



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Efecto del envejecimiento acelerado en semillas de *Polaskia chende* y *Polaskia chichipe* de la región de San Luís Atlotitlán, Puebla.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

ROGEL REYES LETICIA

DIRECTOR DE TESIS:
BIOL. CESAR ALEJANDRO ORDOÑEZ SALANUEVA



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a las personas que han sido especialmente importantes para que yo llegase a este momento.

Con el más profundo amor y agradecimiento a mis queridos padres Maria Reyes Millán y Eutiquio Rogel Macedo. Muchas gracias por todo su amor, su cariño, por mi formación y educación.....por apoyarme y confiar en mi siempre. Este logro es suyo pues sin su esfuerzo, desvelo y sacrificio nunca lo hubiera logrado. A ustedes les debo todo lo que soy y seré pues son el claro ejemplo de entereza y nobleza al enfrentar la vida, sobre todo les agradezco infinitamente estén a mi lado pues la dicha que siento al tenerlos conmigo es maravillosa....los quiero muchísimo.

A mis queridas hermanas Karina y Lucia por tener el privilegio de haber crecido juntas. Por que a pesar de los años transcurridos siempre hemos mantenido el cariño, el apoyo y la confianza sin tener que decirlo con palabras, por que son el eslabón con el pasado y los cimientos del futuro.....por que sin ustedes nunca hubiera sido feliz como lo fui y lo soy ahora.

A mis adorados hermanos Cuauhtémoc y Jesús. Gracias por todo lo vivido a vuestro lado, por los sueños compartidos y por las diferencias que a la larga nos enriquecen. Les agradezco los buenos tiempos en los que la inocencia nos permitía enormes momentos de felicidad.

A mi querida y linda Vanessa por haber llegado a nuestra casa y lograr que volviera a brillar como hacia mucho no sucedía. Gracias, por permitirme ver a través de tus ojos la alegría y la inocencia. Por enseñarme que las cosas más sencillas siempre son las que nos dan las alegrías más grandes.....gracias por permitirme estar a tu lado y verte crecer siendo una persona magnifica.

AGRADECIMIENTOS:

Al Biol. Cesar Alejandro Ordoñez Salanueva, por haber sido mi Asesor, gracias por apoyarme en los momentos más difíciles y presionar en los momentos exactos.....por su enorme paciencia. Le agradezco todo el tiempo compartido, pero más aún, le agradezco infinitamente sea el mejor de mis amigos, gracias por esas pláticas interminables que nos causaban enojos y alegrías y por lo que me ha enseñado durante todo este tiempo.....por sus consejos.

A la M en C. Josefina Vázquez Medrano por haber sido mi sinodal y haberme brindado comentarios e ideas para enriquecer este trabajo. Sobre todo le agradezco, la sencillez, amabilidad y el cariño dado cada vez que llegaba al laboratorio, por estar al pendiente de mí.....por ayudarme siempre.

Al Biólogo Rafael Quintanar Zúñiga y próximo M. en C. por recibirme siempre con una sonrisa y hacerme reír hasta en los momentos más tristes....gracias por todo.

Al Dr. Elías Piedra por brindarme su amistad, por sus ocurrencias, chistes y comentarios, gracias por hacer amena mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Cesar Flores Mateo por haber sido mi sinodal, pero sobre todo por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo, por su gran amabilidad y por procurar solucionar las trabas que en algún momento surgieron.

Al Biol. Luís Barbo Hernández Portilla por ayudarme con los ácidos grasos.

A las Maestra Martha y Margarita, por su apoyo.....por ser muy amables y lindas conmigo.

Al M. en C. Alberto Arriaga Frías por haber sido mi sinodal, por ser un excelente académico y ser humano, gracias por haberme permitido conocerlo, por las excelentes clases que tuve el honor de tomar con Usted y por las pláticas que teníamos, le agradezco los ánimos que me dio durante la tesis...créame que me ayudaron muchísimo.

A todos los que íbamos al campo: a la Maestra José, Profe Rafa, Dr. Elias, Profe Cesar y Profe Luis, por esas inolvidables y deliciosas cenas, por las excelentes pláticas que me toco escuchar y aunque no solía hablar mucho, esos momentos me permitieron darme cuenta de los excelentes académicos y seres humanos que son y de la forma en que ven la vida.

A mis hermanas de licenciatura Chivita y Martita, por haber sido compañeras de butaca y de salidas al campo, por los momentos de risas, tensiones y sobre todo por el apoyo que nos brindamos cada vez que alguna lo necesitaba.....por los momentos inolvidables tanto dentro como fuera de Iztacala. Gracias por haber sido la sonrisa franca en los momentos de alegría y el rostro amable en los momentos difíciles.

A la gran familia que formamos durante toda la carrera: A mis mejores amigas: Violeta, Lucia, Martha, Rocio. A Don Miguel por aconsejarnos, guiarnos y ser nuestro "padre postizo", gracias por todo el cariño sincero.

A mis compañeros y amigos: Lucia, Violeta, Rocio, Martha, Jesús, Cesar, Adriana, Chema, Fernando, Servando, Don Miguel, Miriam, Roberto, Carolina, Hugo.

ÍNDICE	Páginas
ABREVIATURAS	i
RESUMEN.....	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
La familia Cactácea.....	4
Importancia ecológica de las especies.....	6
Importancia etnobotánica de las especies.....	7
Origen y clasificación de semillas.....	9
Alteraciones fisiológicas y bioquímicas asociadas al envejecimiento en semillas.....	11
Mecanismos antioxidantes enzimáticos.....	14
Peroxidación de ácidos grasos.....	16
ANTECEDENTES.....	18
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS	
Objetivo General.....	21
Objetivos Particulares.....	21
DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	23
DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES	
<i>Polaskia chende</i>	24
<i>Polaskia chichipe</i>	25
MATERIAL Y MÉTODO	
Colecta de frutos.....	27
Extracción de semillas.....	27
Germinación.....	27
Tratamientos previos.....	28
Gradiente de envejecimiento.....	29
Envejecimiento acelerado.....	29
Extracción y transesterificación de ácidos grasos de semillas.....	30
Análisis de ácidos grasos por GC-MS.....	31
Registro del espectro de infrarrojo (NIRS) en las semillas y modelo Quimiométrico QUANT+.....	31
Obtención de extractos enzimáticos.....	31

Peroxidasa.....	32
Catalasa.....	32
Análisis estadísticos.....	32
RESULTADOS	
<i>Polaskia chichipe</i>	34
<i>Polaskia chende</i>	47
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	71
APÉNDICE.....	75

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
CAT	Catalasa
GS-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas
ENV	Envejecimiento
GR	Glutation reductasa
HR	Humedad relativa
LB	Luz blanca
LB-AG₃	Luz blanca con acido giberélico
LSD	Diferencia mínima significativa
NIRS	Espectrofotometría de infrarrojo cercano
OBS	Oscuridad
OBS- AG₃	Oscuridad con acido giberélico
POX	Peroxidasa
RL	Rojo lejano
S	Sincronía germinativa
SOD	Superóxido dismutasa
TMG	Tasa máxima de germinación
TPG	Tiempo promedio de germinación
% G. Acumulado	Porcentaje de germinación acumulado

RESUMEN

La velocidad a la que ocurre el envejecimiento en las semillas depende del genotipo y de las condiciones de almacenamiento. En diversos estudios se ha encontrado que, en semillas envejecidas, se lleva a cabo la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) como peróxido de hidrógeno y radical superóxido. Estas ERO se han asociado como fuente principal de la pérdida de la viabilidad de las semillas, incremento de la peroxidación lipídica y la pérdida de la actividad enzimática. En este estudio se determinó la respuesta germinativa de *Polaskia chichipe* y *Polaskia chende* en diferentes condiciones de luz, temperatura y ácido giberélico. Además, se evaluaron los efectos del envejecimiento acelerado en las semillas de estas especies a través de características fisiológicas relacionadas con el deterioro. Se evaluó la concentración de ácidos grasos mediante GC-MS para generar un modelo quimiométrico de viabilidad mediante espectrometría de infrarrojo cercano (NIRS), al mismo tiempo se determinó la actividad enzimática de catalasa (CAT) y peroxidasa (POX). Las semillas de ambas especies germinaron en luz blanca y en luz rojo-lejano, pero no germinaron en oscuridad. *P.chende* germinó a 10°C. *P. chichipe* mostró un gradiente de longevidad a 55 °C / 60 %HR, mientras que, *P. chende* no presentó pérdida de la viabilidad a 55 °C / 55 %HR mostrando tolerancia a tal condición. Por su parte, el contenido de ácidos grasos disminuyó durante el envejecimiento en las semillas de *P. chichipe*, mientras que, en las semillas de *P. chende* esta disminución fue temporal. La actividad de CAT y POX durante el envejecimiento acelerado disminuyó notablemente en ambas especies. En base a estos resultados se concluye que, las semillas de ambas especies son fotoblásticas positivas y tienen la capacidad de germinar en luz rojo-lejano. Las semillas de *P. chende* presentan latencia fisiológica no profunda y son tolerantes a bajas temperaturas, mientras que, las semillas de *P. chichipe* no presentan latencia ni tolerancia a bajas temperaturas. Las semillas de *P. chende* son resistentes a las condiciones de envejecimiento acelerado empleadas, mientras que, las semillas de *P. chichipe* mostraron un gradiente de viabilidad. En el caso de *P. chichipe*, nuestros resultados establecen una clara relación entre la pérdida de la actividad detoxificante de las enzimas CAT y POX, la peroxidación lipídica y el deterioro de las semillas durante el envejecimiento acelerado.

INTRODUCCIÓN

Entre las plantas más notables que caracterizan el paisaje de las zonas áridas y semiáridas de México se distingue la familia Cactácea alcanzando en este país su máxima diversidad con 50 géneros y 550 especies aproximadamente (Hunt, 1999).

Una desventaja en la mayoría de estas especies, desde el punto de vista productivo y de conservación es la vulnerabilidad que presentan principalmente por la combinación de características ecológicas y biológicas inherentes a ellas, tales como presentar tasas de crecimiento muy bajas y ciclos de vida frecuentemente largos. Además, muchas de las especies tienen áreas de distribución extremadamente pequeñas, así como un reclutamiento escaso de nuevos individuos en las poblaciones llegando a necesitar algunas de ellas condiciones edáficas muy especiales para vivir, lo que las hace extremadamente vulnerables a cualquier perturbación natural o humana (Hernández *et al.*, 1994). Desafortunadamente, en los últimos años la destrucción de hábitats, la agricultura, el pastoreo y la explotación de forma irracional como recurso hortícola, frutícola y medicinal, ha ocasionado que muchas de sus poblaciones se encuentren en riesgo (Hernández *et al.*, 1994).

Debido a la importancia de esta familia y a la problemática que enfrenta se ha recurrido a implementar medidas de conservación *in-situ* y *ex-situ* para garantizar la preservación de estas especies. La conservación *in-situ* resulta ser la forma más adecuada ya que se conservan individuos vivos, sus hábitats y sus interrelaciones en su ambiente natural; por lo que a nivel mundial cada país se ha encargado de determinar las áreas que deben ser protegidas en sus territorios. En el caso de México, se tienen áreas protegidas que equivalen a 3.89% de su territorio. Sin embargo, estas áreas no son suficientes para tener una vegetación representativa con ciertas condiciones ambientales. De acuerdo con estudios de CONABIO se requiere proteger 155 regiones (407 151 Km²) que corresponden a 20% del territorio nacional. Desafortunadamente, aún no es posible conservar lo ya establecido por la falta de implementación de políticas bien definidas para su cuidado, esto ha provocado la pérdida o invasión de muchas de las 89 reservas existentes siendo difícil el manejo adecuado y a largo plazo que garantice el mantenimiento de las diferentes especies vegetales.

Por todo lo anterior, se ha recurrido a la conservación *ex-situ* la cuál permite el cuidado de los componentes de la biodiversidad biológica fuera de su ambiente natural. Dentro de los principales tipos de conservación *ex-situ* se encuentra la formación de bancos de semillas artificiales. Estos bancos son considerados de gran importancia, ya que mantienen vivo por largos periodos de tiempo al germoplasma siempre y cuando se almacenen en ambientes apropiados para interrumpir su deterioro natural, aún así, no todo el germoplasma se ha logrado almacenar con éxito (Vázquez Yanes *et al.*, 1997).

Dentro de los factores que se manejan durante el almacenamiento de las semillas se encuentran: la humedad relativa (HR) y la temperatura del sitio donde se almacenan. Se ha encontrado que el tiempo de vida de las semillas en almacén puede duplicarse por cada 1% de reducción en el contenido de humedad y/o por cada 5° C de reducción en la temperatura, pudiendo deducir que la viabilidad de las semillas aumenta cuando se almacenan a humedad y temperatura bajas. En este sentido las condiciones de almacenamiento para cada especie tienen especial influencia, ya que con frecuencia conducen al envejecimiento de las semillas lo que conlleva al deterioro y a la pérdida de viabilidad o capacidad de germinación y vigor de las mismas (De Paula, 1994).

El envejecimiento natural suele requerir, según el tipo de semilla, periodos más o menos prolongados para alcanzar una pérdida total de viabilidad (semillas envejecidas), por ello desde hace algunos años se utilizan métodos que permiten acelerar el proceso de envejecimiento mediante el almacenamiento de semillas en condiciones ambientales controladas, variables para cada especie. Estos métodos reciben el nombre de envejecimiento artificial o acelerado, y constituyen con algunas limitaciones, un sistema adecuado de estudio del fenómeno de envejecimiento, ya que en poco tiempo pueden obtenerse muestras con distintos grados de viabilidad. En general, las alteraciones observadas en semillas envejecidas artificialmente son muy similares a las encontradas en semillas envejecidas de forma natural lo que supone la conveniencia de la utilización de este tipo de métodos para estudios de pérdida del vigor y la viabilidad (De Paula, 1994).

Desde el punto de vista bioquímico, el estudio del envejecimiento en semillas presenta un especial interés, ya que permite investigar las alteraciones químicas y metabólicas durante el deterioro, así como las principales estructuras afectadas por éste. Algunos de los cambios asociados al envejecimiento se han referido a los daños que ocurren en las biomoléculas de reserva; tales como la modificación de la estructura de los lípidos (peroxidación lipídica) y su contenido, disminución de la actividad respiratoria y energía metabólica, pérdida de la integridad membranal, alteración del contenido de azúcares, disminución de la síntesis de proteínas, deterioro de los mecanismos de reparación del ADN, disminución de la actividad enzimática y síntesis de ADN (McDonald, 1999).

Aún así, diversos estudios coinciden al considerar a la peroxidación lipídica como el principal factor del envejecimiento en semillas (Sung y Jean, 1994; Sung, 1996; Bailly *et al.*, 1996; McDonald, 1999). La peroxidación lipídica se genera por la formación de radicales libres por auto-oxidación ó por especies reactivas de oxígeno (ERO) presentes en muchas semillas envejecidas. También se ha encontrado que durante la imbibición ocurre la producción de nuevas ERO, debido a la activación del metabolismo. Por lo anterior, las células tienen que enfrentarse a un estrés oxidativo cuya intensidad depende de las condiciones de almacenamiento. Priesley y Leopold (1983), observaron que a temperaturas elevadas y alta humedad existe una tendencia al aumento en especies reactivas de oxígeno (ERO). Esto sugiere que las ERO pueden jugar un papel importante en el deterioro de las semillas y que los compuestos capaces de contrarrestarlas son dependientes del nivel de humedad de las semillas. Por otro lado, algunos estudios han relacionado la presencia de ERO y los sistemas antioxidantes enzimáticos constituidos por un grupo variado de enzimas (superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), peroxidasa (POX) y catalasa (CAT)) con la propiedad común de eliminar, neutralizar o suprimir a los radicales libres y a las especies reactivas de oxígeno.

Cabe señalar que una de las problemáticas que ha presentado el banco de semillas artificial son las evaluaciones periódicas que se tienen que realizar para cerciorarse que las semillas en almacenamiento sean vigorosas, implicando la destrucción de partes de la colección para poder determinarlo, tal es el caso de ensayos de sales de cloruro trifenil de tetrazolio (TTC), pruebas de evaluación y crecimiento de plántulas (G) (ISTA, 2003).

Recientemente se ha sugerido el uso de la técnica de espectroscopia de refractancia en infrarrojo cercano (NIRS) como una técnica no destructiva y óptima para la evaluación de la viabilidad de semillas en almacenamiento, principalmente en semillas ortodoxas pertenecientes a Cactáceas (Vergara, 2002; Zabaleta, 2003; Lozada, 2005 y Manuell, 2006).

El conocimiento tanto del envejecimiento como del potencial de almacenamiento de las semillas es importante pues influye en el mayor o menor vigor de las plántulas originadas. Por otro lado, la determinación de la viabilidad para poblaciones de especies endémicas, poco estudiadas y de gran importancia biológica como las Cactáceas, es un aspecto fundamental para implementar técnicas de manejo y conservación adecuadas, así como para establecer condiciones que disminuyan la velocidad con que ocurre su envejecimiento y los factores asociados a este.

La familia Cactácea

La familia Cactaceae se distribuye principalmente en Norteamérica y Sudamérica.

En Norteamérica el principal centro de diversificación se encuentra en México, mientras que en Sudamérica se reconocen tres centros de diversificación incluyendo parcialmente a Argentina, Bolivia, Brasil y Perú. La familia cactácea se clasifica en cuatro subfamilias *Pereskioideae*, *Maihuenioideae*, *Opuntioideae* y *Cactoideae* y se ha postulado como un grupo monofilético (Hernández *et al.*, 1994).

Las cactáceas se han distinguido por su capacidad de adaptación a climas áridos y semiáridos, los cuales se caracterizan por presentar temperaturas altas o extremas con largos periodos de sequía y una limitada disponibilidad de agua solo en algunas épocas del año, además los suelos suelen ser someros derivados de substratos rocosos y pedregosos provenientes de rocas sedimentarias e ígneas. De ahí la importancia de la presencia de esta familia, ya que contribuye a la fijación del suelo previniendo o reduciendo la erosión del viento, de la temperatura y de las lluvias esporádicas (Hernández *et al.*, 1994).

Dentro de las características que permiten el desarrollo de las cactáceas en estos tipos de ambientes se encuentran: la succulencia de sus tallos (desarrollo del tejido parenquimático), lo que permite a las plantas almacenar gran cantidad de agua cuando ocurren las lluvias esporádicas confiriendo un aspecto grueso y carnoso. Cabe mencionar que la succulencia de los tallos no es exclusiva de las cactáceas sino que existen otros grupos taxonómicos entre los géneros *Euforbia* (*Euphobiaceae*) y *Stapelia* (*Asclepidaceae*) que presentan semejanza

morfológica con algunas cactáceas. Este hecho demuestra que la succulencia puede resultar cuando las plantas se encuentran sometidas a restricciones ambientales similares, particularmente en climas calidos y secos. Otra característica de los tallos de las Cactáceas es que son fotosintéticos, carecen de láminas foliares y presentan un metabolismo ácido de las crasulaceas (CAM), el cuál ayuda a reducir la evapotranspiración al solo abrir los estomas por la noche para realizar el intercambio gaseoso.

También es muy notable la presencia de areolas que son las áreas que originan las flores, frutos, cerdas y espinas, estas últimas son las encargadas de dar protección, sombras y reducir la pérdida excesiva de agua. En cuanto a las características florales que presentan son; el tener el perianto separado en muchas partes, estambres numerosos, ovario ínfero y placentación de óvulos parental, así como frutos generalmente carnosos con una gran cantidad de semillas (Bell, 1991).

Las cactáceas columnares presentan frutos con características zoocorias y las aves y murciélagos son al parecer sus principales dispersores, mientras que, entre los dispersores de las cactáceas de barril se encuentran insectos como hormigas. Los frutos de las cactáceas pueden ser dehiscentes o indehiscentes. Las plantas con frutos nocturnos dehiscentes por lo general poseen pulpa blanca con olor penetrante parecido al de las flores mientras que los frutos indehiscentes carecen de olor y poseen pulpa roja que es muy llamativa durante el día. En general, se acepta que los frutos incoloros son consumidos por murciélagos mientras que, aquellos con colores brillantes e indehiscentes son consumidos por aves (Bell, 1991).

Diferentes factores como los niveles de alto endemismo, gran especificidad del hábitat, poblaciones reducidas, sobre-colecta y destrucción o modificación del hábitat determinan qué gran parte de sus especies estén incluidas en UICN (Unión Internacional Conservacionista de la Naturaleza) como especies raras, vulnerables o en peligro de extinción.

Importancia ecológica de las especies

El genero *Polaskia* pertenece a la familia Cactáceae con forma de vida columnar ramificada la cuál presenta dos especies *chende* y *chichipe* ambas endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, generalmente se encuentran en forma silvestre, manejadas *in-situ* y cultivadas.

La conservación del germoplasma de estas especies es particularmente importante no solamente por ser endémicas y con una distribución restringida, en la reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, sino que además presentan poblaciones escasas y con pocos individuos. Estas especies son un componente importante de un tipo particular de asociación vegetal desempeñando un papel crucial en la comunidad, interactuando con insectos (mariposas nocturnas, hormigas, cigarras, abejas, coleópteros) y aves los cuáles participan en la polinización y dispersión de estas y otras especies.

