.05$; ** = Altamente significativo con $P \leq 0.01$; FV = Fuentes de variación; CV = Coeficiente de variación; GL = Grados de libertad; G = Germinación; VER = Velocidad de emergencia de radícula.

Entre los ácidos grasos cuantificados, el linoleico fue el de mayor concentración con 87.3 a 93.1 % del total, seguido del oleico con 4.4 a 6.9 %, el palmítico con 1.4 a 4.2 % y del esteárico con 0.6 a 2 % (Cuadro 4.2); los dos primeros ácidos grasos son insaturados y los otros dos saturados. En semillas, los ácidos grasos insaturados se ubican primordialmente en la membrana celular (Walters *et al.*, 2005; Gómez-Tejero *et al.*, 2006; Panobianco y Vieira, 2007). Por ello se infiere que la mayor parte de los ácidos observados en las semillas de tomate de cáscara, provienen de las membranas celulares.

El tratamiento que mostró un mayor nivel de ácido palmítico fue el de 50 °C y 75 % de HR (tratamiento 6), nivel que fue similar al del testigo sin envejecimiento y al del tratamiento de 45 °C y 75 % de HR (tratamiento 3). Puesto que los tratamientos 6 y 3 coinciden en haber recibido la máxima HR entre los niveles estudiados, se puede inferir que una alta HR durante el almacenamiento afectará poco el nivel de este ácido graso en la semilla de tomate de cáscara, y que las diferencias detectadas ocurrirían más bien en HR intermedias, de 55 a 65 %. La hipótesis de la reparación metabólica establece que puede haber condiciones en las cuales se contrarrestan los efectos nocivos del envejecimiento (Wilson y McDonald, 1986). Una hidratación previa o posterior puede prevenir o reparar los daños causados por los radicales libres, como consecuencia de la capacidad del agua para desactivar dichas sustancias. En este trabajo, es posible que a 75 % de HR haya habido una hidratación de la semilla, la cual haya contrarrestado el efecto dañino de los radicales libres, efecto que parece haber sido más grande en la temperatura de 50 °C. Los ácidos linoleico, oleico y esteárico no mostraron cambios significativos ya que en todos los tratamientos de envejecimiento acelerado el contenido de éstos ácidos fue estadísticamente similar al del testigo (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Efecto de la temperatura y humedad relativa en el contenido de ácidos grasos, en la germinación y el vigor de semillas de tomate de cáscara sometidas a tratamientos de deterioro artificial.

TE (°C)	HR (%)		Contenido de ácidos grasos (mg g ⁻¹ de semilla)				G (%)	VER (radículas d ⁻¹)
			Palmitico	Linoleico	Oleico	Estearico		
18	41	(Testigo)	1.8 ab	46.0 a	3.3 a	1.0 a	98.7 a	25.7 a
45	55		1.5 b	56.8 a	2.7 a	0.7 a	95.0 a	19.6 b
45	65		1.2 b	35.1 a	2.7 a	0.4 a	94.7 a	21.0 ab
45	75		1.6 ab	32.9 a	2.5 a	0.7 a	88.3 a	18.7 b
50	55		1.2 b	78.7 a	4.1 a	0.5 a	82.0 a	6.5 c
50	65		1.3 b	77.3 a	3.9 a	0.8 a	46.0 b	2.1 cd
50	75		2.8 a	138.5 a	10.2 a	0.8 a	7.3 c	0.4 d
DMS			1.3	125.4	9.2	0.8	19.3	5.6
CV (%)			27.7	65.9	76.9	37.9	10.5	14.5
Promedio			1.7	66.5	4.2	0.7	73.1	13.4

TE = Temperatura; HR = Humedad relativa; G = Germinación; VER = Velocidad de emergencia de radícula; DMS = Diferencia mínima significativa; CV = Coeficiente de variación. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

De manera general se esperaba que hubiera una menor concentración de los ácidos grasos en la semilla más deteriorada y con menor germinación y vigor, ya que según Panobianco y Vieira (2007) los ácidos grasos de las membranas disminuyen conforme el deterioro de la semilla es mayor, como se observó en semilla de *Lycopersicon esculentum* Mill. (Wilson y McDonald, 1986). Sin embargo, no siempre ocurre esto, ya que en semillas de *Glycine max* L. (Priestley y Leopold, 1979; Trawatha *et al.*, 1995) y *Helianthus annuus* (Bailly *et al.*, 2002) no se detectó decremento en los ácidos grasos conforme se acentuó el deterioro de las semillas.

En un análisis de varianza adicional (datos no presentados), efectuado aquí con la finalidad de observar los efectos individuales y de la interacción de temperatura y humedad de almacenamiento en el que no se incluyó el testigo, se encontró que el

ácido linoleico fue afectado ($P \leq 0.05$) positivamente por la temperatura, ya que al incrementar la temperatura de 45 °C a 50 °C la concentración de este ácido pasó de 56.8 a 138.5 mg g⁻¹ de semilla. Un comportamiento similar no ha sido reportado en la literatura.

En la prueba de germinación (Cuadro 4.2), el testigo sin envejecimiento fue el que tuvo la mayor G y VER, en comparación con los tratamientos de envejecimiento acelerado. La G disminuyó en promedio 17 % y la VER en 75 % al subir la temperatura de 45 °C a 50 °C. A 50 °C y 75 % de HR la G disminuyó en 93 % y la VER en 99 % con respecto al testigo, lo que evidenció un efecto significativo de la interacción de ambos factores en el deterioro de las semillas. El incremento en la HR a temperatura constante de 45 °C no redujo significativamente la G, ya que ésta se mantuvo por arriba del 85 % establecido en norma (ISTA, 2004), mientras que el aumento de HR en 50 °C provocó una disminución constante en la germinación (G), hasta bajar a 7 % con 75 % de HR. En cuanto a los daños por calor, Bhering *et al.* (2006) en semilla de *Capsicum frutescens* L. reportaron que la aplicación de calor de 45 °C en periodos de 72 a 96 h en 100 % de HR en el envejecimiento acelerado, provocó efectos más drásticos que un periodo prolongado de exposición al envejecimiento sin calor.

Según Salinas *et al.* (2001), los resultados de la prueba de germinación pueden ser utilizados para clasificar los lotes de semilla por su vigor. Esta clasificación considera que los lotes de semilla envejecidos artificialmente que presenten una germinación superior a 80 % podrían ser clasificados como de alto vigor, entre 60-80 % como de vigor medio, y menores de 60 % como de bajo vigor. A partir de esta clasificación, en el presente estudio se puede inferir que el testigo, las semillas envejecidas a 45 °C y las tratadas a 50 °C y 55 % de HR mantienen un alto nivel de germinabilidad (> 80 %) y por tanto tendrían un alto vigor, mientras que las semillas tratadas a 50 °C y HR ≥ 65 % pierden vigor (< 60 % en germinabilidad).

El mayor índice de velocidad de emergencia de radícula lo tuvo el testigo sin envejecimiento, con 25.7 radículas d⁻¹ (Cuadro 2). De igual manera que en la variable G, el incremento de la HR a una temperatura constante de 45 °C no redujo notoriamente la VER. Por el contrario, el incremento en la HR a temperatura de 50 °C

provocó una disminución significativa en la VER; así, con 55 % de HR la VER disminuyó a 6.47 radículas d⁻¹ (pérdida de 75 % con respecto al testigo), y con 75 % de HR la VER disminuyó a 0.4 radículas d⁻¹ (pérdida de 98 % con respecto al testigo).

En general, estos resultados mostraron que el aumento de calor a 50 °C asociado con HR ≥ 65 %, causa deterioro en el desempeño germinativo de las semillas de tomate de cáscara, que se refleja directamente en disminución de G y VER. Además, se hizo evidente que la disminución de los valores de G y VER (vigor), no estuvieron asociados con el contenido de ácidos grasos.

Experimento 2

Con base en los resultados del Experimento 1, en el segundo experimento solamente se usó la temperatura de 50 °C combinada con siete niveles de HR, para inducir el deterioro en las semillas de tomate de cáscara recién cosechadas en junio de 2007. El análisis de varianza (Cuadro 4.3) mostró que los tratamientos de envejecimiento acelerado afectaron ($P \leq 0.01$) a G, a VER y a la actividad respiratoria medida a las 72 h de imbibición. Los coeficientes de variación en todas las variables fueron bajos (< 15 %), lo cual denota homogeneidad de datos y confiabilidad en los resultados.

Cuadro 4.3. Cuadrados medios y significancia estadística de la germinación en papel filtro y actividad respiratoria de semillas de tomate de cáscara envejecidas en siete niveles de HR a 50 °C.

Fuente de variación	GL	Germinación (%)	VER (radículas d ⁻¹)	Respiración (mL de CO ₂ g ⁻¹ h ⁻¹)
Tratamientos de EA	7	3982.9 **	222.9 **	0.24 **
Error	14	12.7	1.6	0.0004
CV (%)		7.7	14.2	6.7

** = Altamente significativo con $P \leq 0.01$; GL = Grados de libertad; VER = Velocidad de emergencia de radícula; CV = Coeficiente de variación.

La comparación de medias (Figura 4.2A) mostró que los tratamientos a 50 °C y HR hasta de 60 % no produjeron deterioro en la G, pues en estos tratamientos la G se mantuvo alta, por arriba de 85 % (ISTA, 2004), y fue estadísticamente similar al testigo cuya germinación fue de 95 %. Pero cuando la HR fue igual o superior a 65 % la germinación se redujo a 73 %, que es inferior al de la norma. Conforme aumentó la HR, la G disminuyó aún más, de modo que a 50 °C y 70 % de HR, la G sólo fue 2 %; a partir de 75 % de HR el deterioro artificial fue letal (0 % de G) para las semillas de tomate de cáscara (Figura A5)

La clasificación del vigor con base en los resultados de la prueba de germinación después del envejecimiento acelerado según la consideración de Salinas *et al.* (2001), fue la siguiente: la semilla testigo (18 °C y 41 % HR) y las semillas a 50 %, 55 % y 60 % de HR y 50 °C presentaron un vigor alto, mientras que las semillas expuestas de 65 % a 80 % de HR tuvieron un vigor bajo.