A pesar de su importancia, las poblaciones de estas especies se encuentran en peligro por diferentes factores como son:

1) Las poblaciones silvestres se han reducido debido a la expansión de las tierras de cultivo. Estas poblaciones han sido reducidas a parches de “chichiperas” localizadas principalmente en la punta de cerros y colinas. El flujo genético entre poblaciones distantes parece ser posible porque la gente deja individuos de estas especies en zonas desmontadas. Sin embargo, los efectos de la fragmentación podrían estar favoreciendo la endogamia y reduciendo la variación genética en las poblaciones.

2) El pastoreo de cabras y vacas pueden tener efectos directos en las poblaciones de estas especies por el consumo de las plántulas, plantas jóvenes ó plantas nodriza.

3) El manejo de las poblaciones que se encuentran dentro y cerca de los poblados es benéfico con fines de conservación, sin embargo, no hay reemplazo de los individuos que mueren o son utilizados como leña. Adicionalmente, la selección artificial ejercida sobre estas poblaciones puede reducir su variación.

4) El uso de insecticidas con fines agrícolas afecta a las poblaciones de abejas, las cuales son cruciales para la polinización de estas especies. Este factor afecta principalmente a los individuos de las poblaciones manejadas y podría ser una limitante para el flujo de polen hacia las poblaciones silvestres.

Importancia etnobotánica de las especies

Las cactáceas columnares no sólo constituyen especies clave en las comunidades bióticas de las zonas áridas y semiáridas, sino que además son recursos de un considerable potencial económico. Hoy día, cientos de comunidades rurales las utilizan para satisfacer sus necesidades de subsistencia y comercializan sus productos a escala local o regional. Sin embargo, algunas especies podrían tener importancia en mercados internacionales y su comercialización contribuiría a beneficiar la economía campesina.

La manipulación de estas especies se realiza mediante la recolección de frutos en los tres tipos de poblaciones. Sin embargo, los fenotipos con frutos más dulces y más grandes son propagados mediante semillas, ramas o transplantando individuos completos, únicamente en las poblaciones manejadas y cultivadas (Cruz *et al.*, 2002; Carmona *et al.*, 2005).

En el caso de *Polaskia chichipe* se ha registrado la elaboración de frutos "pasados", es decir, dejándolos secar al sol además de ser utilizados para preparar mole. *Polaskia chende* es utilizada por las comunidades principalmente por sus frutos comestibles, consumidos en forma fresca, pero algunos se utilizan para preparar aguas, mermeladas y helados (Cruz *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 2005; Carmona *et al.*, 2005)

Los tallos y los frutos de estas especies son utilizados como forraje. Con este fin, los pastores cortan ramas y en ocasiones quitan las aréolas con el machete. También suelen recolectar frutos o sus cáscaras para dárselas directamente al ganado o para preparar ensilados. Con los frutos de estas especies se prepara una bebida fermentada conocida como nochoctli o colonche, a manera de pulque o vino. Las semillas se consumen separadas de la pulpa. Se secan, se asan y muelen para preparar una pasta comestible a manera de mantequilla o bien para preparar salsas.

Los tallos tiernos también son comestibles. Generalmente se quitan las espinas y se hacen cortes longitudinales a la rama con el fin de eliminar la porción medular. Las tiras de tejido fotosintético pueden hervirse o asarse y de esa forma la cutícula puede eliminarse con facilidad. Se consumen guisadas o encurtidas con vinagre.

La madera de varias especies de cactáceas columnares gigantes se utiliza comúnmente en la construcción de techos y cercas de las casas campesinas tradicionales. Algunas especies se utilizan como cercas vivas y como bordos de contención en terrazas. Los tallos secos de

algunas especies se utilizan como leña para calentar y preparar alimentos, y los de *Polaskia chichipe*, *Polaskia chende* se usan en hornos para la manufactura de cerámica tradicional.

Por medio del manejo in situ, los campesinos dejan en pie algunos individuos cuando talan la vegetación y en ocasiones también promueven su abundancia por medio de propagación vegetativa. En el caso de *Polaskia chende* y *Polaskia chichipe*, la plantación de ramas, aunque no imposible, es rara, pues la propagación vegetativa es menos exitosa que en los casos de *Stenocereus*. Más bien, la gente practica el transplante de individuos jóvenes (de entre 20 y 30 cm) con el fin de optimizar el uso del espacio abierto con fines agrícolas (Otero *et al.*, 2005; Carmona *et al.*, 2005).

Debido a que los individuos así tolerados compiten por espacio con las plantas cultivadas, la gente selecciona cuáles especies son las mejores tomando en cuenta la calidad de sus frutos los cuales los prefieren relativamente más grandes, con sabor más dulce, con cáscara delgada y con pocas espinas.

En los casos de *Polaskia chende* y *Polaskia chichipe* se cortan brazos completos desde la articulación, de 40 cm o más. Estas ramas se dejan secar al sol durante dos semanas con el fin de prevenir infecciones en el área de corte; posteriormente se plantan en hoyos en los cuales se ha depositado previamente estiércol de cabra. La plantación se lleva a cabo a finales de abril y principios de mayo, unas cuantas semanas antes del periodo lluvioso. Los individuos que se encuentran en las huertas también pueden derivarse de plántulas toleradas por los campesinos, las cuales se establecieron en las huertas a partir de semillas dispersadas por medio de excretas de aves, murciélagos o humanos o a partir del transplante de individuos jóvenes, los cuales aportan nueva variación genética junto con las plántulas que se establecen y se toleran. Debido a que la gente no reconoce las diferentes variantes de frutos con base en características vegetativas, la decisión de eliminar o dejar en pie los individuos establecidos por esta vía se toma después de que los individuos producen frutos por primera vez (Cruz *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 2005; Carmona *et al.*, 2005)

Origen y Clasificación de Semillas

La semilla es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores, y es considerada como el medio natural de dispersión, propagación y perpetuación de muchas especies vegetales, pues contiene las sustancias nutritivas, la maquinaria metabólica y las estructuras celulares necesarias para formar una nueva planta.

Las semillas se originan de óvulos fertilizados que al llegar a su madurez constan de testa, endospermo y embrión, la testa se forma a partir de los tegumentos del ovario y su importancia es relevante para la semilla ya que en ocasiones es la única barrera entre el embrión y el medio externo. La testa, es generalmente dura y su naturaleza protectora se debe a la presencia de ceras o grasas que le confieren propiedades de impermeabilidad, lo que produce un efecto en el metabolismo de la semilla. El endospermo o material de reserva se forma por la fusión de dos núcleos polares del ovulo y un núcleo espermático constituido por diversas sustancias entre las que destacan los carbohidratos (almidón y hemicelulosa) lípidos y proteínas los cuáles son utilizados por el embrión durante la germinación y para sostener a la plántula en las primeras etapas de su crecimiento y desarrollo, a la vez, el embrión se encuentra constituido por el eje embrionario y uno o más cotiledones (Niembro, 1990) Figura 1.

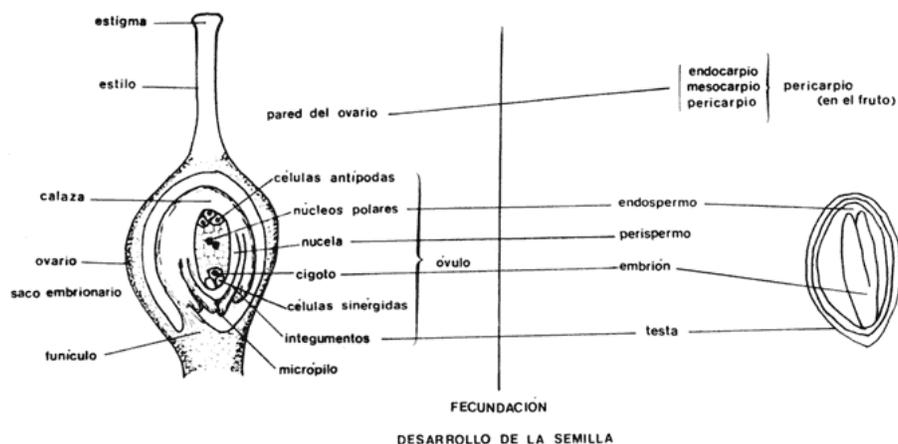


Figura1. Origen y desarrollo de las estructuras de las semillas

El contenido hídrico de las semillas y su capacidad para perder agua naturalmente son factores críticos que determinaran la longevidad y capacidad de almacenamiento de las mismas (Figuroa *et al.*, 2004). Con base en la capacidad de longevidad que las semillas pueden presentar en condiciones de almacenamiento se clasifican tres tipos: semillas ortodoxas, recalcitrantes e intermedias.

Se ha definido como semillas ortodoxas como aquellas que pueden mantenerse viables con bajos contenido de humedad, baja tasa metabólica y resistencia al frío. Este tipo de semillas, son aptas de almacenarse por largos periodos de tiempo, pasan por una etapa de deshidratación (pérdida de agua) y de completa inhibición del metabolismo, por lo cuál su tasa respiratoria es mínima. Tienden a ser de talla pequeña (con excepción de las que tienen testa dura) y se desprenden de la planta madre con un contenido de humedad generalmente menor al 20% sobre su peso. En estado de latencia su tasa respiratoria es insignificante y pueden permanecer almacenadas por largos periodos a temperaturas menores de 5°C cuando alcanzan bajos niveles de hidratación (menos del 5% sobre su peso). Las semillas ortodoxas son frecuentes en ambientes con climas marcadamente estacionales, caracterizados por periodos más o menos prolongados de sequía o frío. Las plantas que las producen con frecuencia son herbáceas, arbustos, así como cactáceas y plantas suculentas que habitan sitios con estación seca marcada. En ambientes húmedos (tropicales y subtropicales) se presentan entre las plantas oportunistas de hábito herbáceo y arbustivo y rara vez en algunos árboles (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Las semillas recalcitrantes son aquellas que presentan alto contenido de humedad, tasas metabólicas más elevadas y longevidad corta. A diferencia de las ortodoxas, las semillas recalcitrantes no pueden ser almacenadas, tienen escasa longevidad y son producidas por plantas leñosas, fundamentalmente árboles de ambientes húmedos ya sea tropical, subtropical o templado. Las semillas maduras generalmente tienden a ser grandes y son liberadas de la planta madre con un alto contenido de humedad (entre el 40 y 60% de agua sobre su peso). Así mismo, su latencia es de una naturaleza más efímera y menos profunda, y en muchos casos no se puede asegurar que la presenten. Por ello, no se presenta como tal una interrupción del metabolismo, por lo que en ningún momento dejan de respirar, manteniendo un requerimiento de oxígeno elevado; por ello, al carecer de ventilación adecuada, las semillas mueren (Figueroa y Jaksic, 2004).

Como las semillas recalcitrantes no están condicionadas ni estructural ni fisiológicamente para resistir la desecación y el frío, al tratar de almacenarlas se presentan los siguientes problemas: daños en la estructura celular provocados por desecación cuando su contenido de humedad se reduce por debajo del 20%; daños por congelación, provocados por la formación de cristales cuando se almacenan con altos contenidos de humedad; problemas asociados con el almacenamiento hermético en una condición húmeda, en donde hay falta de oxígeno,

contaminación por hongos y bacterias y germinación durante el almacenamiento (Vázquez-Yanes *et al.*,1997).

Las semillas intermedias se caracterizan por tener cierta sensibilidad a la desecación hasta un nivel de humedad relativamente bajo de 7 a 10%(en equilibrio con una humedad relativa ambiente de 30 a 50%).Por eso las condiciones ideales de almacenamiento para las semillas ortodoxas resultan ser potencialmente dañinas para las semillas intermedias ya que les provoca la muerte en pocos meses. A pesar de esto es posible almacenar las semillas intermedias por periodos de alrededor de 10 años, secándolas hasta un 7-10% de contenido de humedad y manteniéndolas a la temperatura de ambiente.

Alteraciones fisiológicas y bioquímicas asociadas al envejecimiento en semillas

Las semillas no permanecen viables indefinidamente sino que tienen determinada longevidad, entendiéndose como el tiempo en que la semilla mantiene su capacidad para germinar en estado latente ó quiescente. Es posible distinguir dos tipos de longevidad, potencial y ecológica. El primer tipo de longevidad tiene que ver con la duración máxima de la viabilidad que puede conseguirse en ciertas condiciones de almacenamiento en un medio artificial pretendiendo que sea optimo, y el segundo tipo la longevidad ecológica se refieren a la que tienen las semillas en la naturaleza después de que se han diseminado y llegado al suelo, donde los factores físicos del medio natural así como los parásitos y depredadores influyen en su longevidad. Las características estructurales y fisiológicas de las semillas determinan en buena parte su longevidad, entre las cuales se tiene: la presencia o ausencia de un periodo de pérdida de humedad previo a la maduración (desecación), el estado de madurez del embrión, el contenido de sustancias en el interior de la semilla que impiden la germinación, la resistencia a la desecación o al frío y la presencia de testas gruesas o duras (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

En el estado de madurez fisiológica las semillas alcanzan normalmente su máxima calidad representada por el peso seco, potencialidad de germinación y vigor. A partir de ese estado comienza una disminución progresiva de su calidad fisiológica. El proceso del deterioro varia entre especies y entre semillas del mismo lote. Algunos estudios (Barboza *et al.*, 1990; El-Kassaby *et al.*, 1998; Araos *et al.*, 1999) han indicado que las condiciones de almacenamiento propician la reducción al mínimo de la velocidad de deterioro de las semillas. Su longevidad depende de las condiciones ambientales, siendo los ambientes secos y fríos los más adecuados para el almacenamiento de semillas ortodoxas según el ISTA (2003); Sin embargo,

de manera general, la viabilidad tiende a disminuir, cuando la temperatura de almacenamiento es mayor a 20° C.

A pesar de que el envejecimiento de las semillas se encuentra influenciado por una gran variedad de factores que determinan la pérdida de viabilidad, se ha dado mayor importancia a la temperatura y a la humedad como los responsables de tal deterioro (Barboza *et al.*, 1990; El-Kassaby *et al.*, 1998; Madrid, 2001; De Paula, 1994; Salinas *et al.*, 2002; Vergara, 2002; Zabaleta, 2003; Lozada, 2005; Manuell, 2006).

Además, de una serie de reservas menores todas las semillas contienen las tres clases de reservas mayoritarias dentro de los diferentes tejidos de las mismas: lípidos, proteínas y carbohidratos, aunque sus proporciones relativas varían en función de factores genéticos y ambientales. De acuerdo a esto, algunos estudios sobre el envejecimiento en semillas se han centrado en la búsqueda de alteraciones fisiológicas y bioquímicas que se encuentran estrechamente relacionadas con la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), que se forman de manera natural durante el metabolismo aerobio o durante una etapa de estrés, las cuales a su vez propician daños a las biomoléculas de las semillas (Fig. 2) (Simic, 1991; Colmes *et al.*, 1992; Ozawa, 2005 citados por McDonald, 1999). Las diversas formas de las especies reactivas pueden llegar a dañar las membranas de las células en sus lípidos y proteínas, y en general cualquier molécula biológica, por lo que se ha planteado que este puede ser uno de los principales factores que actúan en el deterioro de las semillas en almacenamiento. Algunas evidencias que han sustentado esta idea son:

Alteración de proteínas

Uno de los principales eventos metabólicos que suceden en las semillas al momento de la germinación es la hidrólisis de las proteínas de reserva que proveen a la plántula en crecimiento los nutrientes necesarios para que comience a fotosintetizar. Las proteínas son modificadas de diferente manera por las especies reactivas de oxígeno. En el comienzo de la germinación los cambios en las actividades enzimáticas en las semillas envejecidas son una función de la pérdida en la capacidad para sintetizar proteínas. Se ha demostrado que los primeros estadios del deterioro de las semillas están asociados a una reducida síntesis proteica y que los daños en los mismos ocurrirían a nivel de traducción y transcripción (Salinas *et al.*, 2002). Debido a la reactividad de los radicales libres con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y

cisteína pueden sufrir modificaciones de sus aminoácidos mediadas por la acción de radicales libres. Por otro lado, muchas enzimas experimentan inactivación y/o reducción en su síntesis, probablemente por el ataque de su estructura ocasionada por ERO como por ejemplo la catalasa que es inhibida por el O₂, y la convierte en sus formas inactivas ferroxi y ferrilo. También se ha reportado la degradación de la maquinaria esencial para la síntesis de varias enzimas, ya que la cantidad de ARN transportado fuera del núcleo disminuye en semillas envejecidas (McDonald, 1999).

Alteración de carbohidratos

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical OH para producir sustancias reactivas (Sies, 1985 y Blake *et al.*, 1987 citados por McDonald, 1999). Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso fragmentándose a unidades más sencillas. Moy (1980 citado por McDonald, 1999) y Vázquez *et al.* (2006) han demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo. Adicionalmente se ha demostrado que durante el envejecimiento en semillas de maíz y soya se presenta una disminución de los azúcares (Camacho, 1999).

Alteración de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados por los radicales libres. Realmente la citotoxicidad de estas especies químicas, en gran parte, es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del ADN al reaccionar con los radicales libres, especialmente con el OH⁺. Las modificaciones químicas de los nucleótidos provocan, en muchos casos, la ruptura de hebras del ADN. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien la célula muere. En semillas secas envejecidas se ha encontrado un incremento de nucleótidos libres y ADN con menor integridad con respecto a sus contrapartes no envejecidas (Osborne, 1982; citado por Camacho, 1999). Adicionalmente se ha sugerido que durante el almacenamiento prolongado se lleva a cabo la inactivación de inhibidores de ADNAsas que pueden entonces degradar el ADN de las semillas.

Disfunción mitocondrial

Las mitocondrias proveen el ATP necesario para el crecimiento de la plántula durante la germinación, también representan la fuente más rica de oxígeno en las células de las semillas. Sucede entonces una paradoja el oxígeno que se utiliza para la respiración es el mismo que, cuando pasa por una cadena de transporte de electrones, conduce a un pequeño porcentaje de electrones a formar el radical superóxido. Dentro de la mitocondria este radical ocasiona la peroxidación de lípidos en la membrana interna de la mitocondria y por lo tanto reduce la cantidad de ATP durante la germinación. Además, el ADN mitocondrial presente en la matriz es blanco fácil de ataque por estas moléculas (McDonald, 1999).

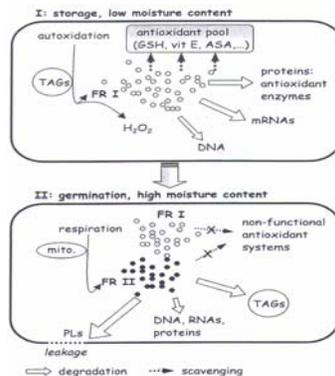


Figura 2: Mecanismos oxidativos involucrados en el daño en semillas envejecidas. I: autooxidación de lípidos por la formación de radicales libres. II: Activación del metabolismo y formación de ROS durante la germinación.

Mecanismos antioxidantes enzimáticos

Los sistemas antioxidantes constituyen un grupo variado de enzimas que intervienen en la defensa celular como respuesta al estrés. Entre las enzimas más importantes se encuentran la SOD, CAT, POX encargadas principalmente de eliminar el peróxido de hidrógeno producido en diferentes partes de la células (Figura 3).

La reactivación del metabolismo que ocurre durante la imbibición de las semillas puede constituir una fuente importante de ERO, ya que se ha reportado que en etapas tempranas de la imbibición de semillas de varias especies se produce peróxido de hidrógeno; por ejemplo en semillas de soja (Puntarulo *et al.*, 1988; 1991; Gidrol *et al.*, 1994, citados por Bailly, 2004), rábano (Schopher *et al.*, 2001, citado por McDonald, 1999), maíz (Hite *et al.*, 1999 citado por McDonald, 1999), girasol (Bailly *et al.*, 1996), trigo (Caliskan Iccunning, 1998 citado por Bailly,

2004) y tomate (Morohashy, 2002, citado por Bailly, 2004). También la acumulación de otras ERO tales como radicales hidroxilo (Schopher *et al.*, 2001, citado por Bailly, 2004) y radicales superóxido (Puntarulo *et al.*, 1988; Schopher *et al.*, 2001; Gidrol *et al.*, 1994, citado por Bailly, 2004) ocurre durante la germinación de semillas. Aún así, no se conoce con precisión el sitio exacto donde se generan las especies reactivas de oxígeno durante la germinación, por lo cuál se han propuesto como sitios de síntesis los ejes embrionarios y la cubierta de las semillas (Bailly, 2004).

La producción de ERO por las semillas que se encuentran en proceso de germinación ha sido considerada como una causa de estrés capaz de afectar su propia germinación, por lo tanto algunas enzimas y compuestos antioxidantes son considerados de vital importancia para el éxito de la germinación. Algunos compuestos antioxidantes no enzimáticos tienden a aumentar durante la germinación tales como α tocoferol (Simontachi *et al.*, 1993, 2003; Yang *et al.*, 2001, citados por Bailly, 2004), flavonoides y fenoles (Simontachi *et al.*, 1993, 2003; Andarwulan *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001, citados por Bailly, 2004); también se ha reportado que el ascorbato y el glutatión reducido tienden a aumentar durante las etapas tempranas de la imbibición en las semillas (Kranner y Gille, 1993; De Gara *et al.*, 1997; Tomás *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; De Tulioliarrigoni, 2003; citados por Bailly, 2004).