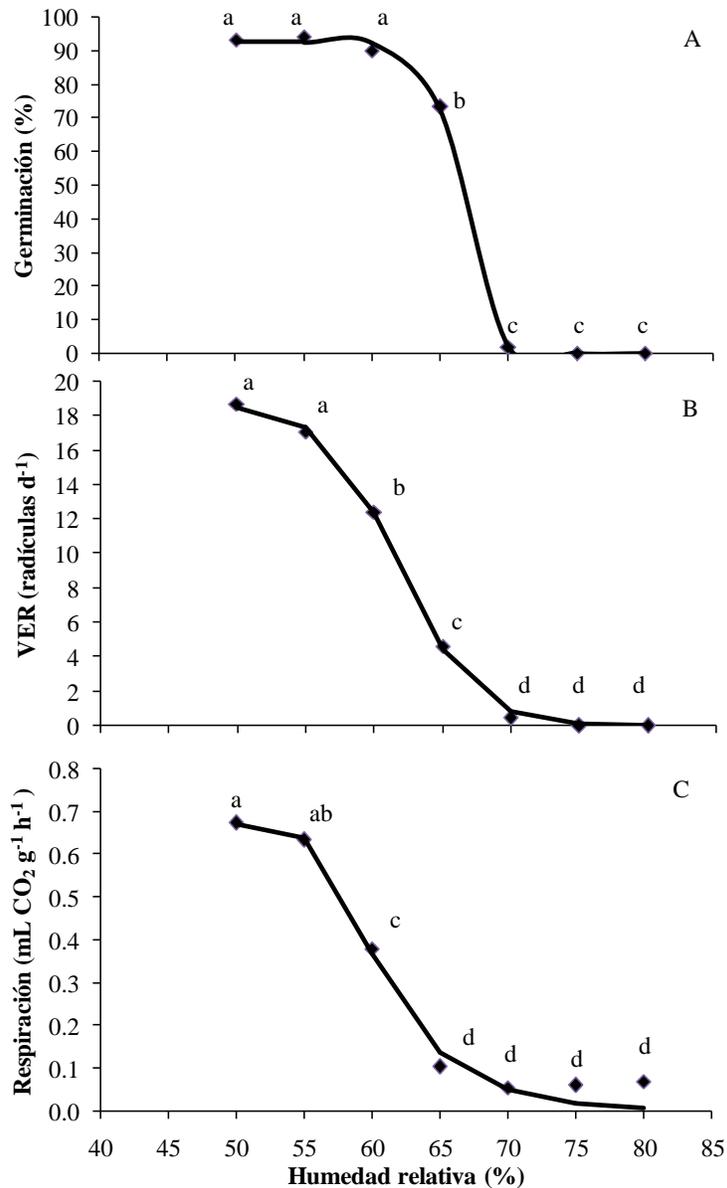


Figura 4.2. Efecto de la humedad relativa en el envejecimiento acelerado de semillas de tomate de cáscara almacenadas a 50 °C. A) Germinación. Modelo logístico del porcentaje de germinación: $y = 92.62/(1+1029675 \cdot \text{EXP}(1.0117x-80.9))$ ($n = 7$; $P < 0.01$; $r^2 = 0.99$), donde “y” es el porcentaje de germinación. B) Velocidad de emergencia de la radícula (VER). Modelo logístico de la velocidad de emergencia de la radícula: $y = 18.73/(1+821.7 \cdot \text{EXP}(0.36927x-29.54))$ ($n = 7$; $P < 0.01$; $r^2 = 0.99$), donde “y” es la velocidad de emergencia de la radícula. C) Cinética respiratoria de las semillas a las 72 h después de la imbibición. Modelo de Richards de la cinética de respiración: $y = 0.67059442/(1+\text{EXP}(0.745999x-42.65))^{0.270394}$ ($n = 7$; $P < 0.01$; $r^2 = 0.99$), donde “y” es la cinética de respiración de las semillas de tomate de cáscara a 72 h después del inicio de la imbibición. En todos los casos “x” es el porcentaje de humedad relativa. Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey, $P \leq 0.05$).

Las mayores VER se registraron en el testigo (18 °C y 41 % HR) y a 50 °C y 50 % de HR (Figura 4.2B), con 18.7 radículas d⁻¹; aún a 55 % de HR se obtuvo un índice VER alto (>16). Pero a 60 % de HR la VER disminuyó significativamente, y fue nula a partir de 75 % de HR. Es decir, G y VER disminuyeron sigmoidealmente conforme aumentó la humedad relativa, lo que demuestra que el incremento de este factor ambiental provoca deterioro de la semilla a 50 °C. En este experimento la VER mostró el mismo comportamiento que la G.

La mayor actividad respiratoria a 72 h de iniciada la imbibición fue con 50 °C y 50 % HR (0.67 mL de CO₂ g⁻¹ h⁻¹) (Figura 4.2C). La semilla seca (Testigo a 18 °C y 41 % HR), la cual no se sometió al proceso de imbibición, mostró una actividad respiratoria alta, con 0.60 mL de CO₂ g⁻¹ h⁻¹ pero significativamente más baja que el punto de mayor actividad respiratoria. La actividad respiratoria empezó a disminuir a 60 % de HR y más rápidamente a 65 % de HR, hasta alcanzar una tasa muy baja (0.5 mL de CO₂ g⁻¹ h⁻¹). La cinética de reducción de la actividad respiratoria por efecto del incremento en la humedad relativa también tuvo un comportamiento sigmoideal. Lo anterior demuestra que con alta humedad relativa combinada con calor de 50 °C ocurre una disminución de la respiración con la consecuente baja en la generación de energía metabólica requerida para la germinación como indican De Visser *et al.* (1990). Esta disminución de la actividad respiratoria en el proceso de envejecimiento de las semillas de maíz se atribuyó a la reducción del nivel de traslocación de los sustratos necesarios para el eje embrionario y a la pérdida de reservas almacenadas (Cruz-Pérez *et al.*, 2003).

El deterioro de la semilla está asociado con cambios en su metabolismo como la disminución de carbohidratos que ocurre con la edad de la semilla, lo cual podría resultar en insuficiencia de sustratos respiratorios para la germinación o en la incapacidad para usarlos. Por ello, un signo del deterioro de la semilla es una disminución significativa de su tasa respiratoria (Bernal-Lugo y Leopold, 1992; Cruz-Pérez *et al.*, 2003). En la semilla de tomate de cáscara, Pérez-Camacho *et al.* (2008) encontraron que la disminución de reservas explica en gran parte las pérdidas de germinación y vigor de la semilla.

La cinética de la actividad respiratoria a las 72 h (Figura 4.3) podría considerarse una prueba temprana de la calidad fisiológica de un lote de semillas, ya que se asocia linealmente con la germinación y la velocidad de emergencia de la radícula; es notable que la cinética de respiración explique en 95 % la variación en VER. En la germinación se observó un punto crítico cuando la tasa de respiración es $0.11 \text{ mL CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$; con valores inferiores a este punto crítico se reduce el porcentaje de germinación -a una tasa alta- de 76 % a 0 %, mientras que con valores superiores sólo se reduce la germinación en 19 %. Sundstrom y Edwards (1989) también propusieron que la actividad respiratoria en semillas de *Capsicum annuum* L. puede servir como un indicador confiable del vigor de semilla, ya que tasas altas de respiración correlacionaron con germinación alta y con una rápida emergencia de radícula.

La disminución en la tasa respiratoria también puede asociarse con la pérdida de la permeabilidad de membranas, ya que ésta provoca la pérdida masiva de azúcares, iones inorgánicos y aminoácidos, entre otros componentes celulares, que pueden quedar en concentraciones inferiores a las óptimas necesarias para la respiración (Bewley y Black, 1994). Con base en los resultados aquí observados en los procesos fisiológicos evaluados (contenido de ácidos grasos, vigor y actividad respiratoria), se infiere que la disminución de la actividad respiratoria fue la principal causante de deterioro en la semilla de tomate de cáscara, que tal vez se deba a la reducción en las reservas y en la energía disponible para los procesos de germinación y crecimiento en las plántulas.

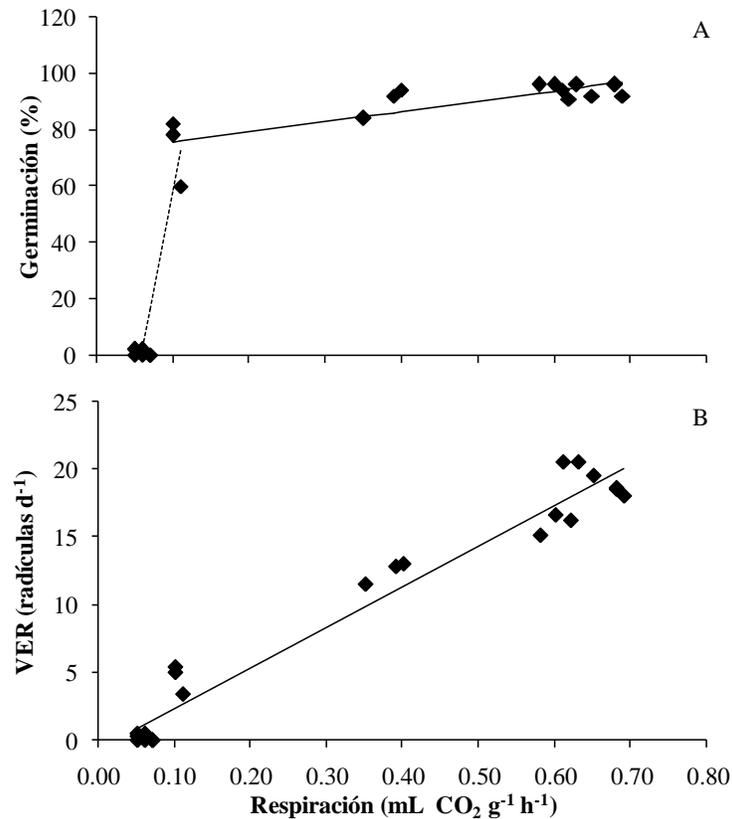


Figura 4.3. Cinética respiratoria de semillas ($\text{mL CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) a 72 h después del inicio de la imbibición, sobre: A) Porcentaje de germinación. Modelo lineal del porcentaje de germinación: Si $x \leq 0.11$ entonces $y = 1410.5x - 82.252$ ($n = 12$; $P < 0.01$; $r^2 = 0.77$); si $x > 0.11$ entonces $y = 36.068x + 71.978$ ($n = 15$; $P < 0.01$; $r^2 = 0.66$), donde “y” es el porcentaje de germinación. B) Velocidad de emergencia de radícula. Modelo lineal de la velocidad de emergencia de radícula: $y = 30.14x - 0.72$ ($n = 24$; $P < 0.01$; $r^2 = 0.95$), donde “y” es la velocidad de emergencia de radícula. En todos los casos “x” es la cinética respiratoria de las semillas a 72 h después de iniciada la imbibición.