Por otro lado, se ha reportado que en semillas no imbibidas las enzimas presentes pueden mantener su capacidad catalítica intacta a pesar de que uno de los factores que limite su actividad sea la humedad (De Paula, 1994). Las causas más comunes que propician la respuesta antioxidante de estas enzimas son: respuesta a temperaturas extremas, patogénesis, radiación, anoxia e hiperoxia, herbicidas, hormonas, peróxido de hidrógeno y luz. Se ha reportado que el papel fisiológico de estas enzimas tiene un efecto protector frente al daño oxidativo producido por distintas formas de estrés, principalmente, por altas o bajas temperaturas y humedades relativas. Diversos estudios acerca del estrés ocasionado por el envejecimiento acelerado en semillas han reportado el aumento o disminución en la actividad enzimática de CAT (catalasa) y POX (peroxidasa) (Orman., 1980; Sung y Jean, 1994; Sung y Chiu, 1995; Sung, 1996; Bailly *et al.*, 1996; Basavarajappa *et al.*, 1991 citado por Scandalios, 1997; Madrid, 2001; De Paula, 1994; Goel *et al.*, 2003). La disminución en la actividad de CAT se ha relacionado con el aumento en la peroxidación lipídica, mientras que, su aumento se ha visto relacionada con una adaptación de las células para tolerar el estrés (De Paula, 1994).

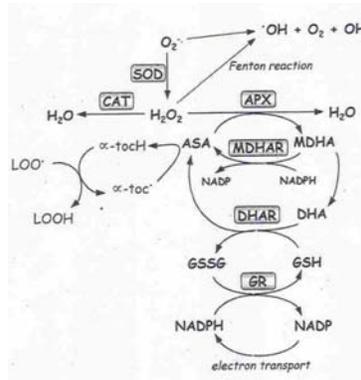


Figura 3: Principales mecanismos antioxidantes presentes en las plantas.

Peroxidación de Ácidos Grasos

Desde el punto de vista químico los radicales libres son especies químicas cargadas o no que en su estructura química presenten uno a más electrones sin aparear, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, la cuál le confiere una avidez física por la captura de un electrón de cualquier otra molécula de su entorno. Esto ocasiona que la estructura afectada quede inestable, de esta forma pueden establecerse reacciones en cadena por medio de varios transportadores que se oxidan y se reducen secuencialmente.

Desde el punto de vista molecular los radicales libres son moléculas difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentra la cadena respiratoria mitocondrial y las reacciones de oxidación produciendo daño celular oxidativo al interactuar con las principales biomoléculas. Las estructuras dentro de las células que son utilizadas como sustratos para la generación de radicales libres se encuentran principalmente en las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, la citoplasmática y la del retículo endoplasmático. Los radicales libres se forman por fuentes exógenas o endógenas, siendo considerado el oxígeno como la principal fuente molecular, dentro de las principales especies reactivas de oxígeno o sustancias pro-oxidantes se encuentran:

Hidroxilo	$(HO)^+$
Peroxido de Hidrogeno	(H_2O_2)
Anión súperoxido	O_2^-
Singulete de Oxigeno	O_2
Oxigeno nítrico	NO
Semiquinona	Q
Peroxido	ROO

La peroxidación lipídica ó enrranciamiento oxidativo representa una forma de daño histológico que puede ser desencadenado por el singulete de oxigeno, el peróxido de hidrógeno y peróxidos. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares por lo que se cree que son importantes para su funcionamiento normal, Sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo generado por los radicales libres del oxigeno.

La peroxidación de lípidos se lleva a cabo cuando una molécula reactiva, como es el hidroxilo (OH), ataca un ácido graso constituyente de triacilgliceridos ó fosfoacilgliceridos. La interacción del radical libre va dirigida al carbono adyacente, a un doble enlace, ocasionando un rompimiento homolítico al sustraer un hidrógeno que forma agua al unirse al radical, mientras que, el ácido graso presenta un radical libre (electrón) en el carbono afectado por el hidroxilo. Una vez que a un fosfolípido se le arrebatara un electrón, éste busca estabilizar su estructura química y tomar el electrón de la molécula próxima, generándose así una reacción en cadena, esta se divide en tres fases: iniciación, propagación y terminación.

La fase de iniciación ocurre cuando un radical libre ataca a un grupo metilo de la cadena carbonada del acido graso, extrayendo un átomo de hidrógeno, lo que da lugar a un nuevo radical libre. En los ácidos grasos altamente insaturados esta reacción se ve favorecida debido a la alta reactividad de los grupos metilenos adyacentes con doble enlace. Los radicales libres lipídicos tienden a estabilizarse mediante un reordenamiento interno, dando lugar a los dienos conjugados.

En la fase de propagación el radical (R^*) liberado durante la etapa de iniciación puede reaccionar para formar un radical lipídico peroxi ROO^* , el que puede reaccionar posteriormente para dar un hidroperóxido $ROOH$. En la segunda reacción dentro de la fase de propagación además se produce un radical libre, lo que hace que el proceso sea auto-propagable.

En la fase de terminación la reacción puede detenerse mediante un antioxidante, el cuál actúa

atrapando radicales libres; otra vía que concluye la antioxidación es que cualquier clase de radical libre alquílico del lípido R^* reacciona con un radical lipídico peroxi ROO^* dando lugar a una especie relativamente estable no-iniciadora y no-propagadora.

Los radicales libres juegan un papel fisiológico importante en el envejecimiento de las semillas, Sin embargo, aún no se ha determinado si la peroxidación de los ácidos es la principal causa en la pérdida de viabilidad o si esta ocurre después de su muerte como parte del proceso de deterioro (Priesley y Leopold, 1983).

Los productos de la descomposición de los hidroperóxidos, entre los que se encuentran el etanol y el malondialdehído considerados como marcadores de la peroxidación, pueden actuar sobre las membranas alterando su funcionalidad, sobre el ADN desnaturalizado y sobre el RNA mensajero, inhibiendo la síntesis proteica (De Paula, 1994). Por otro lado los productos de la peroxidación se encuentran asociados negativamente con la conductividad eléctrica lo cuál parece implicar a las membranas celulares. No obstante esta correlación ha sido asociada con el descenso en la germinación de semillas. La peroxidación en las semillas secas almacenadas aparentemente es debido a la autoxidación de sus lípidos; alternativamente la enzima lipooxigenasa, presente en muchas semillas secas, también es capaz de producir radicales libres y por lo tanto catalizar la lipoperoxidación empleando los fosfolípidos de las membranas como sustratos. Las semillas ortodoxas constituyen un sistema seco, en el cuál, la velocidad de lipoperoxidación de los triacilgliceridos inicia lentamente (periodo de inducción) y se acelera conforme avanza el tiempo de almacenamiento. Se ha demostrado que a alta temperatura y humedad relativa el periodo de inducción se hace más corto y la velocidad de la siguiente fase se incrementa exponencialmente.

ANTECEDENTES

Se han realizado una gran cantidad de trabajos acerca del deterioro en semillas utilizando el envejecimiento acelerado para imitar los daños producidos durante el almacenamiento a largo plazo. Estos estudios se han enfocado al envejecimiento en especies de interés comercial, principalmente granos como soja (Stewart y Bewley, 1980); café (Barboza *et al.*, 1990); abeto (El-Kassaby, 1998); girasol (De Paula, 1996; 2004); maíz (Camacho, 1999; Madrid, 2001); chicharo y frijol (Madrid, 2001), mientras que, en especies silvestres su estudio se ha visto limitado.

En la mayoría de los casos las evaluaciones periódicas a lotes de semillas se realizan mediante técnicas destructivas (G, TTC), actualmente algunas técnicas no destructivas como SPIN, resonancia electromagnética (EPR), y espectrofotometría de reflectancia en infrarrojo cercano (ERIC o NIRS) han permitido el análisis de las semillas sin dañarlas, pues no requieren la extracción del embrión o incluso la germinación de las mismas.

Existen algunos trabajos de envejecimiento acelerado referentes a la familia Cactácea en los cuales, mediante el uso de la técnica de NIRS como modelo no destructivo, se ha conseguido estimar la composición de ácidos grasos saturados e insaturados, basados en la información de diferentes regiones del espectro de infrarrojo cercano con niveles de confiabilidad de más del 90%, permitiendo la correlación de la viabilidad y los ácidos grasos insaturados en semillas de diferentes especies.

Por ejemplo en semillas de *Stenocereus stellatus* los tratamientos de envejecimiento acelerado a 7% de humedad relativa no alteraron la germinabilidad a lo largo del experimento, sin embargo, generaron una disminución en los ácidos grasos insaturados, por lo que la técnica de NIRS ofreció una correlación altamente significativa en estas especies (Vergara, 2002). En otro trabajo, las semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis* a 45° C y 65% HR mostraron un gradiente de envejecimiento, adicionalmente se señala que en las dos especies de cactáceas hubo una disminución no significativa de ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico); y la correlación de la técnica de NIRS con la germinación real de las semillas fue satisfactoria por lo que el uso de la técnica de NIRS se sugiere como método confiable para estudiar la viabilidad de semillas (Lozada, 2005). Adicionalmente, en semillas de *Pachycereus hollianus* se presentó una disminución de los ácidos grasos saturados e insaturados (65 % HR 55° C) correlacionados con la viabilidad de las semillas, por lo que el uso de la técnica de NIRS fue exitosa (Manuell, 2006).

Por otro lado, las semillas de *Beaucarnea gracilis* y *Hechtia podantha* mostraron relación entre los ácidos grasos insaturados y la viabilidad en las semillas. Cabe señalar, que a 55° C y 60% HR las *Beaucarnea gracilis* mostraron un gradiente escalonado en la longevidad de las semillas, sin embargo, en *Hechtia podantha* el mismo tratamiento generó una disminución más drástica ocasionando la muerte del 80% de las semillas. En este estudio el uso de la técnica de NIRS no se consideró confiable para estas especies (Zavaleta, 2003).

Conviene señalar que existen datos contrarios sobre la semejanza de efectos observados en el envejecimiento natural y artificial relacionados con el contenido de ácidos grasos insaturados por ejemplo, según Priesley y Leopold (1983), en semillas de soja sometidas a envejecimiento natural (44 meses) sufrieron una marcada reducción de vigor y viabilidad que fue asociada a una disminución en la proporción de ácidos grasos insaturados. En cambio, cuando las semillas fueron sometidas a un envejecimiento acelerado (10 días a 40° C) se observó una disminución comparable de vigor y viabilidad, pero sin cambios en el contenido de ácidos grasos insaturados.

HIPÓTESIS

Si la peroxidación es un proceso que participa en el esquema de daño asociado al envejecimiento en las semillas, entonces este deterioro puede provocar la autooxidación de los lípidos presentes formando especies reactivas de oxígeno que ataquen algunas enzimas antioxidantes como catalasa y peroxidasa afectando la viabilidad de las semillas, además de provocar que la concentración en los ácidos grasos tiendan a disminuir.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de las semillas de *Polaskia chende* y *Polaskia chichipe*, sometidas a condiciones de envejecimiento acelerado y correlacionarla con la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de ácidos grasos mediante el uso de la técnica de NIRS como alternativa no destructiva.

Objetivos Particulares

- ♣ Determinar las condiciones más adecuadas para la germinación de las semillas de *Polaskia chichipe* y *Polaskia chende*.
- ♣ Inducir el envejecimiento acelerado en diferentes condiciones de humedad relativa (HR) y temperatura para obtener un gradiente de longevidad en las semillas en estudio.
- ♣ Identificar los ácidos grasos saturados e insaturados y determinar su concentración por medio de cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (GC-MS).
- ♣ Correlacionar los espectros de NIRS con los resultados de ácidos grasos para obtener un modelo mediante un programa Quimiométrico, que permita predecir el nivel de los mismos.
- ♣ Correlacionar los espectros de NIRS con los resultados obtenidos de germinación para obtener un modelo mediante un programa Quimiométrico, que permita pronosticar la germinación o nivel de envejecimiento de las semillas.

- ♣ Evaluar la técnica de NIRS como una alternativa no destructiva de estimación de la viabilidad en un lote de semillas de *P.chende* y *P. chichipe*.
- ♣ Cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y peroxidasa a diferentes tiempos de envejecimiento y correlacionarla con la viabilidad de las semillas.

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Los frutos colectados para la obtención de semillas de *Polaskia chende* y *Polaskia chichipe* pertenecen a una población silvestre ubicada en el cerro llamado "Tocotin" que esta localizado aproximadamente a 3 Km. de San Luís Atolotitlán en el municipio de Caltepec, Puebla (18° 11' 16" N, 097° 25' 28" O), con una elevación de 2100 msnm en suelos compuestos principalmente de rocas volcánicas (Rzedowsky, 1978) Figura 4.

Las principales especies presentes en el área son *Pachycereus marginatus*, *Stenocereus dumortieri* (F. Buxbaum), *S. pruinosus*, *Myrtillocactus schenkii*, *Opuntia pilifera* (Weber), *Agave potatorum* (Zucc), *Senecio praecox*, *Ipomea arborecens*, *Ipomea murocoides* (Poemar y Schultes) *Acacia cochlyacantha* (Humb. Y Bonpl. Ex Willd), *Acacia constricta* (Benth), *Mimosa luisiana* (Brandege), *Eyisenhardtia polisthachya* (Ortega), *Ferocactus latispinus* (Britton y Rose) así como *Polaskia chende* y *Polaskia chichipe* (Bacherberg, Blatt. Sukk).

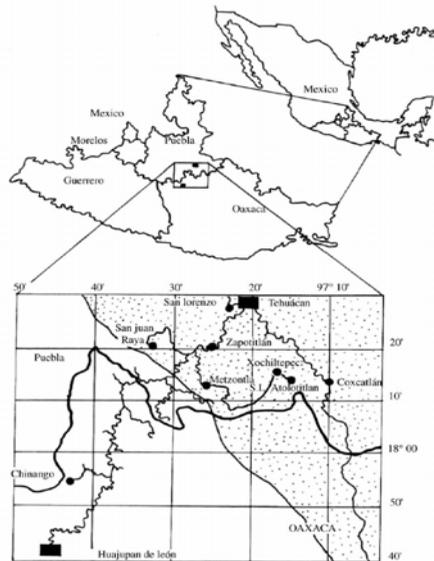


Figura 4. Área de Estudio, San Luís Atolotitlán-Puebla.

DESCRIPCION DE LAS ESPECIES

Nombre científico *Polaskia chende* (Roland-Grosselin) A.C. Gibson et K. E. Horak.

Etimología *Chende*: nombre vernáculo de la especie.

Sinonimia *Heliabravoa chende* (Roland-Grosselin) Backeberg.

Nombre comun “Chende”, “Chinoa”, “Xonostle”, “Tunillo”.

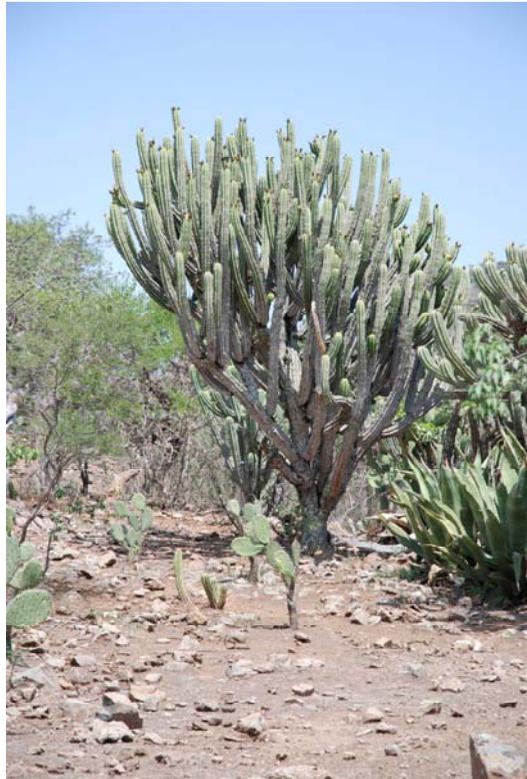


Figura 5. Planta adulta de *Polaskia chende*.

Descripción

Es una planta arborescente, ramificada que alcanza hasta 5m de alto. Sus brazos presentan de 7 a 8 costillas con areolas negras y 5 espinas grisáceas. Posee flores campanuladas, solitarias, aromáticas de color rojo- púrpura, rosas o blancas que abren durante el día. Florece de Febrero a Abril. Los frutos son morados globosos de 3 a 4cm de diámetro y contienen pulpa dulce (Fig.6).



Figura 6. Frutos de *Polaskia chende*.

Distribución

Endémica de la región Tehuacan-Cuicatlán Puebla y Oaxaca. La mayor parte de sus poblaciones están integradas de individuos adultos y las plantas juveniles son escasas lo que pone en riesgo la sobrevivencia de la especie.

Nombre científico ***Polaskia chichipe*** Bacherberg, Blatt. Sukk. 1: 4. 1949.

Etimología ***Chichipe***: nombre vernáculo de la especie.

Nombre común “Chichipe”, “Chichituna”, “Chichitun”



Figura 7. Planta adulta de *Polaskia chichipe*.

Descripción

Plantas arborescentes con tronco bien definido hasta 4 m de alto, profusamente ramificadas formando una copa muy compacta. Ramas encorvadas de 7 cm de diámetro color verde claro. Costillas de 9 a 12, agudas, onduladas aproximadamente de 2 cm de alto. Presenta areolas distantes entre si de 1 a 1.5 cm en la depresión de las ondulaciones. Espinas radiales 6 a 7 de 3 a 10 mm de largo, grises con la punta casi negra (Figura 5). Presenta una espina central un poco más grande y gruesa que las radiales y del mismo color. Sus flores son diurnas y pequeñas de 3 cm de largo incluyendo el pericarpelo, segmentos del perianto de color blanco amarillento, tubo receptacular muy corto o pericarpelo con algunas escamas pequeñas. Presenta frutos de color rojo globoso pequeño de 2 a 3 cm de diámetro llevando areolas caducas con espinas de 3 a 4 mm de largo, pulpa jugosa y dulce (Figura 8). Sus semillas son pequeñas, de 1.3 mm de largo.



Figura 8. Frutos de *Polaskia chichipec*

Distribución

Estado de Puebla y Oaxaca. Crece en los alrededores de Tehuacan Puebla y en la mixteca alta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta de Frutos:

Se colectaron frutos maduros de ambas especies, los cuáles fueron tomados directamente de la planta madre siendo una muestra representativa por individuo (30%), cabe señalar que solo se tomaron aquellos frutos que por su tamaño y color indicaron que estos se encontraban maduros. Posteriormente, los frutos fueron colocados en bolsas de papel de estraza y se mantuvieron en un ambiente fresco y seco, esto se hizo para evitar que el fruto aumentara su respiración y pudiera dañar a las semillas, y así impedir la reducción en su potencial de longevidad durante su traslado al laboratorio.

Extracción de semillas

Los frutos fueron llevados al laboratorio de Fisiología Vegetal ubicado dentro de la UBIPRO en la FES-Iztacala. Las semillas de *Polaskia chende* y *Polaskia chichipe* fueron extraídas manualmente después de su colecta. La limpieza de las semillas se realizó lavándolas con agua corriente para quitarles la pulpa. Consecutivamente, se pusieron a secar en oscuridad durante 72 horas sobre una capa de papel absorbente y se determinó el número de semillas producidas por fruto. Finalmente, fueron almacenadas a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) dentro de frascos ámbar con sobres de sílica gel como agente desecante en condiciones de oscuridad.

Germinación

Antes de sembrar las semillas se limpiaron con solución Tween al 1% durante cinco minutos y después se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto, posteriormente, se enjuagaron con agua destilada. Para cada condición experimental se sembraron 20 semillas ($n=5$) de cada especie en cajas petri con agar bacteriológico al 1%, a $25^{\circ}\text{C} (\pm 1)$ con fotoperíodo de 12 horas luz-oscuridad. Todas las pruebas de germinación se realizaron en una cámara de crecimiento equipada con lámparas de luz fluorescente de día (Silvanya, Octron de 32 W) y lámparas de luz incandescente (General Electric de 25 W). Se registró la germinación de las semillas diariamente durante un periodo de 15 días al inicio de la germinación y posteriormente cada tercer día. El criterio para considerar una semilla germinada fue la emergencia de la radícula.

Tratamientos previos

Con el propósito de conocer los requerimientos específicos de germinación se tomo una muestra del lote de semillas de cada especie y se probaron diferentes tratamientos:

Imbibición: Se pusieron a imbibir semillas durante 12, 24 48 y 72 hrs. Trascurrido este tiempo se sembraron 20 semillas (n=5) en cajas petri con agar bacteriológico y se pusieron en una cámara de crecimiento en condiciones de luz-oscuridad.

Luz: Se establecieron condiciones de luz blanca (**LB**), oscuridad (**OBS**) y luz rojo-lejano (**LR**). Para el tratamiento en condiciones de oscuridad se forraron las cajas petri con siete capas de papel aluminio, para los tratamientos de luz rojo-lejano se colocaron las cajas petri dentro de una caja de acrílico rojo y azul (plexiglas No. serie 2424 y 2423, respectivamente). Cabe mencionar que se realizó la medición de la proporción R:FR que penetró en la caja de acrílico siendo igual a 0.05, con una densidad de flujo fotónico de $9.715 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Las mediciones se realizaron con un espectroradiómetro portátil (LI-COR, Inc., Nebraska, U.S.A.) la luz rojo-lejano se midió entre 724-736 nm, la densidad de flujo fotónico entre 400 y 750 nm. Se sembraron 25 semillas (n=4) por cada tratamiento.

Regulador del crecimiento (AG_3): Se sembraron 25 semillas (n=4) en cajas petri con agar bacteriológico al 1% y se aplico ácido giberélico (AG_3) en el medio de cultivo (1000 ppm), en condiciones de luz (**LB- AG_3**) y oscuridad (**OBS- AG_3**).

Tratamiento en frío: Se sembraron 25 semillas (n=4) en cajas petri con agar bacteriológico al 1%, y fueron colocadas en un cuarto frío para someterlas a una temperatura de 10°C durante 45 días en condiciones de luz colocando una lámpara incandescente (General Electric de 25 W).

Gradiente de envejecimiento

Para este ensayo las semillas fueron rehidratadas a 47% HR con solución saturada de LiCl a 20°C durante 2 semanas, esto se realizó para homogenizar la humedad en las semillas y minimizar cualquier cambio en el contenido de humedad presente en las muestras. Para asegurarse de la homogeneidad en la humedad de las semillas se utilizó un higrómetro (hygropalm AW-DIO sensor) con el cual se midió diariamente la humedad relativa tomando muestras al azar, de acuerdo al protocolo de longevidad de semillas del Millennium Seed Bank Project Kew (2007).

Posteriormente, las semillas de cada especie se dividieron en 6 lotes y fueron depositadas dentro de cámaras de envejecimiento las cuales constaban de un recipiente con tapa hermética y una caja de petri adherida a la base. En esta última se depositaron las semillas.

Las condiciones de humedad relativa (HR) fueron controladas con soluciones saturadas de LiCl, manteniendo una humedad constante de 45%, 55%, y 65%. Por otro lado, para las temperaturas se utilizaron estufas las cuales fueron ajustadas a 45° C y 55° C. Para el control se colocaron cámaras de envejecimiento a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad con las mismas humedades relativas. Cabe señalar, que se agregó 15 ml de solución saturada en las cámaras de envejecimiento y se tuvieron dos repeticiones por cada temperatura y HR.

Se tomaron muestras de 20 semillas (n=5) al 1ro, 3ro, 5to, 10mo, 20vo, 30vo y 50vo día de tratamiento, y se sacó el porcentaje de germinación acumulado. Con los datos arrojados por este ensayo se seleccionó la condición de humedad y temperatura que logró un gradiente de envejecimiento en cada especie estudiada.

Envejecimiento acelerado

Para el ensayo de envejecimiento acelerado se utilizaron 5 cámaras de envejecimiento por especie. Las semillas *Polaskia chichipe* se sometieron a 55°C/60% HR, mientras que, las semillas de *Polaskia chende* fueron colocadas a 55°C/55% HR.

Los controles se mantuvieron dentro de cámaras de envejecimiento a humedad y temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Se tomaron muestras de 20 semillas ($n = 5$) al 1ro, 3ro, 5to, 10mo, 20vo, 30vo y 50vo día de tratamiento y se determinó el porcentaje de germinación acumulado (G), tasa máxima de germinación (TMG), tiempo promedio de germinación (TPG) y sincronía de germinación (S). Bajo estas condiciones, también se realizó la extracción, identificación y cuantificación de los ácidos grasos insaturados y saturados al 1ro, 3ro, 5to, 10mo, 20vo, 30vo y 50vo día de tratamiento, así como la medición de la actividad de catalasa y peroxidasa al 1ro, 10mo, 20vo, 30vo y 50vo día de tratamiento.

Extracción y transesterificación de ácidos grasos de semillas

Para la extracción de ácidos grasos se pesaron 20 mg de semillas de cada unidad experimental y se maceraron en un mortero utilizando nitrógeno líquido. Descongelando en una atmósfera de nitrógeno líquido se adicionó 1 ml de Cloroformo disuelto en Metanol (2:1) y se maceró durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo se recuperó la muestra en un tubo eppendorf y se agitó en un vortéx durante 5 minutos. Con el propósito de separar las fases y poder recuperar la fracción orgánica del extracto, se tomaron 1.5 ml de la mezcla y se lavó con 0.2 ml con una solución de NaCl al 0.9%, posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 18,000 x g (14,000 rpm). Después, se tomaron 100 μ L de la fase orgánica y se agregó 100 μ L del estándar interno (ácido heptadecanoico) disuelto en metanol. Cabe señalar que todo el procedimiento de extracción se llevó a cabo a baja temperatura para evitar la oxidación (Priestley y Leopold, 1983). Para la transesterificación se procedió a evaporar la muestra con aire comprimido y se agregó 0.5 ml de trifloruro de Boro (BF_3) al 12% en metanol y se colocó a ebullición en baño maría durante 20 minutos. Pasado este tiempo se sacaron las muestras y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Consecutivamente se adicionó 1 ml de hexano y 0.5 ml de agua destilada para obtener dos fases, de las cuáles se recuperó solo la fase del hexano en un frasco vial. Finalmente, se tomó una alícuota de 1 μ L y se inyectó en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas. De cada muestra inyectada se obtuvieron cromatogramas y se identificaron los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante la comparación de los tiempos de retención del estándar interno y los patrones de fragmentación obtenidos de bibliotecas de referencia.

Análisis de ácidos grasos por GC-MS

El análisis de detección de ácidos grasos se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (6890N Network GC system) acoplado a un espectrofotómetro de masas en modo splitless (5973 Network Mass Selective Detector) con un inyector (7683B series Injector). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Inyección del modo splitless con temperatura del inyector a 200°C, se utilizó una rampa de temperatura del horno programada desde 100 °C hasta 270°C con un aumento de temperatura de 5°C/minuto. La columna del cromatógrafo fue del tipo DB1 (dimetilpolisiloxano). Se utilizó helio como gas acarreador a una velocidad de 35cm⁻¹. Por otro lado, las condiciones del detector de masas fueron: temperatura de la línea de 250°C, con intervalo de 20 a 400 m/z, polaridad positiva, con 200°C de temperatura en la fuente de iones de transferencia.

Registro del espectro de infrarrojo (NIRS) en las semillas y modelo Quimiométrico QUANT+

Para el registro del espectro del infrarrojo (NIRS) se colocaron aproximadamente 100 mg de semillas de cada especie en la macrocopa portamuestra del accesorio de reflectancia difusa para cubrir toda la superficie y así poder leer en el espectrofotómetro de infrarrojo. La lectura de cada muestra se tomó en dos unidades diferentes, porcentaje de transmitancia (% T) y logaritmo del inverso de la reflectancia (log 1/R). Posteriormente, con estos espectros se alimentó el programa QUANT+ para análisis quimiométrico para determinar el grado de correlación existente entre los espectros específicos para cada muestra y los datos obtenidos asignándoles el valor de la concentración de los ácidos grasos y de la germinabilidad de acuerdo al tratamiento utilizado empleando algoritmos mínimos cuadrados parciales (PLS) realizando una previa calibración en la correlación de la línea base.

Obtención de extractos enzimáticos

Todo el procedimiento de extracción se llevó a cabo a una temperatura de 4°C. Para obtener los extractos enzimáticos se utilizaron 50 mg de semillas de cada unidad experimental para lo cual se congeló el tejido con nitrógeno líquido y se trituroó en mortero hasta obtener una harina fina que se homogenizó con 2 ml de solución amortiguadora buffer al 0.1M de fosfatos con pH 7.8 conteniendo polivinilpirrolidona (PVP) al 1% (Goel *et al.*, 2003).

El extracto se centrifugó a 14,000 rpm (18,000 x g) durante 5 minutos, y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se determinó el contenido de proteína total por el método Bradford (1976), mediante una curva de albúmina de bovino de 10 a 50 µg. El extracto obtenido se mantuvo en hielo hasta llevarse a cabo los ensayos de actividad enzimática.

Peroxidasa

La mezcla de reacción estuvo constituida por 300 µL de buffer de citrato de sodio 50 mM (pH 4.8), 40 µL de o-dianizidina a 3 mM, 20 µL de H₂O₂ al 0.2M y 50µg de proteína. La actividad enzimática se determinó utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2S registrando los cambios de absorbancia a 450nm durante 2 minutos con intervalos de 0.1s. Se reportó como: mmol de o-dianizidina/mg proteína/min (Goel *et al.*, 2003).

Catalasa

La mezcla de reacción estuvo constituida por 400 µL de buffer de fosfato de potasio 30 mM (pH 7.0), 20 µL de H₂O₂ al 0.2M y 50 µg de proteína. La actividad enzimática se determinó utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2S registrando los cambios de absorbancia a 240 nm durante 2 minutos a intervalos de 0.1 s. Se reportó como: mmol H₂O₂ mg proteína/min (Goel *et al.*, 2003).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Germinación

El porcentaje de germinación acumulado de cada replica fue transformado al arcoseno (Zar, 1998) y fue ajustado a un modelo exponencial sigmoide ($Y=a/ \{1+b \exp [-cx]\}$) para obtener la tasa máxima de germinación (TMG) con la primera derivada máxima (Olvera, 2001). La primera derivada de la curva exponencial sigmoide fue ajustada aun modelo Gausiano ($Y= a+b \exp (-0.5 [(x-c) /d]^2)$), para obtener el tiempo promedio de germinación (TPG) y la sincronía (S) (Boas, 1983; Finkelstein y Carson 1986; citados por Olvera, 2001). El porcentaje final de germinación, la tasa máxima de germinación, el tiempo promedio de germinación y la sincronía de cada replica fue comparado por un análisis de ANOVA seguido por una prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

Actividad enzimática

Para la actividad de catalasa se transformaron las unidades de absorbancia (U.Abs) a milimoles de peróxido de hidrógeno consumido de cada réplica y fue comparado por un análisis de ANOVA seguido por una prueba de diferencia mínima significativa (LSD). Para la actividad de peroxidasa se transformaron las unidades de absorbancia a milimoles de *o*-dianizidina oxidada y fue comparado por un análisis de ANOVA seguido por una prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

Ácidos grasos

En el caso de los ácidos grasos el estándar interno (ácido heptadecanoico) se utilizó para determinar la concentración de los ácidos grasos en base al área ocupada transformándolos en $\mu\text{g/g}$. Se realizó un análisis de ANOVA seguido por una prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

RESULTADOS

Número de semillas por fruto

El número de semillas por fruto de *Polaskia chende* varió de 276 hasta 893 con un promedio de 509.8 semillas por fruto, mientras que, en *Polaskia chichipe* el número de semillas varió de 202 a 505 con un promedio de 345.1, estadísticamente no se encontraron diferencias significativa entre estas especies. ($P = 0.0001$).

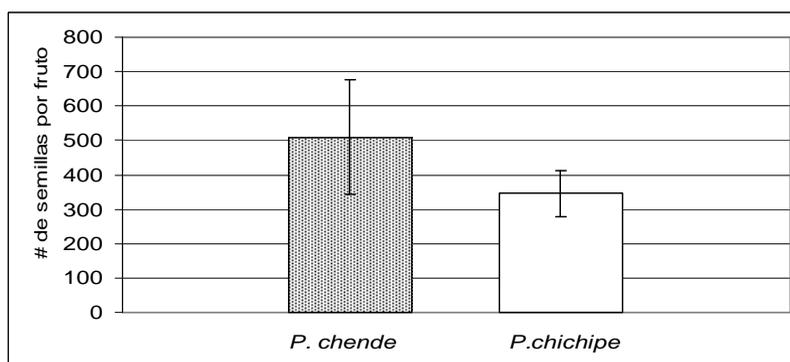


Figura1. Número de semillas por fruto en *Polaskia chende* y *Polaskia chichipe*.

POLASKIA CHICHIPE

Hidratación de semillas

En general, las semillas de *Polaskia chichipe* no requieren condiciones específicas que permitan la entrada de agua a la semilla, ya que no se requirió ningún tipo de escarificación.

Para la hidratación de las semillas se llevaron a cabo tratamientos de imbibición de 12, 24, 48 y 72 hrs, obteniéndose que, para las semillas de *Polaskia chichipe* el mejor tiempo de imbibición fue a las 48 hrs, tiempo en el que presentó el máximo porcentaje de germinación (98%) a comparación con 12 y 24 hrs que sólo obtuvieron 80% y 86% respectivamente. El tratamiento a las 72 hrs de imbibición no presentó diferencias (96%) con el tratamiento a las 48 hrs.

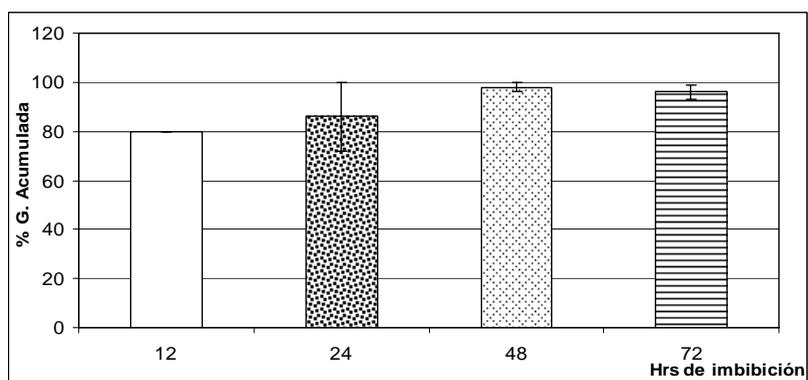


Figura 2. Porcentaje de germinación acumulada en semillas de *Polaskia chichipe* durante 12, 24, 48 y 72 horas de imbibición.

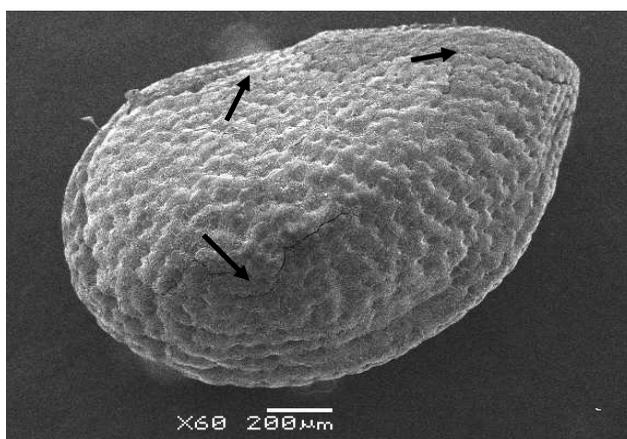


Imagen A: Ruptura de testa en semilla de *Polaskia chichipe* imbibida durante 48hrs.

Tratamientos previos

Las semillas de *Polaskia chichipe* fueron sometidas a condiciones de luz blanca (LB), luz blanca con ácido giberélico (LB-AG₃), oscuridad (OBS), oscuridad con ácido giberélico (OBS-AG₃), rojo lejano (RL) y germinación en frío (FRIO). El ANOVA mostró diferencias significativas entre los tratamientos $F_{(5,18)} = 194.08$ con $P = 0.0000$ en el porcentaje de germinación acumulado (G). De acuerdo a la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) la respuesta de germinación no presentó diferencias significativas en LB y LB con giberelinas (apéndice A, sección I). Por otro lado, las semillas de *Polaskia chichipe* expuestas a RL se mostraron indiferentes a ésta condición de luz, ya que no presentó diferencias significativas respecto al tratamiento de LB.

Sin embargo, si tuvo diferencias con el resto de los tratamientos (apéndice A, sección I). Como se puede apreciar en la figura 3 las semillas comenzaron a germinar al 3^{er} día en la mayoría de los tratamientos excepto en Obs-AG₃ el cuál fue a los cinco días.

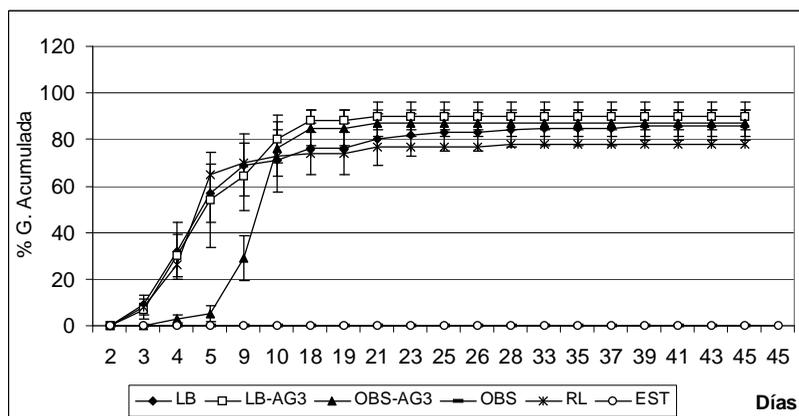


Figura 3. Porcentaje de germinación acumulada de semillas de *Polaskia chichipe* a diferentes tratamientos de luz y oscuridad durante 45 días (n=4).

En cuanto al tratamiento en oscuridad con giberelinas la prueba de LSD no mostró diferencias significativas con los tratamientos expuestos a LB y LB-AG₃. Por otro lado, las semillas que fueron sometidas a 10°C y a oscuridad no germinaron durante todo el período de estudio por lo que presentaron diferencias significativas con el resto de los tratamientos (apéndice A, sección I). Estos resultados indican la existencia de fotoblastismo positivo (respuesta a la luz) al no germinar en la oscuridad. Adicionalmente, los datos obtenidos en luz RL sugieren que estas semillas pueden germinar en el suelo aún con niveles bajos de luz.

Gradiente de Envejecimiento Acelerado

Con el propósito de generar un gradiente de longevidad se probaron condiciones de temperatura y humedad relativa que de acuerdo a trabajos previos han dado resultado con semillas de cactáceas por lo que se optó por las siguientes: 45°C, 55°C y temperatura ambiente y 45%, 55%, 60% y 65% HR.

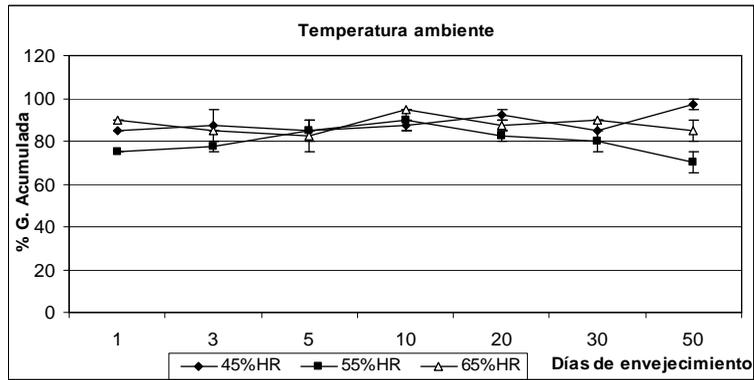
En dichas humedades relativas el porcentaje de germinación a temperatura ambiente estuvo por arriba del 90% por lo que la viabilidad no se vio afectada en ningún momento. Mientras que, a 45°C los tratamientos con 55% y 45% de humedad relativa tuvieron un porcentaje de germinación del 77% y 92% respectivamente. En contraste, a 65% HR se obtuvo el porcentaje de germinación más bajo.

Aunque estadísticamente la prueba de ANOVA no mostró diferencias significativas en los tratamientos de envejecimiento acelerado a 45°C y temperatura ambiente en ninguna de las humedades relativas, de acuerdo a la prueba de LSD con 95% de confianza sí se encontró diferencia significativa a 45°C/65% HR a los 50 días de envejecimiento acelerado (apéndice B, sección I). En cuanto al tratamiento a temperatura ambiente, la prueba de LSD mostró diferencias significativas en las tres humedades probadas principalmente a los 50 días (apéndice B, sección I).

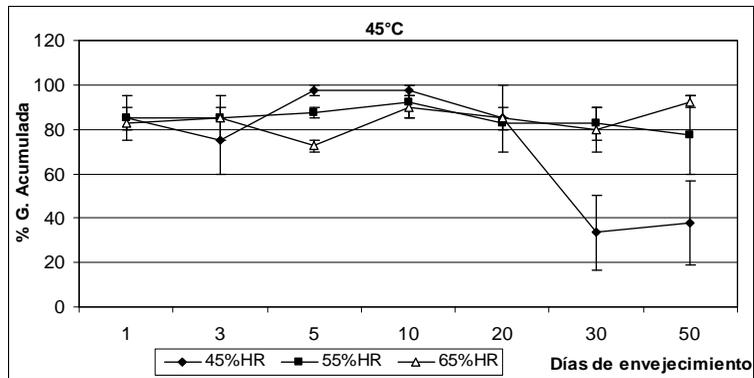
Por otro lado, se observó una disminución en el tratamiento a 55°C/60% HR de 100% a 35% de germinación después de 50 días de tratamiento (fig. 4). Estadísticamente la prueba de ANOVA mostró diferencias significativa de $F_{(6,7)} = 5.81$ con $P = 0.0179$. La prueba de LSD mostró diferencias significativas en los días 1, 3 y 50 (Apéndice B, sección I).

En los tratamientos de 55°C/45% HR y 55°C/55% HR el porcentaje de germinación obtenido fue de 100% y 77% respectivamente (datos no mostrados). Por otro lado, el tratamiento con las condiciones más drásticas para las semillas fue a 65% de humedad relativa y 55°C ya que su germinabilidad (35%) disminuyó rápidamente en los primeros 10 días. En base a estos resultados se eligió la condición de 55°C/60% HR siendo está la más adecuada para generar el gradiente de longevidad.