4.4. CONCLUSIONES

El deterioro de la semilla de tomate de cáscara mediante envejecimiento artificial causó una disminución drástica en la germinación y en la emergencia de radícula.

El tratamiento de 50 °C combinado con 65 % de humedad relativa provocó una disminución de 63 % de germinación en promedio. De igual manera, la velocidad de emergencia de radícula disminuyó 75 % al subir la temperatura de 45 a 50 °C.

Los tratamientos de envejecimiento acelerado no cambiaron significativamente la composición de ácidos grasos en las semillas.

La respiración de la semilla declinó a valores inferiores a 0.1 mL de CO₂ g⁻¹ h⁻¹ a partir del tratamiento de 50 °C y 65 % de humedad relativa, lo que correlacionó positivamente con la pérdida de germinación ($r = 0.84$; $P \leq 0.01$) y velocidad de emergencia de radícula ($r = 0.98$; $P \leq 0.01$).

En esta especie el deterioro germinativo de las semillas no se asoció con cambios en el contenido de ácidos grasos de las membranas celulares.

Por ello, el decremento de la calidad fisiológica se puede explicar por la disminución de la respiración y, consecuentemente de la energía disponible para la germinación y vigor de la semilla.

4.5. LITERATURA CITADA

- Bailly C., R. Bogatek-Leszczynska, D. Come, and F. Corbineu. 2002. Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Seed Science Research* 12:47-55.
- Bernal-Lugo I. and A. C. Leopold. 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiology* 98:1207-1210.
- Bewley J. D. and M. Black. 1994. *Seeds. Physiology of Development and Germination.* Second Edition. Plenum Press. New York, USA. 445 p.
- Bhering M. C., D. C. Fernandes D. S. D., D. De Souza V. y D. D. S. Portocarrero N. 2006. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de pimenta. *Revista Brasileira de Sementes* 28:64-71.
- Bradford K. J. 2004. *Seed Production and Quality.* First Edition. Department of Vegetable Crop and Weed Science. University of California. Davis CA, USA. 134 p.
- Cruz-Pérez A. B., V. A. González-Hernández, M. C. Mendoza-Castillo y M. L. Ortega-Delgado. 2003. Marcadores fisiológicos de la tolerancia al envejecimiento de semilla en maíz. *Agrociencia* 37:371-381.
- Dell'Aquilla A. 1994. Wheat seed ageing and embryo protein degradation. *Seed Science Research* 4:293-298.
- 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 Physiology* 93:668-672.
- Gómez-Tejero J., J. Jasso-Mata, J. J. Vargas-Hernández y M. R. Soto-Hernández. 2006. Deterioro de semilla de dos procedencias de *Swietenia macrophylla* King., bajo distintos métodos de almacenamiento. *Ra Ximhai* 1:223-239.
- Halmer P. 2000. Commercial seed treatment technology. *In: Seed Technology and its Biological Basis.* M. Black and J. D. Bewley (eds.). Sheffield Academic Press. UK. pp: 257-286.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. *International Rules for Seed Testing. Rules 2004.* ISTA Editions. Zurich, Switzerland. 243 p.

- Maguire J. D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2:176-177.
- Melo R. V. y O. Cuamatzi T. 2008. *Bioquímica de los Procesos Metabólicos*. Segunda edición. Ediciones Reverté. México, D.F. 406 p.
- Nogarajan S. and V. K. Pandita. 2001. Improvement in germination characteristics in artificially aged seeds tomato by osmoconditioning. *Seed Research* 29:136-140.
- Panobianco M. and R. D. Vieira. 2007. Electrical conductivity and deterioration of soybean seeds exposed to different storage conditions. *Revista Brasileira de Sementes* 29:97-105.
- Pérez-Camacho I., O. J. Ayala-Garay, V. A. González-Hernández, J. A. Carrillo-Salazar, A. Peña-Lomelí y G. García-de los Santos. 2008. Indicadores morfológicos y fisiológicos del deterioro de semillas de tomate de cáscara. *Agrociencia* 42:891-901.
- Priestley D. A. and A. C. Leopold. 1979. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiology* 63:726-729.
- Priestley D. A., B. Werner, A. C. Leopold, and M. McBride. 1985. Organical free radical levels in seeds and pollen: The effects of hydration and aging. *Physiologia Plantarum* 64:88-94.
- Salinas A. R., A. M. Yoldjian, R. M. Cravioto y V. Bisaro. 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 36:371-379.
- SAS Institute. 2002. *User's Guide of SAS (Statistical Analysis System)*. SAS Institute Inc. Cary, N. C. USA. 550 p.
- SIAP. 2006. *Anuario del Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pecuaria*. Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeanuadim.html. Consultado el 14 de marzo de 2007.
- Sundstrom F. J. and R. L. Edwards. 1989. Pepper seed respiration, germination, and seedling development following seed priming. *HortScience* 24:343-345.

- Trawatha S. E., D. M. TeKrony, and D. F. Hildebrand. 1995. Relationship of soybean seed quality to fatty acid and C₆-aldehyde levels during storage. *Crop Science* 35:1415-1422.
- Wallis J., J. Shockey, and J. Browse. 2000. Seed oils and their metabolic engineering. *In: Seed Technology and its Biological Basis*. M Black, J D Bewley (eds.). Sheffield Academic Press. Great Britain. pp:121-159.
- Walters C. and E. Ross. 1993. Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research* 3:201-213.
- Walters C., P. Landré, L. Hill, F. Corbineau, and C. Bailly. 2005. Organization of lipid reserves in cotyledons of primed and aged sunflower seeds. *Planta* 222:397-407.
- Wilson D. O. and M. B. McDonald. 1986. The lipid peroxidation model of seed deterioration. *Seed Science and Technology* 14:269-300.

CAPÍTULO V. UN MODELO DEL DETERIORO DE SEMILLA DE TOMATE DE CÁSCARA

RESUMEN

Los factores ambientales más importantes que afectan la viabilidad de semillas almacenadas son el contenido de humedad de la semilla y la temperatura de almacenamiento. En esta investigación se hizo un modelo para estimar la viabilidad de la semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) a través del tiempo en condiciones de almacenamiento sin control de temperatura ni de humedad relativa. El contenido de humedad de la semilla se calculó en función de la temperatura y la humedad relativa del almacén, y la viabilidad de las semillas con la ecuación de Ellis y Roberts. Se calibraron λ de la ecuación para calcular el contenido de agua de la semilla, así como los parámetros C_H , C_W , C_Q , y K_i , simultáneamente y por separado, con los métodos de optimización Marquardt y Simplex mediante mínimos cuadrados ordinarios, para minimizar la diferencia entre el porcentaje de viabilidad modelado y observado. Como medidas de sesgo se calcularon el error medio de la diferencia entre valores observados y modelados (MBE), error medio en porcentaje (MPE) y la raíz cuadrada de la diferencia media (RMSD). Con la λ calibrada (61.6) sugerida para tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), la predicción del contenido de humedad de la semilla estuvo en el rango 5 a 14 %, el adecuado para preservar la semilla. El valor de λ calibrada fue 62 % superior al valor para tomate y con esto se obtuvo un promedio de 5 % de humedad de la semilla. La mejor calibración de la ecuación de viabilidad de Ellis y Roberts fue cuando se optimizaron simultáneamente C_H , C_W y K_i con el método Simplex; los parámetros variaron menos de 4.6 % en su valor original, el error medio en porcentaje fue 3.4 %, y el R^2 fue 0.97. Se calculó con el modelo que la viabilidad de la semilla fue mayor o igual a 85 % hasta 263 d de almacenamiento, y alcanzó 50 % de viabilidad en cuatro años y cinco meses.

Palabras clave: *Physalis ixocarpa*, modelo de viabilidad de semilla, contenido de humedad, longevidad de semilla.

5.1. INTRODUCCIÓN

Las semillas almacenadas en los bancos de germoplasma están expuestas a la humedad y temperatura ambiental y son los factores físicos que más afectan su conservación (Socorro *et al.*, 2007). Debido a su naturaleza higroscópica, las semillas se mantienen en equilibrio con la humedad relativa atmosférica (Copeland y McDonald, 2001), y tal equilibrio se alcanza cuando se exponen por varios días a dicha humedad relativa (Marques-Pereira y Marcal-de Queiroz, 1991). A su vez, la humedad relativa es altamente interdependiente de la temperatura ambiental, ya que la humedad relativa es la relación entre la presión de vapor actual sobre la presión de vapor a saturación, y la presión de vapor actual se calcula con base en la diferencia entre la temperatura del bulbo húmedo y seco de un psicrómetro (Marques-Pereira y Marcal-de Queiroz, 1991; Copeland y McDonald, 2001).

La mayoría de las semillas de los cultivos pierden rápidamente su viabilidad si se almacenan con 80 % de humedad relativa y de 25 a 30 °C, pero pueden conservarse 10 años o más con menos de 50 % de humedad relativa y menos de 5 °C (Copeland y McDonald, 2001). Harrington (1972) propuso que por cada 1 % de reducción en la humedad de la semilla o por cada 5 °C de reducción en la temperatura, se duplica su vida en almacén. La máxima longevidad de la semilla se alcanza con una humedad relativa entre 5 y 6 % (Copeland y McDonald, 2001).

Cuando las semillas almacenadas contienen alta humedad, se incrementan la actividad enzimática hidrolítica, la respiración y los ácidos grasos libres, por lo que, la humedad se considera el factor más crítico para su conservación (Copeland y McDonald, 2001). El alto contenido de agua acelera las reacciones que deterioran la semilla y actúa como solvente para la mayoría de las reacciones bioquímicas, de modo que su reducción disminuye la tasa de difusión de solutos y la actividad metabólica nociva (Vertucci y Roos, 1990; Vijay *et al.*, 2009).

Las temperaturas altas aumentan la velocidad de los procesos enzimáticos y metabólicos, y en consecuencia hay una mayor velocidad de deterioro, sobretodo cuando existe alto contenido de humedad en la semilla. En cambio, las altas

temperaturas combinadas con baja humedad de la semilla ejercen un efecto mínimo en el deterioro (Copeland y McDonald, 2001).

En almacenamiento a largo plazo, a bajas temperaturas y contenido de humedad bajo, las semillas se encuentran en estado vítreo (Williams y Leopold, 1989; Sun y Leopold, 1993; Sun *et al.*, 1998), estado que se produce por la acumulación de sacarosa, posiblemente en conjunción con oligosacáridos (como rafinosa), lo que contribuye a preservar la membrana y la estructura de las proteínas (Bradford, 2004). En estas circunstancias, la difusión de moléculas en el citoplasma es mínima y por consiguiente se inhibe el deterioro de la semilla. Pero cuando incrementa la temperatura o el contenido de humedad de la semilla, el estado sólido vítreo puede suavizarse a un estado de consistencia elástica o incluso a un estado líquido.

Los procesos que inician el envejecimiento de las semillas pueden depender de la temperatura de transición a la vitrificación (T_g) del citoplasma de las semillas (Sun y Leopold, 1994; Narayana *et al.*, 2003), por lo que las temperaturas de almacenamiento cerca o debajo de la temperatura de transición a la vitrificación pueden beneficiar marcadamente el almacenamiento a largo plazo (Sun y Leopold, 1994).

En diversas especies, se ha demostrado que la declinación de la viabilidad de un lote de semillas durante el almacenamiento seco sigue un patrón predecible. Generalmente hay un periodo de duración variable durante el cual la viabilidad permanece relativamente sin cambios, seguida por una baja pronunciada y con una cinética que puede considerarse sigmoideal (Bradford, 2004).

Ellis y Roberts (1980) propusieron un modelo de viabilidad de la semilla de una especie o genotipo, basado en la temperatura, la humedad relativa y en la calidad inicial de un lote de semillas (Bradford, 2004). Los parámetros del modelo pueden ser obtenidos experimentalmente para cada especie, y este modelo sirve para predecir el tiempo de almacenamiento de semillas en un rango amplio de condiciones. El proceso del modelo a un caso específico, consiste en transformar las curvas sigmoideas de reducción de la viabilidad de las semillas a través del tiempo a valores probit o unidades de probabilidad, lo cual convierte las curvas sigmoideas a líneas rectas (Bradford, 2004).

Cuando se transforman a probit, las líneas resultantes pueden ser paralelas (mismas pendientes) pero con diferentes interceptos (K_i) o viabilidad de semilla inicial. El inverso de la pendiente de la curva de viabilidad probit es igual a la desviación estándar del número de semillas muertas por unidad de tiempo (σ) o es una medida del tiempo que toma una unidad probit para declinar el porcentaje de viabilidad y está relacionada con la temperatura y humedad de almacenamiento. La ecuación de viabilidad de semilla es el método más ampliamente aceptado para cuantificar y predecir la longevidad de semilla en relación a las condiciones de almacenamiento (Bradford, 2004).

En esta investigación se calibraron los parámetros del modelo de la viabilidad de la semilla Ellis y Roberts para ajustarlo al deterioro natural de semillas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en condiciones de almacenamiento sin control de temperatura ni de humedad relativa, con el propósito estimar cuándo se alcanza el 85 y 50 % de viabilidad de la semilla.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El modelo

El modelo para calcular la viabilidad de la semilla de tomate de cáscara se basa en la siguiente función:

$$y = f(t, Tac, Hrc, c, pt) \dots\dots\dots Ec. 1$$

Donde:

t es el tiempo.

Tac es la temperatura de aire promedio durante el almacenamiento (°C).

Hrc es la humedad relativa del aire promedio durante el almacenamiento (%).

C es el contenido de humedad de la semilla (fracción de 0-1), y

pt es el vector de parámetros.

El modelo consistió de dos etapas. En la primera etapa se calculó el contenido de humedad de la semilla (C) en el rango de 0 a 1 con base en el trabajo de Socorro *et al.* (2007). Para esto inicialmente se integró diariamente la siguiente ecuación diferencial:

$$\int_{i=1}^n \frac{\partial m}{\partial t} = \frac{RTacL}{V_{PMA}} \ln \left[Hra \left(1 + A \text{Exp} \left(-\lambda \frac{m}{m + m_s} \right) \right) \right] \dots\dots\dots Ec. 2$$

Donde:

n es el número de días de almacenamiento.

m es la masa de agua contenida en la semilla (kg).

t es el tiempo.

R es la constante universal de los gases (8.31 J mol⁻¹ K⁻¹).

Tac es la temperatura del aire (°K).

L es un coeficiente fenológico que representa la permeabilidad de la testa al vapor de agua (1.0 x 10⁻¹⁷ m s⁻¹).

V_{PMA} es el volumen parcial molar del agua (18 x 10⁻⁶ m³ mol⁻¹).

ln es la función logaritmo natural.

Hra es la humedad relativa (fracción de 0-1).

A es una constante de integración (27.11).

Exp es la función exponente.

λ es un coeficiente con un valor de 38.02 para tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Socorro *et al.* 2007).

m_s es el peso de la biomasa seca de una semilla (kg), que en *Physalis ixocarpa* es 1.27×10^{-6} kg en promedio, valor que fue obtenido en forma experimental.

Una vez integrada la Ecuación 2, se calculó C:

$$C = \frac{m}{m + m_s} \dots\dots\dots \text{Ec. 3}$$

En la segunda etapa se calculó la viabilidad de las semillas con base en la ecuación de la viabilidad de Ellis y Roberts (1980). Se calculó la desviación estándar del número de semillas muertas por unidad de tiempo (σ):

$$\sigma = 10^{K_E - C_W \log(m) - C_H Tac - C_Q Tac^2} \dots\dots\dots \text{Ec. 4}$$

Donde:

K_E es 6.975 y considera las diferencias inherentes entre especies a la capacidad de almacenarse.

m es el contenido de humedad de la semilla (porcentaje de biomasa en fresco).

Tac es la temperatura de almacenamiento (°C) acumulada.

C_W es 3.47 y describe el efecto relativo del contenido de la humedad en la longevidad (Ellis y Roberts, 1981).

C_H es 0.0329 y **C_Q** es 0.000478; los efectos combinados de estas dos últimas constantes describen la respuesta de la longevidad de la semilla a la temperatura (Dickie *et al.*, 1990; Sinício, 2004).

La viabilidad de la semilla en una escala probit (pv), se calculó a través del tiempo con la siguiente ecuación (Ellis y Roberts, 1980):

$$pv = K_i - \frac{t}{\sigma} \dots\dots\dots \text{Ec. 5}$$

Donde:

K_i es la viabilidad inicial. Este coeficiente es 1.1575, el cual fue obtenido experimentalmente y se define como el intercepto al eje de las ordenadas. Se calculó después de linearizar la curva de viabilidad mediante la transformación del porcentaje de viabilidad observada a unidades probit con la función DISTRIBUCIÓN NORMAL ESTANDAR INVERSA (DISTR.NORM.ESTAND.INV) en Microsoft Excel (Bradford, 2004).

t es el tiempo de almacenamiento.

La viabilidad de la semilla en una escala probit (pv) se transformó a porcentaje de viabilidad de la semilla (v) con la siguiente ecuación:

$$v = \frac{1}{1 + \exp(-1.6478 pv)} \dots\dots\dots \text{Ec. 6}$$

Además, se calculó el tiempo (p) en que se reduce la viabilidad a 50 % (Hay, 2009) con la siguiente función:

$$p = \frac{K_i \sigma}{365} \dots\dots\dots \text{Ec. 7}$$

Como p es en días, se dividió entre 365 para obtener el tiempo en años.

Datos meteorológicos

Los promedios diarios de la temperatura del aire (Tac) y humedad relativa (Hrc) del 2000 a 2005 se obtuvieron a partir de registros obtenidos cada 10 minutos con un sensor Hobo[®] Onset Computer Corporation, en una bodega sin control de clima ubicada en Texcoco, México (19° 29' N, 98° 51' O y 2250 m de altitud) donde hay una temperatura promedio anual entre 12 y 18 °C con régimen de lluvias en verano de 600

mm en promedio. Se calculó la suma acumulada de la temperatura diaria, y se dividió entre el número de días transcurridos.

Datos observados

A cuatro muestras de 100 semillas de tomate de cáscara var CHF1-Chapingo cosechadas y almacenadas cada año en junio de 2000 a 2005 se les midió el porcentaje de viabilidad (v , %) mediante una prueba de germinación establecida el día 25 de junio 2005. Para la prueba de germinación, las semillas fueron depositadas en cajas petri sobre papel filtro humedecido y colocadas en una germinadora (ISTA, 2004). La humedad de la semilla fue 5 % en promedio de todos los años.

Construcción del modelo

El modelo (Figura 5.1) se construyó con el programa Model Maker ver. 4.0 (Cherwell Scientific Ltd.). La unidad de tiempo (t) fue un día y el modelo se operó por 1850 días, es decir por cinco años. Para la modelación, se partió en retrospectiva de la fecha en que se hizo la prueba de germinación. La integración de la Ecuación 2 se hizo con el método numérico Ruge-Kutta y se utilizó un valor inicial de $m = 9.62 \times 10^{-8}$ kg, el cual se obtuvo de un promedio de 50 semillas.