A)



B)



C)

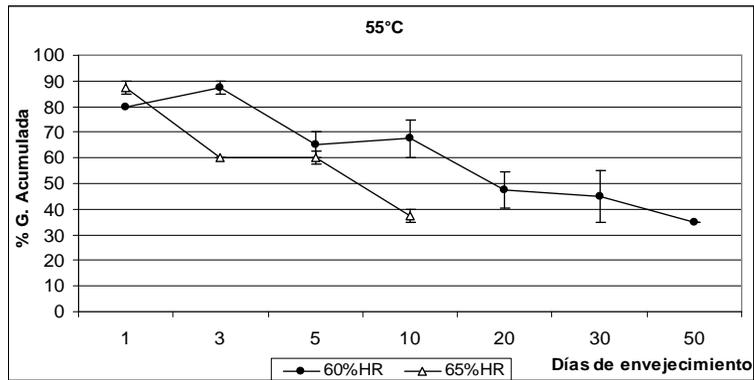


Figura 4. Porcentaje de germinación acumulada de semillas de *Polaskia chichipe* sometidas a diferentes temperaturas y humedades relativas: A) Temperatura ambiente a 45%,55% y 65% HR. B) 45°C a 45%,55% y 65% HR. C) 55°C a 60% y 65% HR.

Envejecimiento Acelerado

El tratamiento de envejecimiento acelerado empleado (55°C/60% HR) tuvo efecto estadísticamente significativo ($F_{(6,28)} = 12.89$, $P = 0.0000$) sobre la germinación de las semillas de *Polaskia chichipe* reduciéndose de 100% a 14% después de 50 días de tratamiento como se aprecia en la figura 5. La tasa máxima de germinación (TMG) presentó diferencias significativas $F_{(6,28)} = 7.16$; $P = 0.0001$. Sin embargo, estas diferencias sólo se observan en los primeros días ya que como se puede apreciar (Fig. 6-A) a partir del 3er día se manifiesta una drástica disminución en la germinabilidad de las semillas teniendo un comportamiento fluctuante hasta el día 50. Por otro lado, el grupo control se mantuvo constante con TMG de 94.

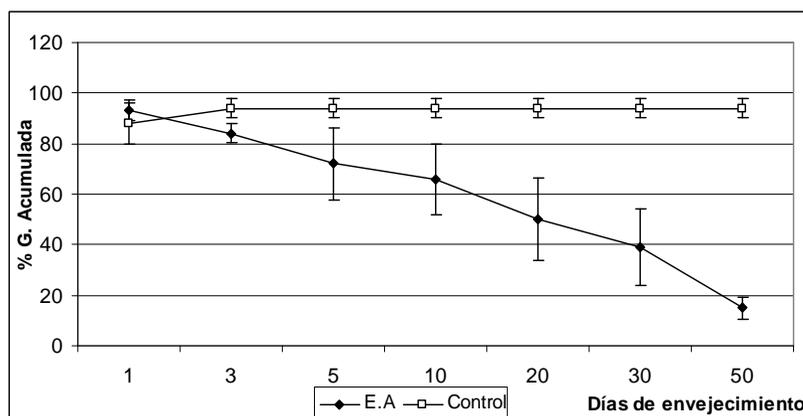
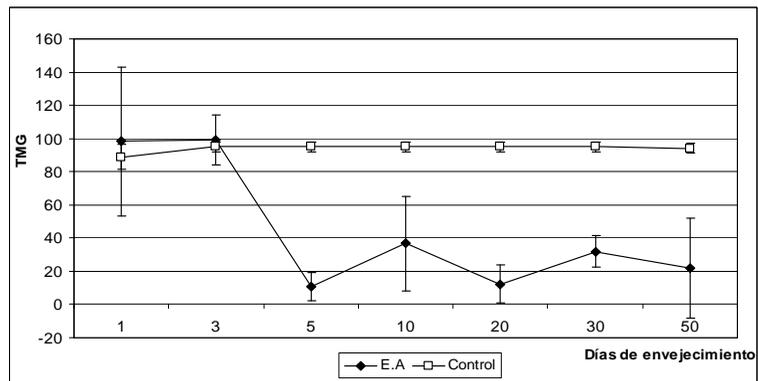


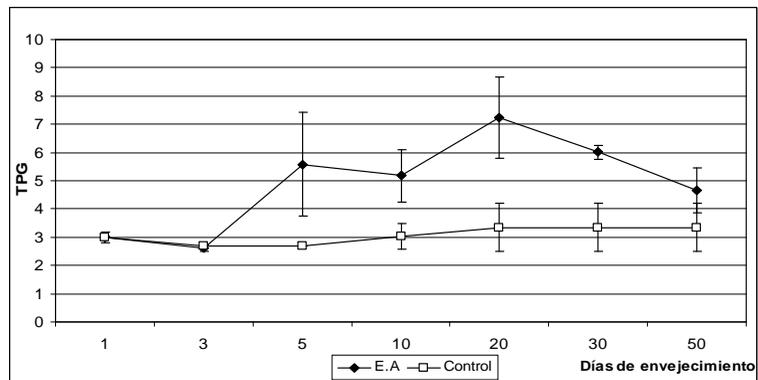
Figura 5. Porcentaje de germinación acumulada de semillas de *Polaskia chichipe* a 55°C/60% HR.

Por otro lado, el tiempo promedio de germinación (TPG) de las semillas no envejecidas de esta especie fue de 3 a 3.5 días durante todo el experimento (Fig.6-B). En contraste, después de aplicar el tratamiento de envejecimiento acelerado a 55°C/60% HR el TPG aumento significativamente ($F_{(6,28)} = 5.07$, $P = 0.001$) a 5 días a partir del 3er día, y llego hasta 7 días al 20^{vo} día del experimento; estos resultados muestran que a partir del 3^{er} día la germinabilidad de las semillas de esta especie se ve afectada siendo evidente en la reducción del porcentaje de germinación y la TMG, así como también en el aumento del TPG. En cuanto a la sincronía u homogeneidad con la que germinaron las semillas la prueba de ANOVA fue significativa $F_{(6,28)} = 2.91$, $P = 0.02$, y de acuerdo a la LSD fue más evidente en el 5^{to}, 30^{vo} y 50^{vo} día de tratamiento.

A)



B)



C)

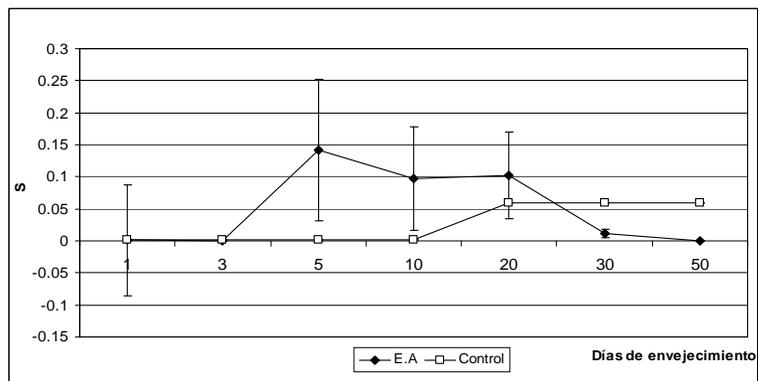


Figura 6. A) Tasa máxima germinativa (TMG) de semillas de *Polaskia chichipe* sometidas a envejecimiento acelerado durante 50 días. B) Tiempo promedio de germinación (TPG) de semillas de *Polaskia chichipe* sometidas a envejecimiento acelerado durante 50 días. C) Sincronía de germinación (S) de semillas de *Polaskia chichipe* sometidas a envejecimiento acelerado durante 50 días.

NIRS y Quimiométrico

Para el análisis de NIRS se utilizaron las semillas que se encontraban en el tratamiento de envejecimiento acelerado, mismas que después de la lectura en el Infrarrojo se pusieron a germinar. Con todos los datos de germinación, ácidos grasos y espectro de infrarrojo cercano obtenidos se procedió a alimentar el programa QUANT para llevar a cabo el análisis quimiométrico del cuál se obtuvo un modelo de predicción para estas semillas.

El análisis quimiométrico realizado por el programa QUANT+ con los espectros de infrarrojo cercano y los datos de germinación generó valores de calibración superiores al 98% de varianza. Mientras que, en los ácidos grasos generaron valores de calibración entre 89% y 98% (cuadro 1).

Debido a que los valores aceptados de calibración de los modelos quimiométricos son del 80% y siendo que los resultados obtenidos mostraron valores por arriba del 85% los resultados son satisfactorios para el modelo.

	% de varianza	Error estándar estimado	Error estándar de predicción
Á. linoleico	92	2.37	2.93
Á. oleico	89	3.93	3.97
Á. estearico	93	1.81	1.86
Á. araquidonico	98	0.032	0.036
Germinación	96	16.1	15.85

Cuadro 1. Porcentaje de varianza, error estimado y error de predicción obtenidos mediante el análisis quimiométrico Quant+ para los ácidos grasos saturados e insaturados y el porcentaje de germinación acumulado en semillas envejecidas de *Polaskia chichipe* (55°C/60% HR).

Germinación real vs. Germinación estimada mediante NIRS

La estimación de la germinación, generada por el análisis quimiométrico QUANT+ con los espectros de infrarrojo cercano, resultó altamente significativa de acuerdo a los datos experimentales con una correlación de $r = 0.98$ durante el tratamiento de envejecimiento acelerado. (Fig.7).

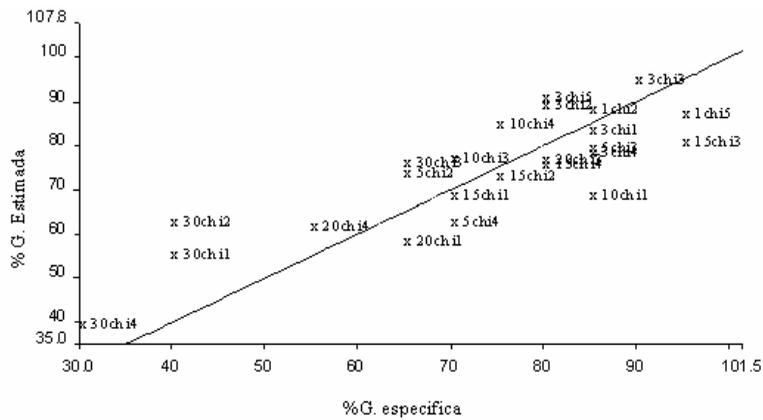


Figura 7. Porcentaje de germinación real contra porcentaje de germinación estimada mediante el modelo quimiométrico en semillas de *Polaskia chichipe* posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado 55°C/60% HR.

Contenido real de ácidos grasos saturados e insaturados vs. contenido de ácidos grasos estimados mediante NIRS.

La estimación del contenido de ácido linoleico (Fig.8) generada por el modelo quimiométrico QUANT+ muestra la tendencia a disminuir al igual que paso en la germinación teniendo una r de 0.9613. La estimación del contenido del ácido oleico (Fig.9) generada mediante el modelo también muestra una tendencia a linearizar los datos con una r igual a 0.96.

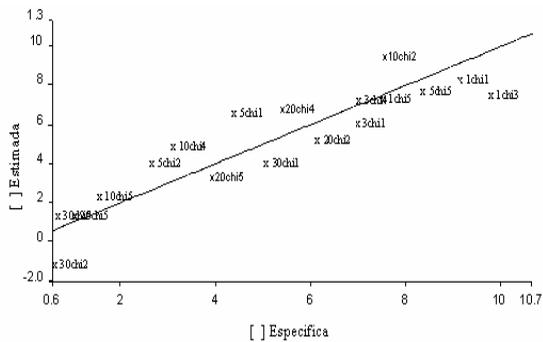


Figura 8. Contenido de ácido linoleico real contra el estimado mediante el modelo quimiométrico QUANT+.

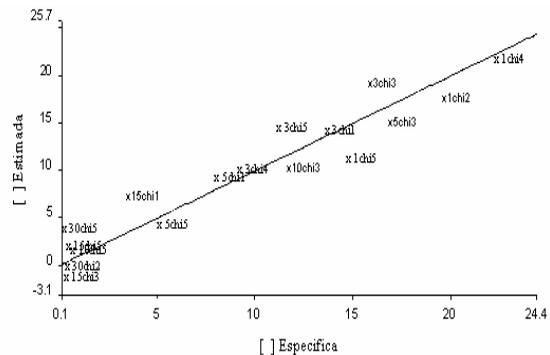


Figura 9. Contenido de ácido oleico real contra el estimado mediante el modelo quimiométrico QUANT+.

De igual forma se muestra la estimación del ácido estearico y araquidonico con una correlación altamente significativa igual a $r = 0.94$ y $r = 0.99$ respectivamente.

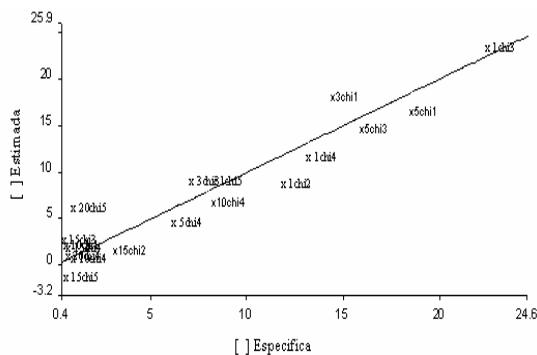


Figura 10. Contenido de ácido estearico real contra el estimado mediante el modelo quimiométrico QUANT+.

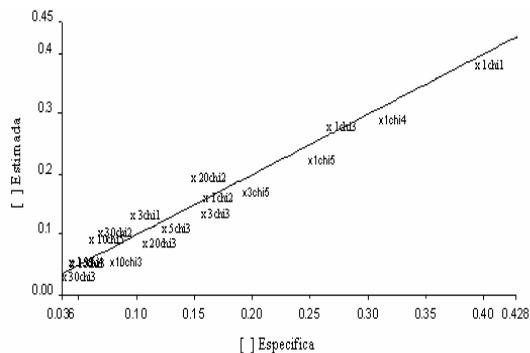


Figura 11. Contenido de ácido araquidónico real contra el estimado mediante el modelo quimiométrico QUANT+.

Viabilidad y Niveles de Ácidos Grasos

Los resultados del tratamiento de envejecimiento acelerado mostraron una pérdida gradual de la capacidad germinativa de las semillas, la cuál empieza a partir del 3^{er} día cuando su porcentaje de germinación decae a 66.7% hasta disminuir a un 14% a los 50 días. Como se puede observar (Fig.12) la disminución en la germinabilidad de estas semillas esta acompañado por la disminución en los niveles de los ácidos grasos insaturados los cuales también comienzan a disminuir a partir del 3^{er} día.

El ácido linoleico disminuyó de 18.37 $\mu\text{g/g}$ (Control) a 0.83 $\mu\text{g/g}$ (17.4 $\mu\text{g/g}$ menos); el ácido oleico disminuyó de 14.09 $\mu\text{g/g}$ (Control) a 1.43 $\mu\text{g/g}$ (12.66 $\mu\text{g/g}$ menos); el ácido estearico disminuyó de 8.50 $\mu\text{g/g}$ (Control) a 0.22 $\mu\text{g/g}$ (8.2 $\mu\text{g/g}$ menos), y el ácido araquidónico disminuyó de 0.56 $\mu\text{g/g}$ (Control) a 0.06 $\mu\text{g/g}$ (0.5 $\mu\text{g/g}$ menos), en un período de 30 días para todos los casos. Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre los primeros y los últimos tiempos de envejecimiento de acuerdo a la prueba de LSD (apéndice D, sección I).

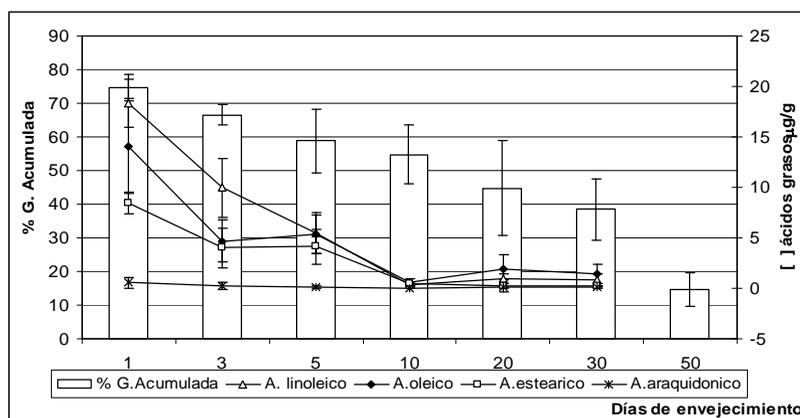


Figura 12. Porcentaje de germinación acumulada y la concentración de ácidos grasos en semillas de *Polaskia chichipe* sometidas a envejecimiento acelerado (55°C/60% HR) durante 50 días.

Actividad Enzimática

Para determinar la capacidad de los sistemas detoxificadores de H₂O₂ producidos en las semillas durante el tratamiento de envejecimiento acelerado se cuantificó la actividad de peroxidasa (POX) y catalasa (CAT).

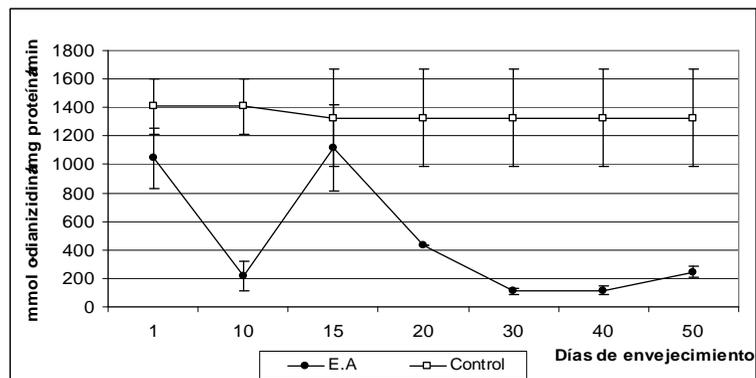
La actividad enzimática de POX de las semillas del grupo control (estado seco a temperatura ambiente) no difiere significativamente a lo largo del ensayo ($F_{(6,28)} = 0.32$, $P = 0.0090$). Sin embargo, como se muestra en la figura 13-A la actividad de la peroxidasa a temperatura ambiente (1328 mmol de o-dianizidina/mg proteína/min) fue superior a la actividad que presentaron las semillas sometidas al tratamiento de envejecimiento acelerado desde el primer día de envejecimiento, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(1,68)} = 6.20$, $P = 0.01$).

En las semillas sometidas a 55°C/60% HR la actividad de POX tuvo un valor de 1044 mmol de o-dianizidina/mg proteína/min en el primer día y disminuyó a 243 mmol de o-dianizidina/mg proteína/min al 50^{vo} día de envejecimiento.

Es importante señalar que del 1^{ro} al 10^{mo} día la actividad de peroxidasa disminuyó drásticamente (210 mmol de o-dianizidina/mg proteína/min) coincidiendo con el nivel más bajo en la concentración de los niveles de ácidos grasos. A partir de estos resultados, se infiere que probablemente en el momento que se vió más afectado el sistema de defensa antioxidante fue cuando se observó una peroxidación lipídica más intensa.

Como se observa en la figura 13, en el 15^{vo} día la actividad de POX aumento a valores superiores (1120 mmol de o-dianizidina/mg proteína/min) a los encontrados al inicio del tratamiento de envejecimiento acelerado lo cuál sugiere que probablemente existió síntesis de la enzima en las semillas. Estadísticamente el ANOVA señaló que existen diferencias significativas $F_{(5,23)} = 5.27$, $P = 0.002$, mientras que, la prueba de LSD indicó que las diferencias se concentraron en el 1^{er}, 10^{mo}, 15^{vo} y 50^{vo} día (apéndice E, sección I).

A)



B)

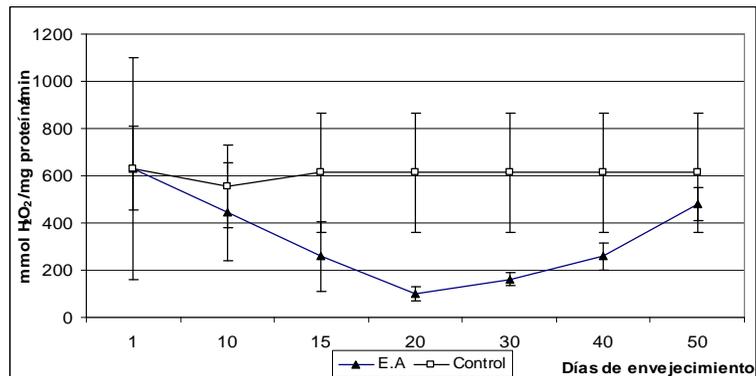


Figura13. A) Actividad de peroxidasa (POX) expresada en mmol de o-dianizidina /mg proteína/min en semillas de *Polaskia chichipe* sometidas a envejecimiento acelerado (55°C/60% HR) durante 50 días. B) Actividad de catalasa (CAT) expresada en mmol H₂O₂/mg proteína/min en semillas de *Polaskia chichipe* sometidas a envejecimiento acelerado (55°C/60% HR) durante 50 días.

En cuanto a la actividad enzimática de CAT en el grupo control no se encontraron diferencias significativas ($F_{(6,28)} = 0.07$, $P = 0.099$) a lo largo del ensayo. Sin embargo, como se muestra en la figura 13-B la actividad de catalasa de las semillas sometidas al tratamiento de envejecimiento acelerado mostró diferencias significativas desde el día 15 hasta el día 40.

Por otro lado, la actividad de catalasa presentó una disminución constante del día 1 al día 20, posteriormente comenzó una etapa de síntesis de la enzima hasta el día 50 alcanzando un nivel de actividad comparable con el que se observó a los 10 días de tratamiento.