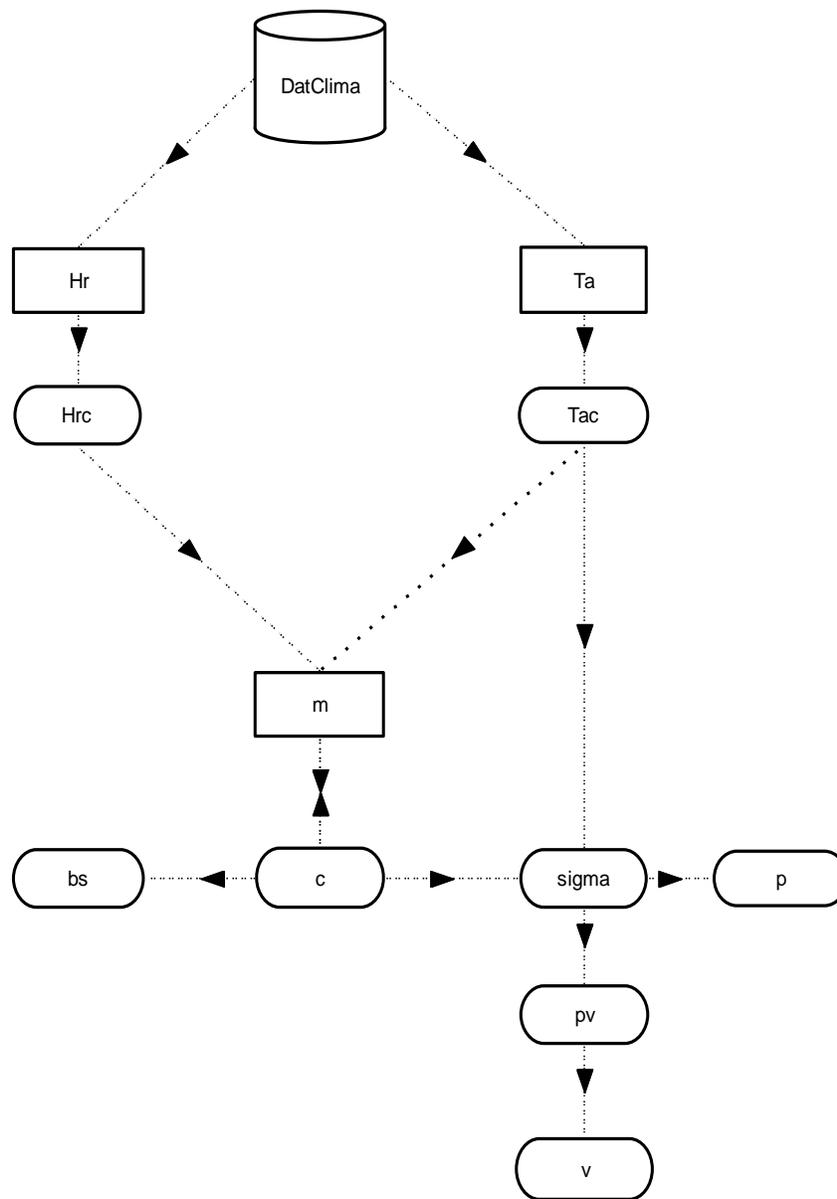


Figura 5.1. Diagrama de flujo del modelo de viabilidad de semilla de tomate de cáscara variedad CHF1-Chapingo, almacenada en una bodega sin control de clima ubicada en Texcoco, Estado de México, México. El cilindro es una unidad de acceso a un archivo de datos meteorológicos, los óvalos evalúan funciones y los rectángulos integran ecuaciones diferenciales. Las flechas representan el flujo del modelo entre variables. Hr = Humedad relativa promedio, Ta = Temperatura del aire promedio, Hrc = Humedad relativa acumulada, Tac = Temperatura del aire acumulada, m = Masa de agua contenida en la semilla, c = Contenido de humedad de la semilla, Sigma = Desviación estándar del número de semillas muertas por unidad de tiempo, pv = Viabilidad de la semilla en unidades probit, v = Viabilidad de la semilla en porcentaje, p = Tiempo en que se reduce la viabilidad al 50 %, y bs = Peso de la biomasa seca.

Calibración del modelo

El modelo se calibró a través de optimizar los parámetros C_H , C_W , C_Q , y K_i , ya sea individualmente o en conjunto, para minimizar la diferencia entre datos modelados y observados. Para esto se utilizaron los métodos Levenberg-Marquardt y Simplex con la opción de mínimos cuadrados ordinarios, disponible en el programa Model Maker.

Cálculo de medidas de sesgo

Se calcularon las siguientes medidas de sesgo con el propósito de determinar el error entre los valores modelados y observados en el modelo.

- a) Error medio de la diferencia entre observados y modelados (MBE)

$$MBE = \sum_{i=1}^n \frac{(\text{modelado}_i - \text{observado}_i)}{n} \dots\dots\dots Ec. 8$$

Donde n es el número de datos.

- b) Error medio en porcentaje (MPE)

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{|\text{modelado}_i - \text{observado}_i|}{\text{observado}_i} \right) * 100}{n} \dots\dots\dots Ec. 9$$

- c) Raíz cuadrada de la diferencia media (RMSD)

$$RMSD = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (\text{modelado}_i - \text{observado}_i)^2}{n} \right]^{0.5} \dots\dots\dots Ec. 10$$

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El modelo original (sin calibrar) produjo una cinética similar al deterioro natural de semillas (Figura 5.2), en la cual en la madurez fisiológica se tiene el porcentaje de germinación más alto, y a partir de ahí inicia un proceso continuo e irreversible de deterioro hasta perder su capacidad de germinación (Delouche, 2002). Sin embargo, el modelo original diverge de los datos observados, de manera que a los 1106 días se modela una viabilidad que es la mitad de la observada.

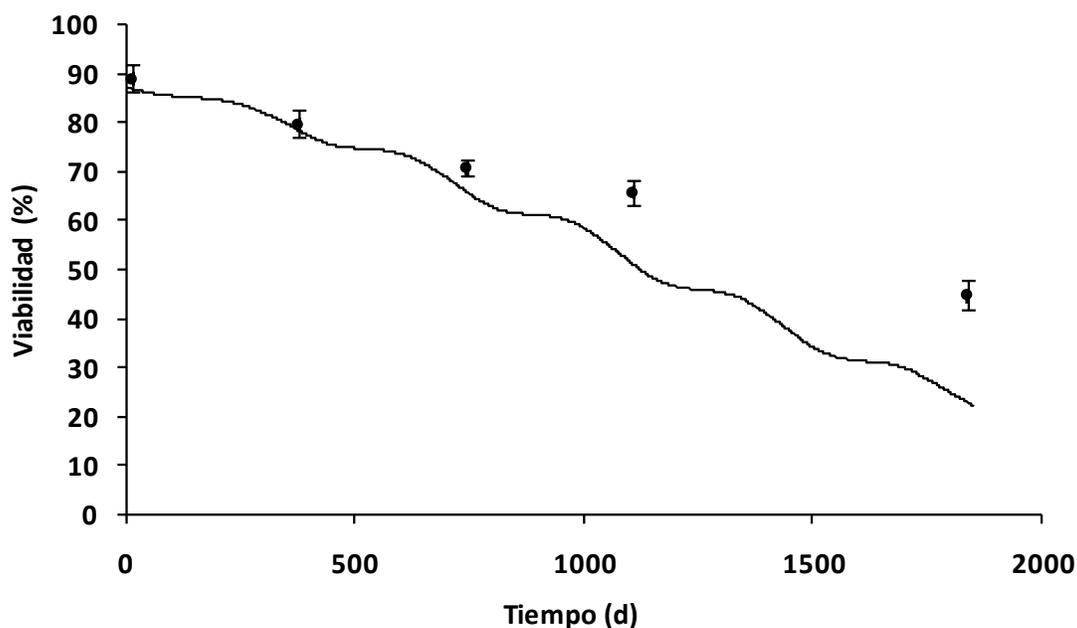


Figura 5.2. Porcentaje de viabilidad de semillas de tomate de cáscara (v) sin calibración de parámetros, modelada (línea continua) y datos observados (puntos con desviación estándar).

Calibración del modelo

En el modelo no calibrado, el contenido inicial de agua en la semilla es de 7 % e incrementa a 8 %, valor en el que se estabiliza (Figura 5.3). El valor de lambda (38.02) en la Ecuación 2 (contenido de agua en la semilla) corresponde al sugerido para tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Socorro *et al.*, 2007) y su calibración podría mejorar la estimación del porcentaje de humedad en la semilla (C en la Ecuación 3), debido a que refleja la permeabilidad de la testa al flujo de agua. Cuando se calibró lambda, el MPE

entre C modelada y observada fue 8.7 % mientras que sin calibración era 52 %. Sin embargo, lambda cambió a 61.6, lo cual es 62 % superior a lambda para tomate y fuera del rango de 37 a 55.8 presentado por Socorro *et al.* (2007) para semillas de diferentes especies. Este cambio tan alto de lambda para las semillas de tomate de cáscara puede atribuirse a que el contenido de humedad de la semilla observado (5 %) no corresponde con lo que se esperaría con almacenamiento a 46 % de humedad relativa promedio (Socorro *et al.*, 2007), o bien a que el modelo propuesto no es el adecuado para estimar el contenido de humedad de la semilla. Aún así, la predicción del modelo del contenido de humedad de la semilla estuvo en el rango de 5 a 14 %, que se considera adecuado, aunque el contenido ideal sería entre 5 y 6 % para lograr máxima longevidad de las semillas; en cambio el contenido de humedad por debajo de 5 % puede propiciar el rompimiento de la estructura de la membrana y provocar la aceleración del deterioro, mientras que por arriba de 14 % incrementa la respiración e invasión de hongos (Harrington, 1972; Copeland y McDonald, 2001).

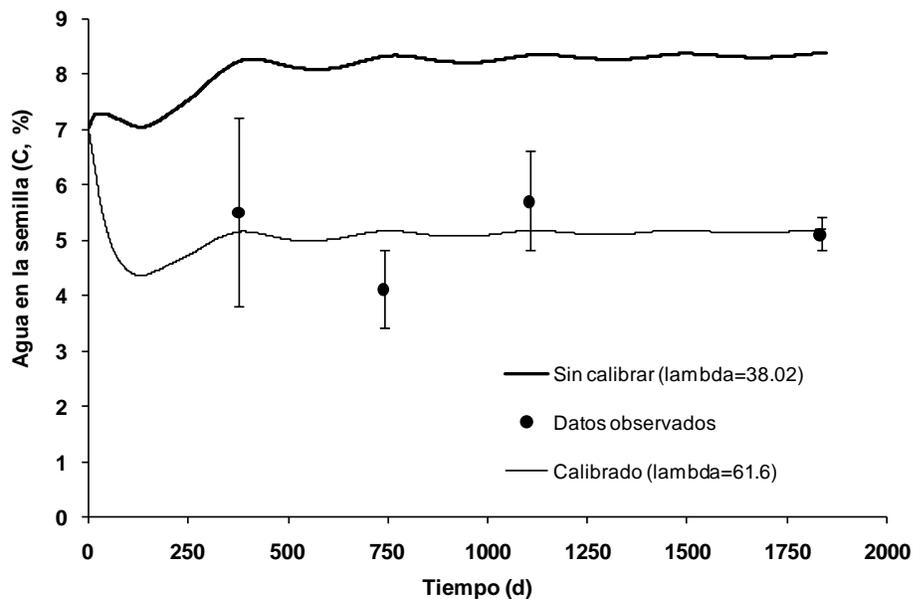


Figura 5.3. Contenido de agua en la semilla de tomate de cáscara (C, %). Datos modelados sin calibrar lambda (línea continua superior); datos observados (puntos con desviación estándar) y datos modelados con lambda calibrado (línea continua inferior).

De acuerdo al Cuadro 5.1, es posible disminuir el error medio en porcentaje (MPE) de la modelación de la viabilidad de la semilla (v) de 18 % hasta 2.2 %, a través de calibrar diferentes parámetros del modelo de viabilidad propuesto por Ellis y Roberts (1980).

Cuadro 5.1. Calibración de parámetros del modelo de viabilidad propuesto por Ellis y Roberts (1980) para ajustar el modelo a los datos de porcentaje de viabilidad de la semilla (v) de tomate de cáscara almacenada en una bodega sin control de clima ubicada en Texcoco, Estado de México, del 2000 al 2005.

MÉTODO DE		OPTIMIZACIÓN	PARÁMETRO	INICIAL	OPTIMO	PCP	R ²	MBE	MPE	RMSD
Parámetros sin										
optimizar							0.98	-9.92	17.8	12.8
Marquardt			C _H	0.0329	0.0242	-26.4	0.97	-0.52	3.4	2.4
Simplex			C _H	0.0329	0.0242	-26.5	0.97	-0.52	3.4	2.4
Marquardt			C _Q	0.000478	0.000163	-66.0	0.97	-0.32	2.9	2.3
Simplex			C _Q	0.000478	0.000448	-6.2	0.98	-9.12	16.5	11.9
Marquardt			C _W	3.47	3.29	-5.1	0.98	-0.32	2.9	2.3
Simplex			C _W	3.47	3.29	-5.1	0.98	-0.32	2.9	2.3
Marquardt			K _i	1.1576	1.5262	31.8	0.96	0.88	9.2	6.5
Simplex			K _i	1.1576	1.5268	31.9	0.96	1.08	8.8	6.2
Marquardt			C _H	0.0329	0.133	304.0				
			C _W	3.47	1.25	-64.1				
			K _i	1.1576	1.1426	-1.3	0.98	-0.72	2.2	1.9
Simplex			C _H	0.0329	0.0332	0.9				
			C _W	3.47	3.31	-4.6				
			K _i	1.1576	1.1865	2.5	0.97	-0.52	3.4	2.3

PCP es el porcentaje de cambio del parámetro calibrado; MBE es el error medio de la diferencia entre valores observados y predichos; MPE es el error medio en porcentaje; RMSD es la raíz cuadrada de la diferencia media.

Todas las calibraciones realizadas mostraron altos R². Los valores menores de RMSD (1.9) y MPE se obtuvieron al calibrar conjuntamente C_H, C_W y K_i con el método Marquardt; sin embargo, este método presentó los PCP más altos y provocó que el porcentaje de viabilidad modelada aumente y disminuya cíclicamente (Figura 5.4), lo cual no ocurre biológicamente.

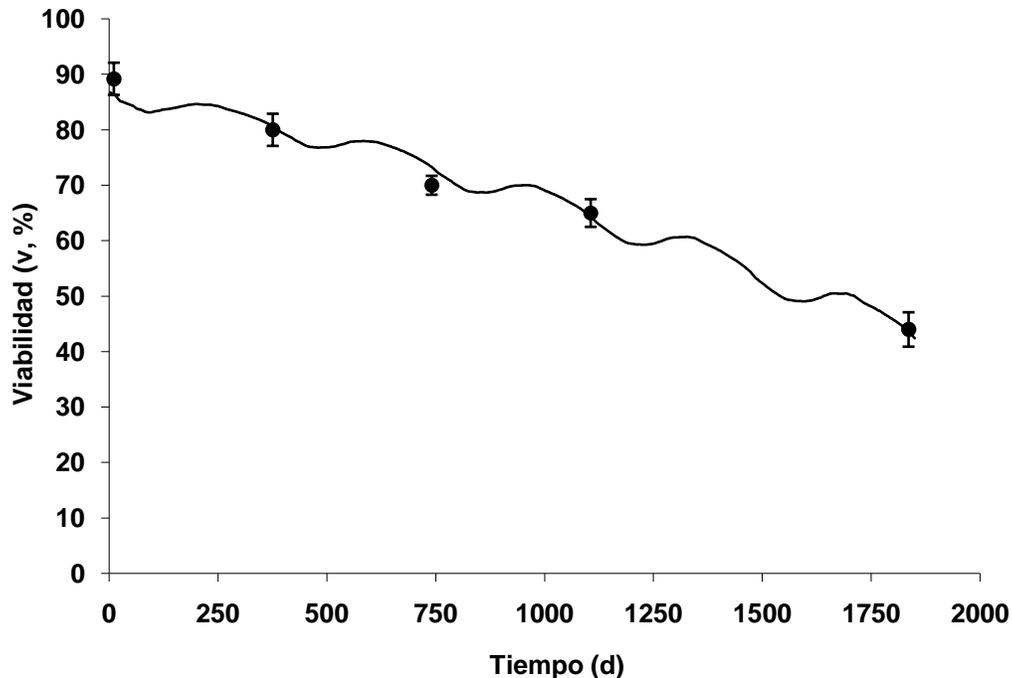


Figura 5.4. Porcentaje de viabilidad de semillas de tomate de cáscara (v) con la calibración combinada de C_H , C_W y K_i con el método de Marquardt, modelado (línea continua) y observado (puntos con desviación estándar).

Otros valores bajos de MPE (2.9 %), MBE (-0.32) y RMSD (2.3) se obtuvieron al calibrar los parámetros C_Q (método de Marquardt) y C_W . Con la calibración combinada de C_H , C_W y K_i (método Simplex) también se obtuvo un bajo RMSD. La calibración de C_H permitió obtener valores bajos de MBE, MPE y RMSD, pero el PCP fue relativamente alto (-26.4 %); en cambio, los PCP de C_Q optimizado con el método Simplex, C_W , y la optimización combinada de C_H , C_W y K_i con el método Simplex, fueron iguales o menores a 6.2 %.

En esta investigación como parámetros iniciales C_H (0.0329) y C_Q (0.000478) se usaron los recomendados por Dickie *et al.* (1990) y Sinício (2004) quienes consideran que estos valores son similares para todas las especies. Hung *et al.* (2001) estimaron un valor de $C_H = 0.0346$ y $C_Q = 0.000401$ para la curva de deterioro de semillas de tomate. La predicción con los valores de Hung *et al.* (2001) fue similar a la obtenida con los parámetros propuestos por Dickie *et al.* (1990). En esta investigación, la calibración

de C_H ya sea individual o en conjunto con otros parámetros, permitió mejorar los valores predichos por el modelo.

Con base en lo anterior, la mejor calibración resultó de modificar C_H , C_W y K_i con el método Simplex, ya que el PCP es menor a 4.6 en los tres parámetros y el cálculo del error entre observados y predichos es bajo con los tres criterios utilizados en este estudio (Figura 5.5). Con este modelo, el valor inicial de v fue 87.6 %, el cual fue mayor o igual a 85.0 % hasta los 263 d, periodo en el cual las semillas almacenadas tenían la calidad comercial de acuerdo a las normas de la International Seed Testing Association (ISTA, 2004). El 50 % de la semilla deteriorada (p) se alcanzó entre los cuatro años y cuatro meses a cuatro años y siete meses.

La curva (Figura 5.5) presenta ligeras variaciones periódicas en la tasa de deterioro, comportamiento que se atribuye a las variables ambientales de entrada al modelo. En promedio, la temperatura del aire y la humedad relativa en el almacén sin control de clima fueron 18.8 °C y 46 %. Si se considera que la temperatura del aire promedio en el periodo más frío (octubre a marzo) fue 16.3 °C, y de 21.3 °C para el resto del año, pero sin diferencias en humedad relativa entre periodos, entonces las fluctuaciones en el deterioro se debieron al efecto de la temperatura ambiental, con las tasas de deterioro más bajas durante el periodo más frío (4.2 % anual) y las más altas durante el periodo más cálido (13.3 % anual). Si se almacenaran las semillas en un ambiente como el que predomina durante octubre a marzo, entonces se podrían conservar las semillas de tomate de cáscara por un periodo significativamente mayor. En promedio, la tasa de deterioro de la semilla de tomate de cáscara var. CHF1-Chapingo fue relativamente alta (8.3 % anual, Figura 5.5), y se esperaría que con 8 % de humedad en la semilla, sus células permanecieran en el estado vítreo con una viscosidad extremadamente alta, y baja movilidad molecular del citoplasma (Williams y Leopold, 1989; Sun y Leopold, 1993).

El modelo podría no ser válido si el citoplasma de las células se suavizara o pasara a un estado líquido, es decir, cuando aumentara el porcentaje de humedad de la semilla sobre un límite que en algunas especies es mayor a 14 %; tampoco funcionaría cuando la temperatura y humedad fueran altas, como en condiciones de envejecimiento

acelerado o deterioro artificial en donde se pierde la actividad enzimática, ocurre peroxidación de lípidos, pérdida de permeabilidad de membranas, de sustancias de reserva y disminución de la respiración, lo que finalmente causa una disminución de la germinación y vigor (Priestley, 1986; Basavarajappa *et al.*, 1991; Bernal-Lugo y Leopold, 1992). Un modelo que incluyera los procesos fisiológicos y bioquímicos involucrados, podría ofrecer una mejor predicción de cómo está ocurriendo el deterioro en la semilla de tomate de cáscara.

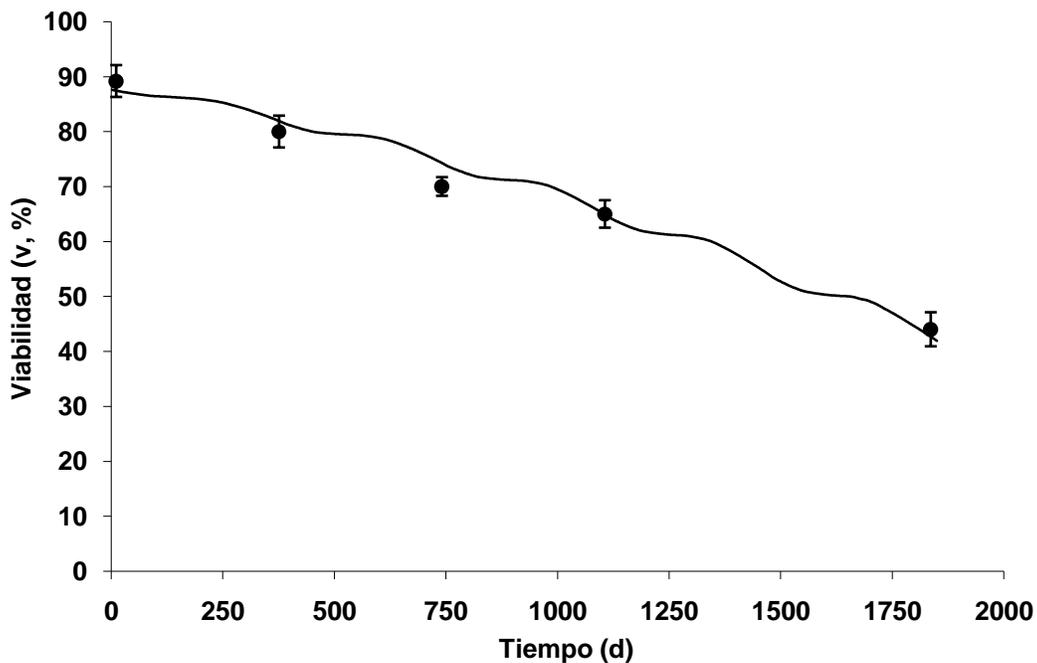


Figura 5.5. Porcentaje de viabilidad de semillas de tomate de cáscara (v) con la calibración combinada de C_H , C_W y K_i con el método Simplex, modelado (línea continua) y observado (puntos con desviación estándar).