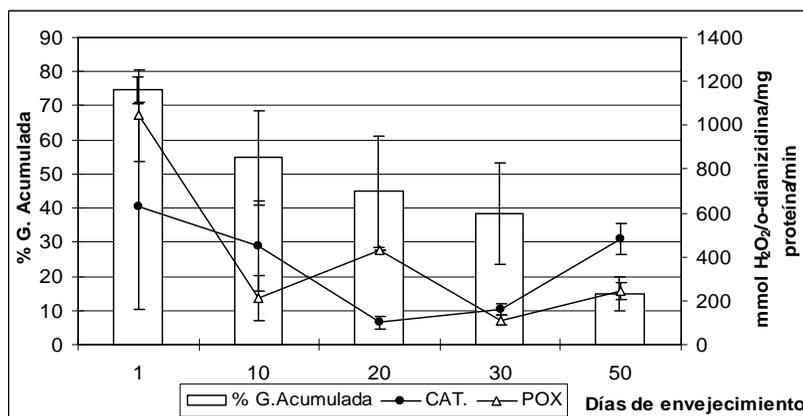


Figura 14. Porcentaje de germinación acumulada y actividad de catalasa y peroxidasa en semillas de *Polaskia chichipe* sometidas a envejecimiento acelerado (55°C/60% HR) durante 50 días.

Coefficiente de correlación

De acuerdo a Pearson ($r = 0.516$, con 0.01 grados de libertad) se encontraron coeficientes de correlación positivos entre la pérdida de viabilidad en las semillas y la disminución en la concentración de los ácidos grasos a excepción del ácido araquidónico, posiblemente por que la disminución que tuvo no fue tan evidente a lo largo del tiempo. Por otro lado, se encontró correlación positiva con la actividad de POX, sin embargo, no se encontró correlación con la actividad de CAT y la pérdida de viabilidad (Cuadro 2).

	ácido oleico	ácido linoleico	ácido estearico	ácido araquidónico	POX	CAT	% de G
Á. oleico	1						
Á. estearico	0.921	1					
Á. linoleico	0.969	0.953	1				
Á. araquidónico	0.561	0.414	0.540	1			
POX	0.700	0.704	0.694	0.471	1		
CAT	0.411	0.167	0.290	0.773	0.343	1	
% de G. A	0.6871	0.638	0.660	0.448	0.59	0.366	1

Cuadro 2. Coeficiente de correlación de acuerdo a Pearson, de los ácidos grasos, actividad enzimática y porcentaje de germinación acumulada en semillas de *Polaskia chichipe*.

POLASKIA CHENDE

Hidratación de semillas

Las semillas de *Polaskia chende* no necesitaron condiciones específicas para la entrada de agua, ya que no se requirió ningún tipo de escarificación. Para determinar el tiempo de hidratación más adecuado para las semillas de esta especie se llevaron a cabo tratamientos de imbibición de 12, 24, 48 y 72 hrs., obteniéndose que, el mejor tiempo de imbibición fue a las 48hrs en el cuál se presentó el 100% de germinación así como la ruptura de la testa (imagen B) a comparación con los tratamientos a 12, 24 y 72 hrs. que sólo obtuvieron 90%, 94% y 96% respectivamente.

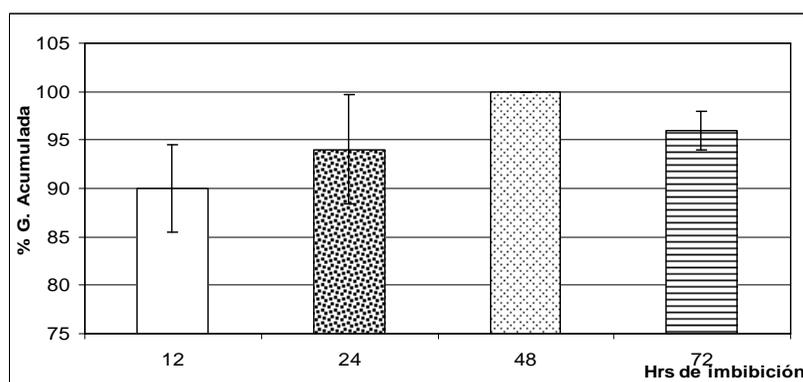


Figura15. Porcentaje de imbibición de las semillas de *Polaskia chende* durante 12, 24, 48 y 72 horas.



Imagen B: Ruptura de testa en semilla de *Polaskia chende* imbibida durante 48 hrs.

Tratamientos previos

Las semillas de *Polaskia chende* fueron sometidas a condiciones de luz blanca (LB), luz blanca con ácido giberélico (LB-AG₃), oscuridad (OBS), oscuridad con ácido giberélico (OBS-AG₃), rojo lejano (RL) y germinación en frío (FRIO). El análisis de ANOVA indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(5,18)} = 32.51$, $P = 0.0000$) en el porcentaje de germinación acumulado. La respuesta de germinación en LB tuvo un máximo de 83% mientras que, en LB con giberelinas se obtuvo un 98%, de acuerdo a la prueba de LSD existieron diferencias significativas entre estos tratamientos (apéndice A, sección II). El tratamiento en oscuridad con giberelinas presentó un máximo de germinación de 89%, mientras que, en oscuridad no se presentó germinación a lo largo del tratamiento por lo que se encontraron diferencias significativas entre ambos (apéndice A, sección II).

Las semillas de *Polaskia chende* se mostraron indiferentes a la condición de luz rojo-lejano ya que alcanzaron el 66 % de germinación al 4^{to} día de tratamiento y un máximo de 75% a los 45 días. Además, de acuerdo a la LSD no presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Por otro lado, en la mayoría de los tratamientos las semillas germinaron a los tres días a excepción del tratamiento a 10° C en el cuál germinaron hasta los dieciocho días. De acuerdo a los datos obtenidos en este ensayo se infiere la existencia de latencia fisiológica no profunda en las semillas de esta especie, ya que las giberelinas aumentaron el porcentaje de germinación acumulado tanto en luz como en oscuridad (15% y 89% respectivamente).

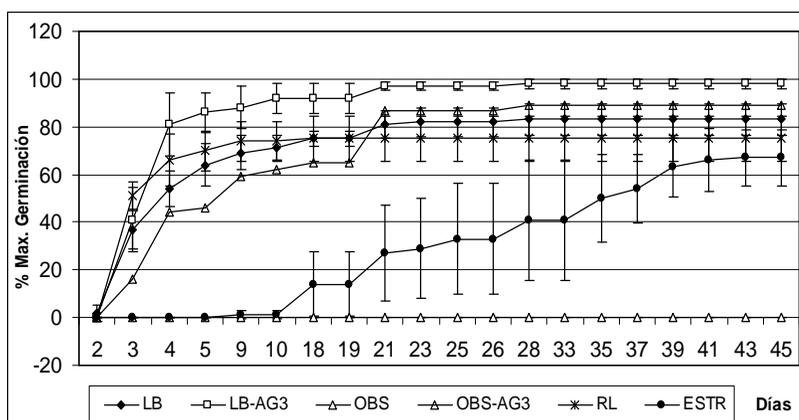


Figura 16. Porcentaje de germinación de semillas de *Polaskia chende* a diferentes tratamientos de luz y oscuridad durante 45 días (n=4)

Gradiente de Envejecimiento acelerado

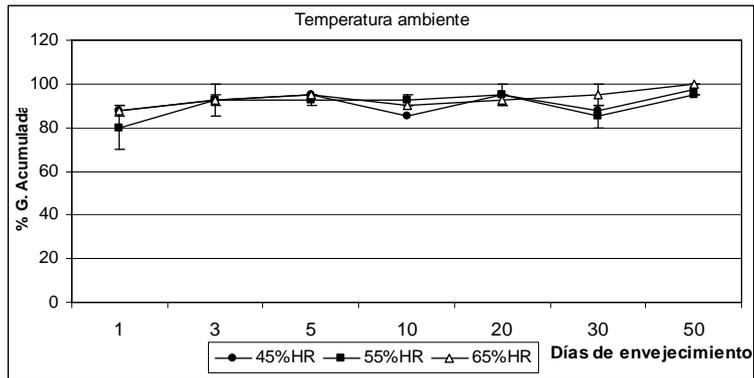
Con el propósito de generar un gradiente de longevidad se probaron las siguientes condiciones de temperatura: 45°C, 55°C y temperatura ambiente, y humedad relativa: 45%,55% y 65% HR.

En dichas humedades relativas el porcentaje de germinación a temperatura ambiente estuvo por arriba del 95% en todos los casos por lo que la viabilidad no se vio afectada en ningún momento. Mientras que, a 45°C y 45% y 55% de humedad relativa el porcentaje de germinación estuvo arriba del 95% y 97% respectivamente. Por su parte, en el tratamiento a 65% HR el porcentaje de germinación disminuyó a (45%) (Fig.17).

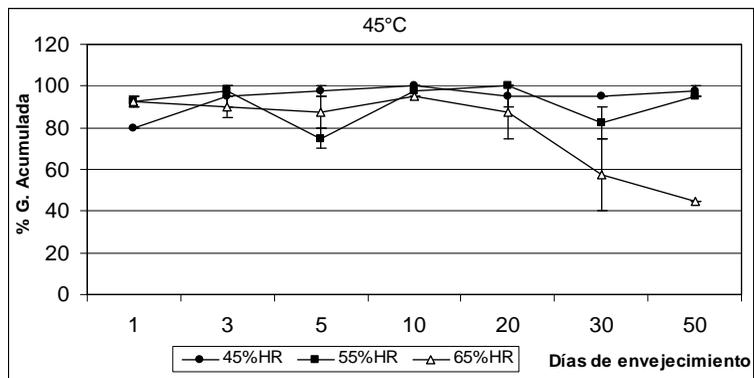
Aunque estadísticamente la prueba de ANOVA no mostró diferencias significativas a 45°C/45% HR ($F_{(6,7)}= 1.88$, $P= 0.2133$) y 45°C/65% HR ($F_{(6,7)}= 3.31$, $P= 0.0713$) a lo largo del tiempo, de acuerdo a la prueba de LSD con 95% de confianza se encontraron diferencias significativas a 45°C /45% HR a los 10 días; mientras que, a 45°C /65% HR y 45°C/55% HR estas diferencias se encontraron principalmente entre los primeros y últimos días (apéndice B, sección II). La prueba de LSD realizada para el tratamiento a temperatura ambiente también mostró diferencias significativas a 45%,55% y 65% HR principalmente a los 50 días (apéndice B, sección II).

Por otro lado, en el tratamiento a 55° C solamente se logró evaluar la pérdida de viabilidad hasta el 10^{mo} día de envejecimiento, encontrándose un 97, 95 y 0 % de germinación a los 45, 55 y 65% HR respectivamente (datos no mostrados). En base a los resultados obtenidos y en vista de que no se obtuvo el gradiente de envejecimiento se optó por elegir la condición de 55°C-55% HR, la cuál generó la pérdida de la viabilidad en semillas de la cosecha del año anterior (Fig. 17-C).

A)



B)



C)

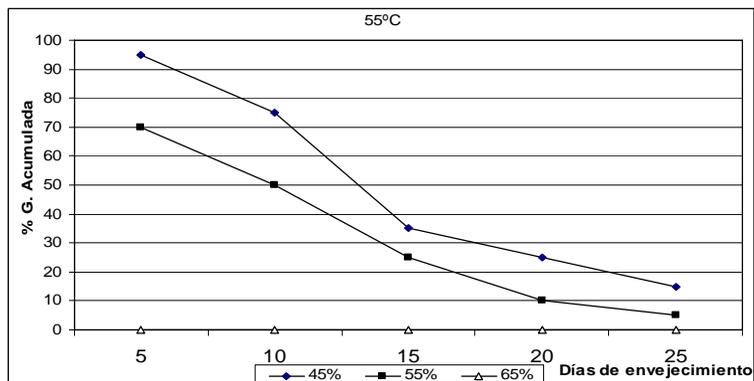


Figura 17. Porcentaje de germinación acumulada de semillas de *Polaskia chende* a diferentes temperaturas y humedades relativas. A) Temperatura ambiente a 45%,55% y 65% HR B) 45°C a 45%,55% y 65% HR C) 55°C a 45%,55% y 65% HR de la cosecha 2006.

Envejecimiento Acelerado

El tratamiento de envejecimiento acelerado empleado (55°C/55% HR) no tuvo efecto sobre la viabilidad de las semillas de *Polaskia chende* ya que la germinación se mantuvo entre 98 y 77% durante un período de 100 días de tratamiento (Fig 18).

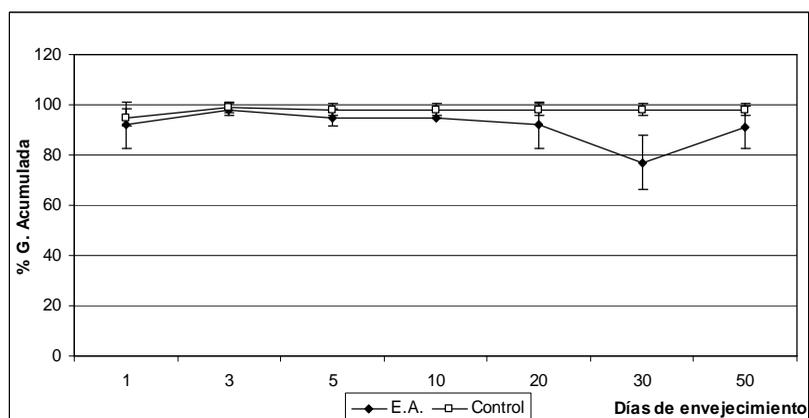
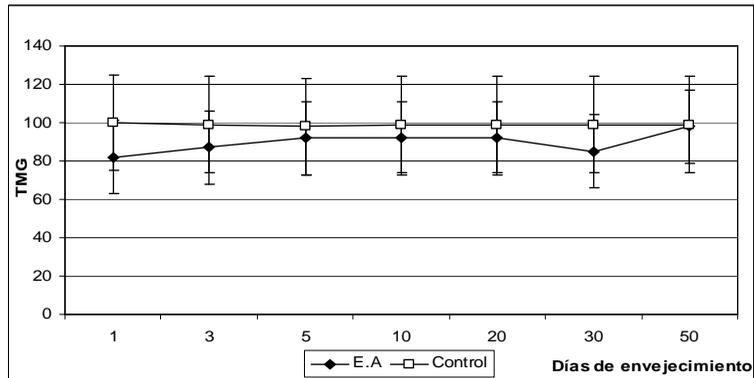


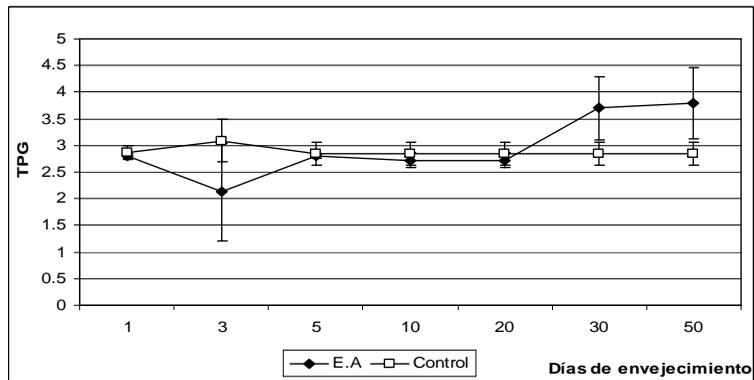
Figura18. Porcentaje de germinación acumulada de semillas de *Polaskia chende* a 55°C/55% HR

Aunque la disminución en el porcentaje de germinación fue poco, estadísticamente fue significativo de acuerdo al ANOVA ($F_{(6,28)} = 3.95$, $P = 0.0055$). La prueba de LSD mostró diferencias principalmente entre el 1^{er}, 30^{vo} y 50^{vo} día (apéndice C, sección II). El comportamiento de la TMG se mantuvo por arriba del 85% y del TPG fue aleatorio manteniéndose de 3 a 3.7 días (Fig. 19 A y B). En cuanto a la sincronía de la germinación se encontró diferencia significativa ($F_{(6,28)} = 3.70$, $P = 0.0078$) entre los tratamientos, y de acuerdo a la prueba de LSD fue más evidente en el 3^{er}, 30^{vo} y 50^{vo} días (apéndice C, sección II).

A)



B)



C)

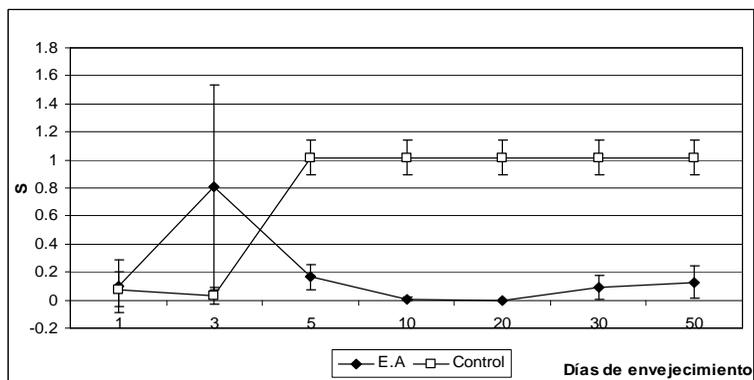


Figura 19. A) Tasa máxima germinativa (TMG) de semillas de *Polaskia chende* sometidas a envejecimiento acelerado (55°C/55% HR) durante 50 días B) Tiempo promedio de germinación (TPG) de semillas de *Polaskia chende* sometidas a envejecimiento acelerado (55°C/55% HR) durante 50 días C) Sincronía de germinación (S) de semillas de *Polaskia chende* sometidas a envejecimiento acelerado (55°C/55% HR) durante 50 días.

NIRS y Quimiométrico

El análisis quimiométrico realizado por el programa QUANT+ con los espectros de infrarrojo cercano y los datos de germinación generó valores de calibración de 22.61% de varianza. Mientras que en los ácidos grasos saturados e insaturados se generaron valores de calibración de 40% para el ácido linoleico, seguido del ácido oleico con 37%, estearico con 24% y finalmente el ácido araquidónico con un 23% de varianza (Cuadro 3). Debido a que los valores aceptados de calibración para los modelos quimiométricos son del 80% y siendo que los resultados obtenidos mostraron valores inferiores al 40% los resultados no son satisfactorios para el modelo.

	% de varianza	Error estándar estimado	Error estándar de predicción
Á. linoleico	40.01	6.91	7.49
Á. oleico	37.07	7.58	11.16
Á. estearico	24.01	9.8	10.73
Á. araquidonico	23.48	0.73	0.087
Germinación	22.61	5.97	6.23

Cuadro 3. Porcentaje de varianza, error estimado y error de predicción obtenidos mediante el análisis quimiométrico Quant+ para los ácidos grasos saturados e insaturados y el porcentaje de germinación acumulado en semillas de *Polaskia chende* sometidas a 55°C/55% HR.

Estimación mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS)

La estimación de la germinación y la concentración de ácidos grasos insaturados generada por el análisis quimiométrico QUANT+ con los espectros de infrarrojo cercano (NIRS) resultó baja, esto se atribuye principalmente a que las semillas de esta especie no envejecieron. En el caso de la germinación se obtuvo una correlación de $r = 0.47$. Mientras que, la correlación obtenida para los ácidos grasos saturados e insaturados fue de 0.63 para el ácido linoleico; 0.60 para el ácido esteárico; 0.49 para el ácido oleico y 0.48 para el ácido araquidónico (cuadro 4). A pesar de que los porcentajes de varianza y las correlaciones son bajos estos resultados comprueban la validez del modelo en la predicción de la germinación y el contenido de ácidos grasos.

	Correlación (r)
A. linoleico	0.63
Á. oleico	0.49
Á. estearico	0.60
A. araquidonico	0.48
Germinación	0.47

Cuadro 4. Correlación obtenida mediante el análisis quimiométrico QUANT+ para los ácidos grasos y el porcentaje de germinación acumulada en semillas de *Polaskia chende*

Viabilidad y Niveles de Ácidos Grasos

En la Figura 20 se muestra la disminución de la concentración de ácidos grasos insaturados en los días 5,10 y 20, Sin embargo, en el 30^{vo} día estos vuelven a tener la misma proporción que al principio. Solamente el ácido araquidónico presentó una disminución durante todo el tratamiento de envejecimiento acelerado. Así mismo, el análisis de ANOVA realizado para los niveles de los ácidos grasos registró una diferencia significativa en el ácido oleico y linoleico, mientras que en el ácido estearico y araquidonico no se mostraron diferencias significativas en todos los casos (apéndice D, sección II).

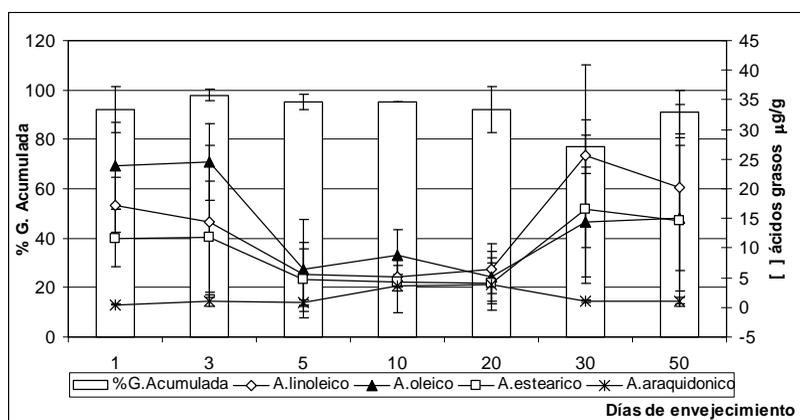


Figura 20 Porcentaje de germinación acumulada y la concentración de ácidos grasos saturados e insaturados en semillas de *Polaskia chende* sometidas a 55°C/55% HR.