5.4. CONCLUSIONES

Después de la calibración, el valor de lambda (λ) en la ecuación diferencial para calcular masa de agua contenida en la semilla, fue 62 % superior al valor para semilla de tomate reportado en otros estudios, lo que indica discrepancias con los datos observados de humedad de la semilla o bien la necesidad de ajustar algún otro parámetro de esta ecuación diferencial para ajustarlo a las semillas de tomate de cáscara. Con lambda sugerida para tomate, se obtuvo una masa de agua contenida en la semilla en el rango de 5 a 14 %, adecuada para la conservación de la semilla.

La mejor calibración de la ecuación de viabilidad Ellis y Roberts se obtuvo cuando se optimizaron simultáneamente C_H , C_W y K_i con el método Simplex, ya que los cambios en los parámetros fueron menores a 4.6 % con un error de 3.4 %.

El mejor modelo calibrado permitió estimar que la viabilidad de la semilla será mayor o igual a 85.0 % hasta los 263 d de almacenamiento, periodo en el cual las semillas conservan la calidad comercial de acuerdo con las normas de la International Seed Testing Association (ISTA) y también predijo que el 50 % de viabilidad se alcanzará en un promedio de 4 años y cinco meses.

5.5. 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 Science and Technology*. 19: 279-286.
- Bernal-Lugo I. and A. C. Leopold. 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiology*. 98: 1207-1210.
- Bradford K. J. 2004. *Seed Production and Quality*. Fifth edition. Department of Vegetable Crop and Weed Science. University of California. Davis, CA. USA. 134 p.
- Copeland O. L. and M. B. McDonald. 2001. *Principles of seed science and technology*. Fourth edition. Kluwer Press, New York . 409 p.
- Delouche, J. C. 2002. Germinación, deterioro y vigor de semillas. *Seed News*. 6:6
- Dickie J. B., R. H. Ellis, H. L. Kraak, K. Ryders and P.B. Tompsett. 1990. Temperature and seed storage longevity. *Annals of Botany*. 65: 197-204
- Ellis R. H. and E.H. Roberts.1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany* 45:13-30.
- Ellis R. H. and E. H. Roberts. 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology*. 9: 373-409.
- Harrington, J. F. 1972. Seed storage and longevity. *In*: T. T. Kozlowski (ed.). *Seed Biology*. Vol. 3. Academic Press. New York. USA. pp 145-240.
- Hay F. 2009. The seed viability equations. Millennium Seed Bank Project Kew. Royal Botanic Gardens Kew. 13 p. Consultado el 17 de septiembre de 2009. <http://data.kew.org/sid/viability/SeedViabilityEquationsFHDec04.pdf>.
- Hung L. Q., T. D. Hong and R. H. Ellis. 2001. Constant, fluctuating and effective temperature and seed longevity: a tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) exemplar. *Annals of Botany* 88: 465-470.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. *International Rules for Seed Testing*. Rules. 2004. ISTA editions, Zurich, Switzerland. 243 p.
- Marques-Pereira J. A. y D. Marcal-de Queiroz. 1991. *Principios de secado de granos psicometría higroscopia*. Serie Tecnología Poscosecha 8. FAO. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. 72 p.

- Narayana M.U.M., P. P. Kumar and W. Q. Sun. 2003. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *Journal of Experimental Botany* 54 (384): 1057-1067.
- Priestley D. A. 1986. Seed aging: Implications for seed storage and persistence in the soil. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press. Ithaca NY USA. 304 p.
- Sinício R. 2004. Generalised longevity model for orthodox seeds. *Biosystems Engineering*. 89: 85-92.
- Socorro A., E. Hernández, S. Calderón y H. Penichet. 2007. Modelo para curvas isotérmicas de humedad de equilibrio en semillas de interés agrícola. *Revista Cubana de Física*. 24 (2): 138 -143.
- Sun W. Q. and A. C. Leopold. 1993. The glassy state and accelerated ageing of soybeans. *Physiologia Plantarum* 89: 767-774.
- Sun W. Q. and A. C. Leopold. 1994. Glassy state and seed storage stability: a viability equation analysis. *Annals of Botany*. 74: 601-604.
- Sun W. Q., P. Davidson and H. S. O. Chan. 1998. Protein stability in the amorphous carbohydrate matrix: relevance to anhydrobiosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1425: 245-254.
- Vertucci C. W. and E. E. Roos. 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology*. 94: 1019-1023.
- Vijay D., M. Dadlani and S. Nagarajan. 2009. Role of sorption properties and water status in control of seed longevity patterns. *Current Science*. 96: 1103-1109.
- Williams R. J. and A. C. Leopold. 1989. The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology*. 89: 977-981.

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL

El deterioro de las semillas involucra procesos fisiológicos y bioquímicos en el tiempo que afectan las funciones vitales hasta ocasionar eventualmente la pérdida de la viabilidad de la semilla, el cual depende del ambiente y tiempo de almacenamiento. En la presente investigación se continuó estudiando el deterioro de la semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) var CHF1-Chapingo. Pérez-Camacho *et al.* (2008) encontraron que las disminuciones de la germinación (8.7 % anual), viabilidad (8.3 % anual) y vigor (emergencia de plántula en arena; 6.9 % anual), que caracterizan el deterioro de la semilla de esta variedad, pueden ser explicadas por la reducción de las reservas (medida como peso de 1000 semillas), la energía disponible para los procesos de crecimiento, así como por daños en las membranas celulares. Estos daños se expresaron, únicamente como un aumento en la conductividad eléctrica de la solución de imbibición ($12.5 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ anual); sin embargo, no se observaron cambios en la cinética de imbibición de la semilla ni en la integridad física de estas membranas observadas con un microscopio electrónico. Así que el almacenamiento de semillas de tomate de cáscara causa cambios en la composición química de las membranas que permiten escapar solutos, y esto explica en parte el deterioro de las semillas.

Como consecuencia de estas conclusiones, se decidió continuar con una aproximación al estudio de las membranas celulares de la semilla, específicamente en su composición de ácidos grasos. Como el almidón es el principal compuesto de reservas de la semilla de *Physalis*, y no se observan al microscopio cuerpos lipídicos como reservas (Pérez-Camacho *et al.*, 2008), se consideró que la extracción y cuantificación de ácidos grasos totales sería una buena aproximación de los lípidos membranales, y esto se relacionó con la pérdida de germinación y vigor que caracterizan el deterioro “natural” y artificial de semillas. Además, se inició la construcción de un modelo para determinar el deterioro de la semilla con base en mediciones continuas de temperatura y humedad relativa en el almacén.

La evaluación del deterioro natural de las semillas almacenadas en una bodega sin control de clima durante 7 años (Capítulo III) mostró que el contenido de ácido linoleico desciende durante todos los años de almacenamiento (Figura 3.1A, página

36), lo que indica que el deterioro expresado como la disminución de germinación (11.2 % anual) y vigor (Figuras 3.2A y 3.2B respectivamente, página 37) se encuentra asociado con la disminución (muy probablemente debida a la peroxidación) de este ácido. El linoleico es un ácido graso insaturado, encontrado en mayor concentración en las semillas de tomate de cáscara (Cuadro 3.1 página 34) y, de acuerdo con Melo y Cuamatzi (2008), los ácidos grasos insaturados se encuentran en abundancia en las membranas celulares. Así, que tanto el contenido de ácidos grasos como la actividad respiratoria (disponibilidad de reservas) están involucrados en el deterioro natural de semillas de tomate de cáscara.

En la segunda fase experimental (Capítulo IV), se evaluó el deterioro artificial de semillas recién cosechadas de tomate de cáscara con la técnica de envejecimiento acelerado. Los resultados mostraron que los tratamientos de envejecimiento acelerado a 50 °C disminuyeron significativamente la germinación y vigor. El efecto de este nivel de temperatura fue condicionado por la humedad relativa (HR), ya que con HR igual o superior a 65 %, la germinación se redujo proporcionalmente al aumento en HR, de tal manera que a 75 % de HR el deterioro artificial fue letal (0 % de germinación) (Figura 4.2A página 59). La velocidad de emergencia de radícula disminuyó significativamente a partir de 60 % de HR y fue nula a partir de 75 % de HR (Figura 4.2B página 59). De la misma manera, la actividad respiratoria empezó a disminuir a 60 % de HR y más rápidamente a 65 % de HR, hasta alcanzar una tasa muy baja (Figura 4.2C página 59). Los tratamientos de envejecimiento acelerado no cambiaron significativamente la composición de los ácidos grasos en las semillas de esta especie. Por lo que se consideró que el decremento en calidad fisiológica en semillas envejecidas artificialmente se puede explicar principalmente por la disminución de la respiración y, en consecuencia por la disminución en la energía disponible para la germinación y vigor de la semilla.

De esta forma, tanto en el trabajo de Pérez-Camacho *et al.* (2008) como en los dos experimentos realizados en esta tesis (Capítulos III y IV), la actividad respiratoria de semillas en el proceso de germinación fue determinante, por lo que, la cinética de la actividad respiratoria podría considerarse una prueba temprana de calidad fisiológica de

lotes de semillas de tomate de cáscara y un indicador del deterioro de semillas. En este sentido, Sundstrom y Edwards (1989) concluyeron que la actividad respiratoria en semillas de *Capsicum frutescens* L. puede servir como un indicador confiable del vigor de semilla, ya que tasas altas de respiración correlacionaron con germinación alta y con una rápida emergencia de radícula.