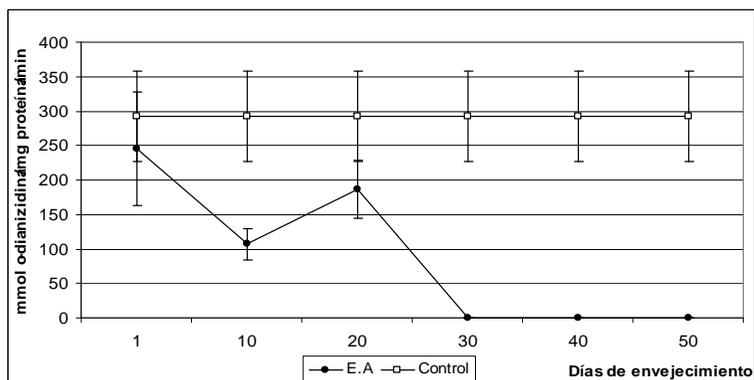
Actividad Enzimática

La actividad enzimática de las semillas del grupo control (estado seco a temperatura ambiente) no difiere significativamente a lo largo del ensayo ($F_{(5,24)}=0.023$, $P= 0.0000$). Sin embargo, como se muestra en la figura 21-A la actividad de la peroxidasa a temperatura ambiente (292 mmol de o-dianizidina/mg proteína/min) fue superior a la actividad que presentaron las semillas sometidas al tratamiento de envejecimiento acelerado desde el primer día de envejecimiento, por lo que si existen diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(5,24)}= 76.58$, $P= 0.0000$).

Ahora bien, en las semillas sometidas a 55°C/55% HR la actividad de la peroxidasa muestra un valor de 245 mmol de o-dianizidina/mg proteína/min en el primer día y disminuye a 0 mmol de o-dianizidina/mg proteína/min en el 30^{vo} día, manteniéndose en así durante el resto del tratamiento.

Es importante señalar que en el 10^{mo} día la actividad de peroxidasa disminuyó drásticamente (107 mmol de o-dianizidina/mg proteína/min) en comparación con el 1er día, Sin embargo, en el 20^{vo} día la actividad de peroxidasa incremento probablemente por que ocurrió síntesis de *novo* propiciando este aumento. Estadísticamente el ANOVA indicó que existen diferencias significativas ($F_{(4,20)}= 26.55$ $P= 0.0000$) mientras que, la prueba de LSD señaló que estas diferencias se presentan en el 1^{er}, 10^{mo} y 50^{vo} día (apéndice E, sección II).

A)



B)

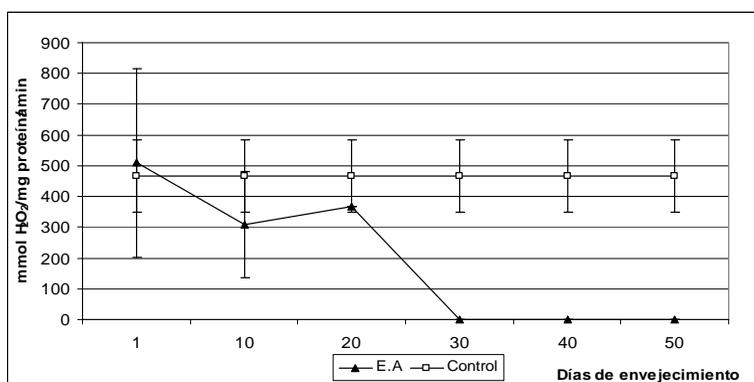


Figura 21. Actividad de peroxidasa (POX) expresada en mmol de o-dianizidina /mg proteína/min en semillas de *Polaskia chende* sometidas a envejecimiento acelerado (55°C/55% HR) durante 50 días. B) Actividad de catalasa (CAT) expresada en mmol H₂O₂/mg proteína/min en semillas de *Polaskia chende* sometidas a envejecimiento acelerado (55°C/55% HR) durante 50 días.

Por otro lado, la actividad enzimática de la catalasa en las semillas del grupo control no difiere significativamente ($F_{(4,17)}=6.50$ $P=0.0023$) a lo largo del ensayo. Como se muestra en la figura 21-B la actividad de catalasa del grupo control (466 mmol H₂O₂/mg proteína/min) fue similar a la actividad que presentaron las semillas sometidas al tratamiento de envejecimiento acelerado en el 1er día de envejecimiento. Además, se observó el mismo patrón de comportamiento que en la actividad de POX ya que la actividad de catalasa disminuyó en el 10^{mo} día, y en el 20^{vo} día se observó un aumento en su actividad incrementando a 368 mmol H₂O₂/mg proteína/min. Estadísticamente la prueba de LSD señaló que existen diferencias significativas en el 1^{er}, 10^{mo} y 50^{vo} día (apéndice C, sección II).

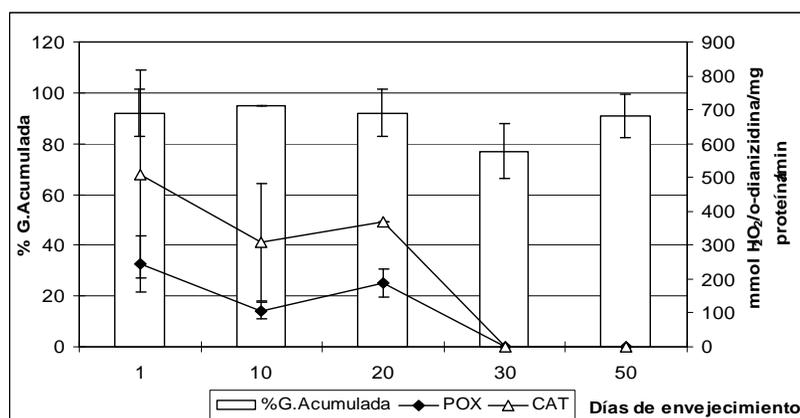


Figura 22. Porcentaje de germinación acumulada y actividad de peroxidasa y catalasa en semillas de *Polaskia chende* sometidas a 55°C/55% HR durante 50 días.

Coefficiente de correlación

De acuerdo a Pearson ($r = 0.46$, con 0.01 grados de libertad) no se encontraron coeficientes de correlación entre la viabilidad en las semillas y la concentración de los ácidos grasos, posiblemente porque no se tuvo una pérdida de la viabilidad. Por otro lado, se encontró correlación positiva con la actividad POX y CAT de 0.55 y 0.47 respectivamente, en relación con la viabilidad de las semillas (Cuadro 5).

	Ácido oleico	Ácido linoleico	Ácido estearico	Ácido araquidónico	POX	CAT	% de G. A.
Á. oleico	1						
Á. linoleico	0.76	1					
Á. estearico	0.80	0.92	1				
Á. araquidónico	-0.18	-0.27	-0.20	1			
POX	0.15	-0.32	-0.26	0.04	1		
CAT	0.28	-0.20	-0.18	0.02	0.82	1	
% de G. A.	-0.04	-0.32	-0.28	0.03	0.55	0.47	1

Cuadro 5. Coeficiente de correlación de acuerdo a Pearson, de los ácidos grasos, actividad enzimática y porcentaje de germinación acumulado en semillas de *Polaskia chende*.

DISCUSIÓN

El número de semillas por fruto producidas en *Polaskia chende* varió de 276 a 893 con un promedio de 509.8 semillas, mientras que, en *Polaskia chichipe* el número de semillas varió de 202 a 505 con un promedio de 345.1, estadísticamente no se encontraron diferencias significativa entre ambas. Rojas-Aréchiga y colaboradores (2001) mencionan que el número de semillas entre las especies puede variar grandemente. Del castillo (1988, citado por Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001) reportó que algunos frutos de *Ferocactus histix* contenían hasta 2200 semillas, mientras que, otros frutos solo tenían 300. Otero y Meyrán (1966, citado por Rojas-Arechiga *et al.*, 2001) reportaron que *Echinocereus pulchellus* tuvieron de 40 a 100 semillas por fruto. Serna, (2007) reportó que el número de semillas producidas por fruto en *Mammillaria densispina* varió de 72 hasta 152 semillas.

Debido a que el agua es el factor limitante en zonas áridas y semiáridas, está juega un papel crucial en la germinación y la sobrevivencia de las semillas.

El tiempo de imbibición que requieren las semillas de cactáceas varía entre unas horas como en *Pachycereus pringlei* (Dubrovsky, 1996); *Lophofora difusa* (Trujillo, 2002) y *Pachycereus hollianus* (Manuell, 2006) a pocos días en otras especies (Alcorn y Kurtz, 1959; McDonough, 1964; Martinez-Holguin, 1983; Romero-Schmidt, 1992; citados por Dubrovsky, 1996; Trujillo, 2002). De acuerdo a los resultados obtenidos el tiempo de imbibición en las semillas de *Polaskia chichipe* como en las de *Polaskia chende*, fue de 48 hrs, tiempo en el cuál, se presentó el máximo porcentaje de germinación acumulada con una pronunciada ruptura de la testa (Imagen A, B).

Algunos autores señalan, que el nivel crítico de humedad requerido para la imbibición de semillas varía de acuerdo a la especie, debido al tipo de reserva que presente la semilla. Ya que la composición de reservas modifica el potencial mátrico, el cuál forma parte importante de los componentes del potencial hídrico de la semilla, y por lo tanto, tiene efecto en la capacidad de absorción de agua del ambiente, lo que determina tanto el ingreso de agua como la velocidad en que ocurre. De Paula (1994), reportó que el tamaño en las semillas de girasol determina el tiempo requerido para obtener una completa hidratación de los tejidos, ya que las semillas de tamaño pequeño absorben agua más rápido que las semillas grandes.

Los resultados de los tratamientos previos en semillas de *Polaskia chichipe* y *Polaskia chende* sugieren que las semillas de estas especies tienen requerimientos de luz para germinar, por lo que poseen un fotoblastismo positivo. Este comportamiento ha sido observado en muchas especies de cactáceas columnares (Nobel, 1988), cactáceas en forma de barril como *Echinocactus plathiacantus*, *Ferocactus robustus*, *Ferocactus flavovirens*, *Ferocactus recurvus* (Rojas-Aréchiga et al., 1997) y cactáceas globosas como *Lophofora difusa*, *Lophofora williamsi* (Trujillo, 2002); *Mammillaria haageana*; *Mammillaria carnea*; *Mammillaria mixtas* y *Mammillaria supertexta* (Benitez-Rodríguez et al., 2004). El fotoblastismo positivo encontrado en las especies estudiadas en el presente estudio no coincide con lo reportado por Rojas-Aréchiga y colaboradores (1997) quienes señalan que las semillas de cactáceas columnares muestran indiferencia a la luz, mientras que, las cactáceas con forma de barril necesitan luz para germinar. Por lo que estos autores, sugieren que los requerimientos de luz en las cactáceas podrían deberse a la forma de vida.

Por otro lado, se observó que las semillas de *Polaskia chende* presentan latencia fisiológica no profunda, debido a que, la adición de giberelinas (1000ppm) en el medio promovió la germinación en la oscuridad en un 98%, existiendo diferencias significativas entre ambos de acuerdo a la prueba de LSD (apéndice A, sección I). También se encontraron diferencias significativas en los tratamientos de luz blanca y luz blanca con giberelinas con un aumento de 15% en su germinabilidad. Este mismo comportamiento ha sido observado en semillas de *Lophofora diffusa* a 15°C y 20°C (Trujillo, 2002). También se ha reportado que especies como *Carnegiea gigantea* y *Stenocereus thurberi* (Rojas-Aréchiga et al., 2000) incrementaron significativamente su germinación en luz y oscuridad a 500 ppm y 1000 ppm de giberelinas.

De igual manera las semillas de *Polaskia chichipe* presentaron un porcentaje de germinación de 87 al adicionarse giberelinas (1000ppm) en oscuridad, por lo que no existieron diferencias significativas con el grupo control (apéndice A, sección I).

Por otro lado, las semillas de esta especie no presentaron diferencias significativas respecto al control al agregarles giberelinas en luz blanca, Sin embargo, se registró un leve aumento de 4% en su germinabilidad, estos datos concuerdan con Rojas-Aréchiga y colaboradores, (2001) quienes señalan que algunas cactáceas fotoblásticas positivas como *Stenocereus stellatus* no modifican su comportamiento germinativo en presencia de las giberelinas en condiciones de luz blanca.

En síntesis, debido a que la adición de giberelinas sustituye los requerimientos de luz para germinar y siendo que en el presente estudio se observó un notorio incremento en la germinabilidad en *P. chende* se puede sustentar la presencia de latencia fisiológica no profunda en este lote de semillas.

Los requerimientos y la calidad de luz que reciben las semillas varían frecuentemente entre las poblaciones (Wulff, 1988 citado por Kigel, 1995). Algunos estudios han reportado el efecto promotorio de la germinación en semillas de especies perennes expuestas a luz blanca (Meyer *et al.*, 1990; Thalen, 1979; Koller *et al.*, 1964; Gutiérrez, *et al.*, 1980; Mcdonough, 1964; citados por Kigel, 1995) mientras que, otros estudios demuestran el efecto promotorio de la luz roja e inhibitorio de la luz rojo lejano en semillas de cactáceas (Van Tooren-Pons, 1988; Pons, 1992; Benitez-Rodríguez *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha reportado que algunas especies de cactáceas son capaces de germinar en luz rojo-lejano (Zimmer, 1969 citado por Rojas Arechiga *et al.*, 2000; Rojas Arechiga *et al.*, 1997). En este estudio, las semillas de *Polaskia chichipe* y *Polaskia chende* fueron sensibles a luz rojo-lejano presentando altos porcentajes de germinación (85% y 75% respectivamente). Esta capacidad de germinar en rojo-lejano indica que las semillas pueden germinar semienterradas en el suelo u hojarasca lo cuál brinda algunas ventajas en condiciones naturales como son: 1) germinar aún con un bajo flujo fotónico 2) evitar la depredación y la pérdida de humedad por transpiración 3) la latencia fisiológica no profunda junto con la capacidad de germinar en rojo lejano posiblemente evite la competencia con plantas adultas 4) favorece la formación de bancos de semillas en el suelo (Pons, 1992). Otros autores, han indicado que los requerimientos de luz pueden ser inducidos por la planta madre, debido a la luz que suele filtrarse alrededor de los tejidos que cubren a las semillas durante su desarrollo dentro del fruto, y por los microambientes en los que suelen estar expuestas las semillas cuando caen al suelo. En este último caso, las semillas que son dispersadas bajo el dosel de arbustos modifican el microambiente por debajo de su copa exponiendo a las semillas a luz enriquecida con rojo-lejano. Por lo tanto, es posible que ambas especies en estudio proliferen más en condiciones naturales bajo plantas nodrizas.

En el tratamiento a 10°C las semillas de *Polaskia chichipe* no tuvieron germinación (0%) mientras que, las semillas de *Polaskia chende* fueron capaces de germinar en frío presentando un porcentaje de germinación de 67% a los 45 días. Se sabe, que en zonas semiáridas y áridas estas temperaturas suelen presentarse en la noche y en épocas frías.

De acuerdo al criterio de germinación del 50%, y considerando que las temperaturas extremas (máximas y mínimas) para las cactáceas propuesto por Nobel (1988) son arriba de 30°C y abajo de 12°C, se asume que las semillas de *Polaskia chende* son tolerantes al frío ya que presentaron un porcentaje arriba del 50% bajo esta temperatura. Esta capacidad de tolerancia al frío permite que las semillas de esta especie tengan un periodo de germinación más prolongado a lo largo del año, en comparación a las semillas de *P. chichipe*. En contraste, Rojas-Arechiga y colaboradores (1998) encontraron que las semillas de *Cephalocereus chrysacanthus*, *Neobuxbaumia tetetzo* y *Pachycereus hollianus* no son capaces de germinar arriba del 50% a 10°C. De acuerdo a los registros de temperatura (Data logger HOBO Pendant Data) realizados en el suelo del área donde se llevó a cabo la colecta de frutos, la temperatura extrema mínima registrada se presentó en la época de invierno con temperaturas por debajo de los 7°C. Debido a que, las semillas de las especies con las que se trabajaron son silvestres, es posible que en el caso de *Polaskia chende* las semillas sean mas resistentes y puedan germinar y mantenerse viables en bajas temperaturas. Kwack y Zimmer (1978, citado por Rojas-Archéiga *et al.*, 2001) mencionan que la germinación en frío (de 5° a 10°C) que presentan las semillas de *Maihuenia poeppigii* esta relacionada con la remoción de la latencia o para la movilidad de los nutrientes del perispermo.

Los resultados obtenidos en las semillas de *Polaskia chichipe* las cuáles no germinaron en frío coinciden con lo reportado por Rojas Arechiga y colaboradores (1998) en semillas de *Equinocactus plathiacantus*, *Ferocactus flavovirens* y *Ferocactus recurvus* procedentes de Zapotitlán de las Salinas Puebla, las cuales no germinaron a 10°C. Es posible que en las semillas de *Polaskia chichipe* ocurra un estrés causado por bajas temperaturas (de no congelamiento) de acuerdo a Browse y colaboradores (2001), este tipo de comportamiento ha sido observado en especies de climas calidos en las cuales se han presentado daños en la membrana a nivel celular. Adicionalmente Rojas-Archéiga y colaboradores (1998), consideran que esta respuesta se debe, a la distribución geográfica restringida a desiertos cálidos que presentan estas cactáceas lo que las hace menos tolerantes a bajas temperaturas. Sin embargo, este estrés primario en especies tolerantes es reversible si la temperatura se eleva, también se ha asociado la acumulación o aumento en la concentración de ácidos grasos como un mecanismo para contrarrestar el estrés al frío en semillas ortodoxas.

Debido a la dificultad de estudiar el efecto del deterioro por largos periodos de tiempo se utilizó el método de envejecimiento acelerado. En este sentido el efecto de las humedades relativas a 45%,55% y 65% de HR a temperatura ambiente para ambas especies no afectaron su capacidad de germinación, ya que esta se mantuvo por arriba del 90%. Mientras que en el tratamiento a 45°C la capacidad germinativa se vio ligeramente afectada principalmente a 65% de HR, Sin embargo, no se presentó un deterioro marcado.

El tratamiento de envejecimiento acelerado manejado en este trabajo a 60% HR y 55°C afectó la viabilidad en las semillas de *Polaskia chichipe* reflejada en la reducción de la germinabilidad de un 100% a 14% de germinación acumulada después de 50 días de tratamiento (Fig.5). Además, la reducción en la viabilidad se hace más evidente en la disminución que se presentó a partir del 3^{er} día en la tasa máxima de germinación (TMG) teniendo un comportamiento fluctuante hasta el día 50. Por otro lado, el tiempo promedio de germinación (TPG) de las semillas aumentó a 5 días a partir del 3^{er} día y llego hasta 7 días al 20^{vo} día del experimento. En base a estos resultados, se infiere que a partir del 3er día la germinabilidad de las semillas de esta especie se afectó siendo evidente en la reducción del porcentaje de germinación acumulado y la TMG, así como también en el aumento del TPG. La pérdida de la viabilidad es el síntoma más evidente que se ha observado en semillas envejecidas y/o deterioradas, manifestándose con la reducción y el retraso en la germinación y la disminución en la tasa máxima de germinativa (Li *et al.*, 1996; De Paula, 1994).

En relación a otros estudios se ha reportado que esta combinación de temperatura y humedad relativa (55°C/60% HR) generó un gradiente en la viabilidad de las semillas de *Beaucarnea gracilis* disminuyendo su porcentaje de germinación acumulada de 100% a 3.33%; así como el aumento en el TPG de 5.7 días al día 0 hasta 28.15 días al 12^{vo} día de tratamiento. (Zavaleta, 2003). Es importante señalar que en el caso de *P. chichipe* este deterioro fue menos agresivo ya que la pérdida de la viabilidad se prolongó durante 50 días mientras que, para *Beaucarnea gracilis* este deterioro afectó rápidamente la viabilidad (15 días). Por su parte Sung (1996) reportó el incremento en el TMG de 3 a 6 días en semillas de soja sometidas a envejecimiento acelerado (45°C/100% HR) después de nueve días de tratamiento, adicionalmente reportó el aumento en el TMG de 3 a 5.5 días en el mismo lote de semillas pero sometidas a envejecimiento natural (12 meses). Sin embargo, los tres casos coinciden al presentar una afectación en su capacidad germinativa reflejada en el porcentaje de germinación acumulada y el aumento en el TPG. Adicionalmente, otros trabajos realizados en semillas de herbáceas

como china sultani ((Li *et al.*, 1996) y cultivos de girasol (De Paula, 1994) reportan este mismo comportamiento.

En el presente estudio al menos en el caso de *P. chichipe* concuerda con trabajos anteriores en los cuales la combinación de alta humedad y temperatura da pie a la pérdida de la viabilidad en semillas de cactáceas como *Stenocereus stellatus* (Vergara 2002), *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Lozada, 2005) y *Pachycereus hollianus* (Manuell, 2006). Este comportamiento también ha sido ampliamente descrito en semillas de algunos cultivos como soja (Priestley y Leopold, 1979; 1983); abeto (El-kassaby, 1998); china sultani ((Li *et al.*, 1996); maíz (Camacho, 1999); frijol soya (Madrid, 2001); girasol (De Paula, 1994, Kibinza *et al.*, 2006) y algodón (Goel *et al.*, 2003).