En cuanto al contenido de ácidos grasos totales, los resultados obtenidos en el experimento del Capítulo III contrastan con los del Capítulo IV del presente estudio. La disminución de germinación y vigor observada en las semillas deterioradas artificialmente con los tratamientos de envejecimiento acelerado (Capítulo IV) no tiene el mismo origen que la pérdida germinación y vigor de las semillas deterioradas naturalmente (Capítulo III), puesto que en las primeras no se observó una disminución significativa del contenido de ningún ácido graso y como ya se indicó en las semillas estudiadas en el Capítulo III (deterioro natural), la disminución del ácido linoleico correlacionó con la pérdida de germinación y vigor. De esta forma se puede concluir que el deterioro de semillas mediante la técnica de envejecimiento artificial o acelerado no puede usarse como un modelo de estudio del deterioro natural en semillas de tomate de cáscara. Al respecto, Halmer (2000) indica que el método de envejecimiento acelerado causa un estado anormal en términos del metabolismo de ácidos nucleicos y estructura de membranas, por lo que su uso se recomienda principalmente en las especies agronómicas de semilla grande (granos), mientras que se presenta una correlación baja entre el envejecimiento artificial y el natural en especies de semilla pequeña como semillas de flores, hortalizas y pastos.

6.1. PERSPECTIVAS

En el presente estudio no fue posible medir la permeabilidad de las membranas, evaluación que hubiera podido correlacionarse con el resto de variables y explicar el fenómeno del deterioro de la semilla de tomate de cáscara. Por ello, es recomendable establecer experimentos posteriores en el que se pueda medir la conductividad eléctrica o el potencial osmótico de la solución de imbibición de la semilla y el contenido de ácidos grasos de las membranas. Además, para garantizar que los ácidos grasos medidos provengan de la membrana de las células de la semilla, es recomendable usar algunas técnicas de aislamiento específicas de membranas, como el aislamiento de la membrana plasmática asociada con la actividad fosfolipasa, en el cual primero se realiza un fraccionamiento subcelular (rompimiento de la célula), después se hace una separación de organelos y finalmente se usa una enzima marcadora específica que identifica la parte separada del organelo (Hames *et al.* 1999; Gustavsson y Sommarin, 2002).

También es importante iniciar la medición de productos de la reacción de la peroxidación de ácidos grasos para poder estar seguros que la disminución en el contenido de ácidos grasos en el deterioro natural es debida al ataque por radicales libres. En ese sentido, la detección de la actividad enzimática de algunas enzimas (antioxidantes) encargadas de detoxificar las células de especies de oxígeno reactivo como la superóxido dismutasa, la lipogenasa y la peroxidasa podría ser complementaria (Sacandé *et al.* 2000; Bartosz, 2005).

En cuanto a la modelación del deterioro de semillas de tomate de cáscara, es necesario construir un modelo que integre, tanto las variables físicas ambientales como los resultados bioquímicos y fisiológicos. Para esto, es recomendable establecer experimentos para calcular los parámetros del modelo, y las relaciones causa efecto entre las variables. Este modelo podría contribuir al entendimiento del fenómeno del deterioro tanto en la semilla de tomate de cáscara como en otras semillas hortícolas como las de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) o el chile (*Capsicum annuum* L.), especies de la misma familia botánica que el tomate de cáscara, o la de cebolla (*Allium cepa* L.) especie de diferente familia.

6.2. LITERATURA CITADA

- Bartosz G. 2005. Superoxide Dismutases and Catalasa. *In: Oxidants and Antioxidants Defense Systems. The Handbook of Environmental Chemistry.* Grune T. (ed). Springer. Berlin. Germany. pp. 109-149.
- Gustavsson M. H., M. Sommarin. 2002. Characterisation of plasma membrane-associated phospholipase A₂ activity increased in response to cold acclimation. *Journal of Plant Physiology.* 159: 1219-1227.
- Halmer P. 2000. Commercial seed treatment technology. *In: Seed Technology and its Biological Basis.* Black M., J. D. Bewley (eds.). Sheffield Academic Press. Boca Raton FL. U.S.A. pp. 257-286.
- Hames B. D., N. M. Hooper, J. D. Houghton. 1999. *Instant Notes in Biochemistry.* Bios Scientific Publishers. Guildford, UK. 374 p.
- Melo R. V. y O. Cuamatzi T. 2008. *Bioquímica de los Procesos Metabólicos.* Segunda edición. Ediciones Reverté. México, D.F. 406 p.
- Pérez-Camacho I., O. J. Ayala-Garay, V. A. González-Hernández, J. A. Carrillo-Salazar, A. Peña-Lomelí y G. García-de los Santos. 2008. Indicadores morfológicos y fisiológicos del deterioro de semillas de tomate de cáscara. *Agrociencia* 42:891-901.
- Sacandé M., J. Buitink, F. Hoestra. 2000. A study of water relations in neem (*Azadirachta indica*) seed that is characterized by complex behavior. *Journal of Experimental Botany.* 51(341): 635-643.
- Sundstrom F. J. and R. L. Edwards. 1989. Pepper seed respiration, germination, and seedling development following seed priming. *HortScience* 24:343-345.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES GENERALES

La semilla de tomate de cáscara almacenada a 18.2 ± 5 °C y 41 ± 10 % de HR hasta por 7 años perdió capacidad germinativa a una tasa anual de 11.2 % que indujo la pérdida de 99 % al séptimo año. Asimismo, la velocidad de emergencia de radícula disminuyó a una tasa de 2.4 plántulas d^{-1} .

El ácido linoleico mostró una disminución constante conforme aumentó el tiempo de almacenamiento, pero con una cinética diferente a la de la germinación, ya que en los primeros tres años de almacenamiento no hubo variación estadística en el contenido de este ácido, mientras que al séptimo año presentó una disminución de 94 % respecto a la semilla almacenada durante dos meses.

En el primer año de almacenamiento la respiración disminuyó significativamente a 0.19 mL de CO_2 $g^{-1} h^{-1}$ (62 % con respecto a la semilla de 2 meses). La germinación correlacionó positivamente con la velocidad de emergencia de radícula ($r = 0.99$; $P \leq 0.01$), con la actividad respiratoria a las 48 h del inicio de imbibición ($r = 0.79$; $P \leq 0.01$) y con el contenido del ácido linoleico ($r = 0.78$; $P \leq 0.01$).

Por ello se infiere que tanto la actividad respiratoria como el contenido de ácidos grasos están involucrados en el deterioro natural de la semilla de tomate de cáscara, lo cual se refleja en la disminución de la germinación y vigor conforme aumenta el tiempo de almacenamiento.

En cuanto al deterioro inducido por el envejecimiento artificial, se concluyó que el tratamiento de 50 °C combinado con 65 % de humedad relativa provocó una disminución de 63 % de germinación en promedio. De igual manera, la velocidad de emergencia de radícula disminuyó 75 % al subir la temperatura de 45 a 50 °C.

Los tratamientos de envejecimiento acelerado no cambiaron significativamente la composición de ácidos grasos en las semillas, lo cual contrasta con lo encontrado en el envejecimiento “natural” de la semilla almacenada en bodega sin control de clima.

La respiración de la semilla declinó a valores inferiores a 0.1 mL de CO_2 $g^{-1} h^{-1}$ a partir del tratamiento de 50 °C y 65 % de humedad relativa, lo que correlacionó

positivamente con la pérdida de germinación ($r = 0.84$; $P \leq 0.01$) y velocidad de emergencia de radícula ($r = 0.98$; $P \leq 0.01$).

Así, el decremento de la calidad fisiológica en semillas con deterioro artificial se puede explicar por la disminución de la respiración y, consecuentemente de la energía disponible para la germinación y vigor de la semilla.

Finalmente, en cuanto a la modelación del deterioro de semillas, se encontró que después de la calibración, el valor de λ en la ecuación diferencial para calcular masa de agua contenida en la semilla, fue 62 % superior al valor para semilla de tomate reportado en otros estudios, lo que indica discrepancias con los datos observados de humedad de la semilla o bien la necesidad de ajustar algún otro parámetro de esta ecuación diferencial para ajustarlo a las semillas de tomate de cáscara. Con λ sugerida para tomate, se obtuvo una masa de agua contenida en la semilla en el rango de 5 a 14 %, adecuada para la conservación de la semilla.

La mejor calibración de la ecuación de viabilidad Ellis y Roberts se obtuvo cuando se optimizaron simultáneamente C_H , C_W y K_i con el método Simplex, ya que los cambios en los parámetros fueron menores a 4.6 % con un error de 3.4 %.

El mejor modelo calibrado permitió estimar que la viabilidad de la semilla será mayor o igual a 85.0 % hasta los 263 d de almacenamiento, periodo en el cual las semillas conservan la calidad comercial de acuerdo con las normas de la International Seed Testing Association (ISTA) y también predijo que el 50 % de viabilidad se alcanzará en un promedio de 4 años y cinco meses.

ANEXOS



Figura A1. Plantas de tomate de cáscara de la var CHF1-Chapingo producidas en invernadero.



Figura A2. Frutos de tomate de cáscara de la var CHF1-Chapingo cosechados en invernadero.



Figura A3. Prueba de germinación en papel filtro.



Figura A4. Prueba de germinación en agar bacteriológico.

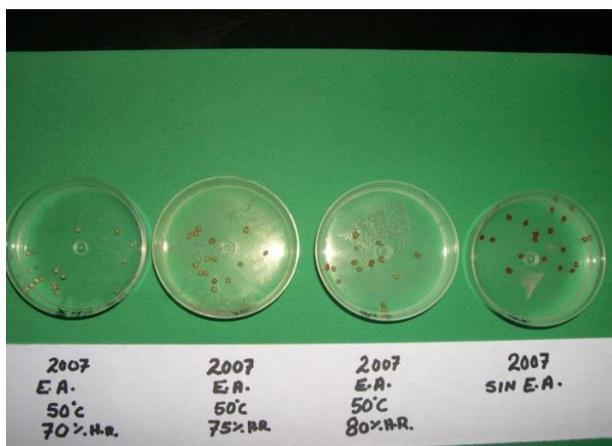


Figura A5. Prueba de viabilidad con tetrazolio en semillas con envejecimiento acelerado.



Figura A6. Macerado de semillas enteras de tomate de cáscara para la extracción de ácidos grasos.



Figura A7. Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro masas (GC-MS).



Figura A8. Equipo de cómputo conectado al GC-MS mostrando las curvas de los ácidos grasos cuantificados.