A pesar de que *Polaskia chichipe* y *Polaskia chende* son especies filogenéticamente muy cercanas, las semillas de *Polaskia chende* no redujeron su capacidad germinativa cuando fueron expuestas a 55°C/55% HR, Sin embargo, cuando se aumento a 65% HR en ambas especies las semillas de *P. chende* murieron al 3^{er} día de tratamiento, mientras que las semillas de *P. chichipe* redujeron su viabilidad drásticamente al 10^{mo} día de tratamiento. Según Bailly y colaboradores (1996), esto puede explicarse porque la resistencia o sensibilidad a altas temperaturas y humedades dependen: 1) del tipo de semillas y del contenido de reservas presentes 2) de las características ambientales (estrés principalmente por temperatura y humedad) en el cuál se desarrollaron las semillas y 3) por factores genéticos que propician respuestas diferenciales en las especies.

Por otro lado, tomando en cuenta que el deterioro en semillas se ha asociado con diversas alteraciones en los componentes celulares en los que se incluyen alteraciones enzimáticas, en el presente trabajo se determino la actividad de CAT y POX en semillas envejecidas así como la concentración de ácidos grasos.

En las semillas de *Polaskia chichipe* se observó la disminución de la actividad enzimática. La actividad de peroxidasa disminuyó de 1044 mmol de o-dianizidina mg proteína/min, mientras que, para la actividad de catalasa se registro una disminución de 631 a 480 mmol de H₂O₂ mg proteína/min a los 50 días de envejecimiento acelerado. El descenso en la actividad enzimática en POX y CAT en las semillas envejecidas de *P.chichipe* fue evidente y análogo a la disminución en la viabilidad. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Stewart y

Bewley, (1980), Sung y Chiu (1995), Bailly y colaboradores (1996) y Goel (2003) quienes consideran que cuando las semillas entran en la etapa de pérdida de la viabilidad las actividades enzimáticas disminuyen notablemente.

De igual forma, las semillas de *P.chende* presentaron una disminución en la actividad enzimática de peroxidasa de 245 a 0 mmol de o-dianizidina/mg proteína/min y en catalasa de 509 a 0 mmol de H₂O₂/mg proteína/min. Sin embargo, es importante hacer notar, que en ambos casos la actividad enzimática fue abatida rápidamente del 20^{vo} al 30^{vo} día de tratamiento. El descenso radical que se presentó en la actividad enzimática no fue análogo con la viabilidad en las semillas la cuál, como ya se había dicho, se mantuvo fluctuante pero sin mostrar deterioro a lo largo del tiempo.

En relación con otros estudios Camacho (1999), reportó la disminución de catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa en ejes embrionarios de semillas de maíz sometidas a envejecimiento acelerado (45°C y 100% HR). De igual forma De Paula (1994) reportó la disminución en la actividad enzimática de catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa en semillas envejecidas de girasol a las mismas condiciones de temperatura y humedad (45°C y 100% HR). Por su parte Lenher (2006,2008) reportó la disminución en la actividad de catalasa en semillas envejecidas de trigo (45°C/100% HR). En contraste, Puntarulo y Boveris (1990) observaron un incremento en la actividad de peroxidasa y catalasa en ejes embrionarios de soya durante el envejecimiento natural y acelerado (20°C/12% HR). Algunos autores han reportado un incremento de peroxidasa en semillas de maíz y soya, (Basavarajappa *et al.*, 1991; Gulen *et.al*, 2004 citados por Scandalios, 1997)

De acuerdo a Paula (1994), el factor que llega a limitar la actividad enzimática en las semillas es el grado de humedad que tengan las mismas. La humedad en semillas, por un lado, determina la movilidad intramolecular necesaria para la función enzimática (que suele estar limitada cuando se tiene una matriz poco fluida) y por otro lado, determina la dificultad de acceder al sustrato así como la difusión del producto desde el lugar de reacción. Este mismo autor señala que en semillas con humedades inferiores a 8% (HR), la actividad enzimática es muy escasa, Sin embargo, a niveles de humedad altos (arriba de 30% HR) se permiten reacciones de respiración mitocondrial.

De acuerdo a lo anterior, es posible suponer que el metabolismo de las semillas de ambas especies estuvo relativamente activo, ya que la humedad relativa de las semillas se mantuvo arriba de 47% HR a lo largo del experimento (datos no mostrados). Por lo tanto, se considera que la hidratación en las semillas fue suficiente para permitir movilidad a nivel intracelular, así como actividad y síntesis enzimática.

De tal manera es posible que CAT y POX estuvieran eliminando peróxido de hidrógeno durante todo el tiempo en que se llevó a cabo el tratamiento. Por lo que no se considera que la humedad presente en las semillas fuera un factor limitante para su actividad. Sin embargo, durante el tratamiento de envejecimiento acelerado también se producen ERO, ya que un contenido de humedad superior al 14% activa a las enzimas oxidativas tales como la lipoxigenasa conduciendo a la peroxidación de lípidos y su actividad se incrementa conforme aumenta el contenido de humedad. De acuerdo con Sung (1996), la remoción del peróxido de hidrógeno durante el envejecimiento es lenta propiciando su acumulación en las células. Esto puede explicar la disminución en la actividad de ambas enzimas, ya que probablemente la producción de ROS fue más elevada que la actividad del sistema antioxidante. Este mismo autor considera que a mayor tiempo de envejecimiento se genera la degradación de las proteínas y la pérdida de la actividad enzimática específicamente de catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa. Adicionalmente, Bailly y colaboradores (1996), reportan que la disminución en la actividad de catalasa puede inducirse por la acumulación de peróxido de hidrógeno.

Por otro lado, la disminución en la actividad enzimática de ambas enzimas puede explicarse por la temperatura a la cual fueron sometidas las semillas, ya que se ha establecido que la pérdida de la actividad enzimática de catalasa y glutatión reductasa puede deberse a su sensibilidad a altas temperaturas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Bailly y colaboradores (1996), quienes señalan que la actividad de CAT Y GR de semillas de girasol disminuye cuando son envejecidas a 45°C y 100 HR. Este mismo comportamiento ha sido observado en semillas de frijol (Sung, 1996).

Adicionalmente, McDonald (1999) y Bailly y colaboradores (2004), consideran que la producción de radicales libres reducen la síntesis de muchas enzimas, principalmente porque suelen atacar las estructuras de las mismas. Estos mismos autores consideran que la peroxidación lipídica propicia la pérdida de la integridad de la membrana celular, así como la degradación del ADN y una baja transcripción de RNA propiciando la reducción de la síntesis o una síntesis incompleta

de las enzimas por lo que éstas disminuyen notablemente dentro de la célula. En adición, Kibinza y colaboradores (1996) consideran que las especies reactivas de oxígeno inactivan fácilmente a las enzimas principalmente cuando los aminoácidos esenciales o los sitios activos son degradados. De Paula y colaboradores (1996) mencionan que la disminución en la actividad de catalasa y glutatión reductasa en semillas de girasol se encuentra cercanamente correlacionada con el aumento en el contenido de malondialdehído.

Es importante señalar que, aunque de manera general la tendencia de la actividad enzimática en ambas especies fue en declive, se mostró un patrón de comportamiento similar al presentar en algún momento un incremento en la actividad enzimática. En las semillas de *P. chichipe* el aumento en la actividad de peroxidasa se observó al 15^{vo} día de envejecimiento, Sin embargo, después de este día la actividad volvió a disminuir. De igual forma la actividad de catalasa disminuyó desde el 1^{ro} al 20^{vo} día, después del cuál la actividad aumentó hasta el 50^{vo} día. Cabe señalar que, los días en los cuales la actividad enzimática incrementó estadísticamente no existieron diferencias significativas igualando los valores del control.

En base a estos datos, es posible que en *P. chichipe* el aumento en la actividad enzimática de catalasa y peroxidasa al 15^{vo} y 50^{vo} día respectivamente esté relacionado con mecanismos de reparación del metabolismo de la semilla, los cuales propiciaron la síntesis de peroxidasa y catalasa generando una reactivación de las mismas. Ya que de acuerdo con Bailly y colaboradores (2004) el incremento en la actividad de catalasa, se debe al aumento en la transcripción de genes de CAT, además, consideran que este incremento se encuentra cercanamente relacionado 1) con la tolerancia a la desecación en las semillas, 2) reducción el daño oxidativo y 3) por estrés. Por otra parte, se pudo observar que en las semillas de *Polaskia chende* la actividad de catalasa y peroxidasa aumentó al mismo tiempo, posiblemente la detoxificación de estas enzimas en conjunto evitó que la viabilidad se viera afectada.

En *Polaskia chichipe* la pérdida gradual de la viabilidad y la disminución en la concentración de ácidos grasos fueron análogos, observándose que, a partir del 3^{er} día tanto la capacidad germinativa de las semillas como la concentración de ácidos grasos se ven afectados. Una posible explicación a la pérdida de los mismos puede ser atribuida a que los ácidos grasos insaturados son más susceptibles al ataque por radicales libres. Se ha reportado peroxidación lipídica en semillas de soja (Stewart y Bewley, 1980; Sung y Chiu, 1995), arroz, lechuga, maíz, cacahuate (McDonald, 1999) y girasol (De Paula, 2001; Kibinza *et al.*, 2006).

Scandalios y colaboradores (1997), consideran que la pérdida de la integridad de lípidos es debido a la peroxidación. Harman y Mattick (1979), sometieron semillas de chicharo a envejecimiento acelerado, encontrando que la disminución en la germinación fue paralela con la pronunciada disminución en el ácido linoleico y linolenico, Sin embargo, la concentración de los ácidos grasos saturados no se modifico. Ellos consideran que la disminución en la concentración de ácidos grasos insaturados dienoicos y trienoicos es consistente con su oxidación y la formación de radicales libres.

Se ha reportado la disminución en la concentración de ácidos grasos insaturados en semillas de zonas áridas sometidas a envejecimiento acelerado como *Hechtia podantha* (55°C/55% HR), la cuál redujo la concentración del ácido oleico de 29.68 µg/gr a 0.62 µg/g; y linoleico de 11.50µg/gr a 0.26µg/gr (Zavaleta, 2005). Este mismo autor reportó la presencia de ácidos grasos saturados e insaturados como el ácido esteárico, palmítico, linoleico oleico y araquídico en semillas envejecidas de *Beaucarnea gracilis* (55°C/55% HR), Sin embargo, solo reportó cambios en los cuatro primeros. En los ácidos saturados encontró un comportamiento fluctuante, mientras que en los insaturados si se observó una disminución a lo largo del tiempo.

En el caso de las cactáceas columnares se ha reportado la presencia de ácidos grasos en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis* sometidas a envejecimiento acelerado (45°C/65% HR) durante 18 días. En la primera especie el ácido oleico disminuyó de 0.044µg/gr a 0.040µg/gr mientras que el ácido linoleico disminuyó de 0.03419 µg/gr a 0.0315 µg/gr, por su parte el ácido estearico mantuvo un comportamiento constante durante todo el tratamiento. Por otro lado, *Neobuxbaumia mezcalaensis* disminuyó su concentración de ácido oleico y linoleico de 0.304µg/gr a 0.0263µg/gr, y de 0.02322µg/gr a 0.020µg/gr, respectivamente. Mientras que el ácido esteárico presentó el mismo comportamiento que en *Neobuxbaumia tetetzo*. Es importante señalar, que en ambas especies estadísticamente no hubo diferencias significativas en la concentración de los ácidos, Sin embargo, se asumió que los pocos cambios registrados en su concentración posiblemente se debieron a mecanismos que controlaron la peroxidación lipídica. Un comportamiento similar fue reportado por Vergara (2002) en semillas envejecidas de *Stenocereus stellatus* sometidas a humedades relativas de 7% y 58% con temperaturas de 25°C y 40°C donde se manifestó la disminución de los ácidos grasos linoleico y oleico. Resumiendo, la exposición de semillas de cactáceas a tratamientos de envejecimiento acelerado ocasiona la disminución en la concentración de ácidos insaturados, generalmente.

En contraste Priestley y Leopold (1979,1980) han reportado la ausencia de cambios en los niveles de ácidos grasos insaturados en semillas de soya durante el envejecimiento acelerado, por lo que consideran que la peroxidación no es el único evento bioquímico que ocurre en semillas deterioradas.

En el caso de *P. chende* el comportamiento en la concentración de los ácidos grasos insaturados y el saturado mostraron una disminución en el 5^{to}, 10^{mo} y 20^{vo} día, pero al 30^{vo} y 50^{vo} día la concentración de los mismos aumentó casi a la misma concentración reportada en los controles. Manuell (2006), reportó un comportamiento similar en la concentración del ácido linoleico en semillas de *Pachycereus hollianus* sometidas a envejecimiento acelerado.

Una posible explicación al incremento en la concentración de los ácidos grasos en las semillas de *Polaskia chende* es que probablemente tienen mayor resistencia al deterioro ya que se sabe que el incremento en los niveles de ácidos grasos ayuda a contrarrestar el estrés (Quinn, 1985). Además, en semillas de la misma población sometidas a envejecimiento acelerado (45°C/55 HR) durante dos años mantienen porcentajes de germinación arriba del 90%.

Otra posible explicación al incremento en la concentración de ácidos grasos en las semillas de *P. chende* probablemente puede estar relacionado con el aumento en la actividad enzimática de POX y CAT el cuál, sucedió en el 20^{vo} día de envejecimiento, por lo que, posiblemente el pico de reparación de las enzimas permitió la eliminación de las ERO producidas durante el tiempo de envejecimiento.

En general, el tratamiento de envejecimiento acelerado generó un gradiente de deterioro en las semillas de *P. chichipe* esto se puede evidenciar por las correlaciones positivas entre la pérdida de la viabilidad y la disminución de la actividad enzimática de POX, así como en la disminución en la concentración del ácido linoleico, oleico y esteárico. En contraste en *P. chende* no se encontró correlación entre la viabilidad y la concentración de ácidos grasos, aunque si se encontró correlación con la actividad enzimática de POX y CAT.

Kibinza y colaboradores (2006) reportaron que la peroxidación lipídica junto con la disminución en la actividad enzimática de CAT, SOD y GR, así como la acumulación de peróxido de hidrógeno y de malondialdehído están cercanamente correlacionados siendo los principales factores para la pérdida de la viabilidad en semillas envejecidas de girasol. Estudios realizados en semillas de soya (Sung y Jean, 1994; Sung y Chiu, 1995; Sung, 1996); frijol (Bailly *et al.*, 2001); maíz, chicharo, frijol soya (Madrid, 2001); algodón (Goel *et al.*, 2003); girasol (De Paula, 1994; Bailly *et al.*, 2004) y trigo (Lehner *et al.*, 2006; 2008), sustentan esta idea.

Finalmente, nuestros resultados establecen una clara relación entre la pérdida de la actividad detoxificante de las enzimas CAT y POX, la peroxidación lipídica y el deterioro de las semillas durante el envejecimiento acelerado en *Polaskia chichipe*.

Por otra parte, la varianza obtenida por medio del análisis quimiométrico QUANT+ generó valores de calibración altos en *P. chichipe* con 96% de varianza y un valor de $r = 0.98$ en germinación, lo que indicó la existencia de una gran correlación entre ambas variables. En lo que concierne a la estimación realizada para los ácidos grasos insaturados y uno saturado se presentaron valores por arriba del 89% de varianza, por lo que de acuerdo a la validez del modelo se consideran adecuados. Las correlaciones que mostraron los ácidos grasos en *P. chichipe* fueron altamente significativas, manteniéndose por arriba del 0.94, por lo que en este caso la predicción del modelo quimiométrico tanto para la viabilidad como para la concentración de los ácidos grasos es confiable para realizar futuras predicciones, sin tener que destruir al germoplasma. Estos resultados coinciden con los coeficientes de correlación, porcentajes de varianza y altas predicciones reportados en semillas de *Brassica napus* y *Stenocereus stellatus* (Vergara, 2002); *Beaucarnea gracilis* (Zavaleta, 2003); *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Lozada, 2005) y *Pachycereus hollianus* (Manuell, 2006).

Por el contrario, en el caso de *P. chende* el análisis quimiométrico generó una estimación baja con 22.61% de varianza y 0.47 de correlación. Mientras que en los ácidos grasos insaturados y uno saturado se presentaron varianzas por abajo del 40% y correlaciones menores a 0.60. Sin embargo, estos resultados corroboran la validez del método de estimación de la viabilidad por NIRS, ya que los bajos niveles de correlación obtenidos se deben a que las semillas de esta especie fueron muy tolerantes a las condiciones de temperatura y humedad relativa a las que fueron sometidas.

CONCLUSIONES

En base a estos resultados se concluye que:

- ♣ Las semillas de *Polaskia chichipe* y *Polaskia chende* son fotoblásticas positivas y tienen la capacidad de germinar en luz rojo-lejano.
- ♣ Las semillas de *Polaskia chende* presentan latencia fisiológica no profunda y son tolerantes a bajas temperaturas, mientras que, las semillas de *Polaskia chichipe* no presentan latencia ni tolerancia a bajas temperaturas.
- ♣ El envejecimiento acelerado a 55°C/60% HR produce un gradiente de longevidad en las semillas de *Polaskia chichipe* que se manifiesta en la disminución del porcentaje de germinación acumulado y en la TMG, así como en el aumento en el TPG. Mientras que, el tratamiento de 55°C/55% HR no generó un gradiente de envejecimiento para las semillas de *Polaskia chende* siendo muy tolerantes a tal condición.
- ♣ Las semillas de *Polaskia chichipe* muestran una disminución en la concentración de los ácidos grasos durante el envejecimiento acelerado.
- ♣ La actividad enzimática de CAT y POX en las semillas de *Polaskia chichipe* mostró una disminución gradual durante el envejecimiento acelerado, mientras que, en las semillas de *Polaskia chende* la disminución de la actividad de CAT y POX se vio abatida.
- ♣ *Polaskia chichipe* presentó una correlación directamente proporcional entre la pérdida de la viabilidad, la concentración de ácidos grasos saturados e insaturados y la actividad enzimática, sin embargo, *Polaskia chende* sólo presentó correlación en la viabilidad y en la actividad de CAT y POX.
- ♣ La técnica de NIRS y la predicción del programa quimiométrico QUANT+ en las semillas de *Polaskia chichipe* es adecuado para la estimación de la viabilidad.

BIBLIOGRAFIA

- Araos S., De Long O. 1999. Seed Germination of *Zizyphus miztol* (Grisebach.I.) viability During Storage under cold and ambient temperature. *Multequina* **13**: 39-43.
- Bailly C., Benamar A., Corbineau F. 1996. Changes in malondialdehyde, content and in superoxide dismutase, catalase and glutation reductase activities in sunflower seeds and related to deterioration during accelerated aging. *Physiology plantarum* **104**:646-652.
- Bailly C., Audigier C., Ladonne F., Wagner H., Coste F. 2001. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of experimental botany* **52**: 701-708.
- Bailly C. 2004. Active Oxygen Species and Antioxidants in Seed Biology. Research Review. *Physiologie Végétale Appliquée. Seeds Science Research* **14**: 93-107.
- Bailly C., Leymarie J., Lehner A., Rousseau S. 2004. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *Journal of Experimental Botany* **55**:475-483.
- Bell A. D. 1991. *Plant Form: An illustrated Guide to Flowering Plant Morfology*. Oxford University Press. New York.
- Benitez-Rodriguez L., Orozco-Segovia A., Rojas-Arechiga M. 2004. Light effect on seed germination of four *Mammillaria* species from the Tehuacán-Cuicatlán valley central México. *The Southwestern Naturalist* **49** (1):11-17.
- Bewley, J.D. y Black, M. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*. New York. Plenum press.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Camacho V. A. 1999. Producción y detoxificación enzimática de especies reactivas de oxígeno en semillas de maíz con distinta sensibilidad al envejecimiento. Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química. UNAM. México.
- Carmona A., Casas A. 2005. Management, Phenotypic patterns and domestication of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley, *Journal of arid environments* **60**: 115-132
- Cruz M., Casas A. 2002. Morphological variation and reproductive biology of *Polaskia chende* (Cactaceae) under domestication in Central Mexico. *Journal of Arid Environments* **51**:561-576.
- De Paula R. M. M., Perez-Otaola, M., Darder M., Torres M. 1996. Function of the ascorbate-glutathione cycle in aged sunflower seeds. *Physiology plantarum* **128**: 496-506.
- De Paula R. M. M. 1994. Alteraciones bioquímicas en semillas envejecidas de girasol (*H. annuus L.*) relacionadas con la viabilidad, funcionalidad de membranas y cambios asociados con la capacidad antioxidante. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- De Vos R. H. C., Lieke K. H. J., Bino R. 1994. Ageing of tomato seeds involves glutathione oxidation. *Plant Physiology* **92**: 131-139.
- Dubrovsky, G. J. 1996. Seed hydration memory in sonoran Desert cacti and its ecological implication. *American Journal of Botany* **83** (5):624-632.

El-Kassaby Y.A., W. Edwards D: G.1998.Genetic control of germination and the effects of accelerated aging in mountain hemlock seeds and its relevant to gene conservation. Vancouver, BC. Canada. Forest Ecology and Management.**112**: 203-211

Figueroa J. y Jaksic F. 2004. Seed and dormancy in plants of the Mediterranean region of central Chile. Centro de Estudios Avanzados en Ecología y Biodiversidad. Santiago of Chile Revista chilena de historia Natural

Figueroa J., Leon-Lobos P., Caviaras L., Pritchard H., Way M. 2004. Ecofisiología de semillas en ambientes contrastantes de Chile: un gradiente desde ecosistemas desérticos a templados-húmedos. Fisiología de las plantas. Valparaíso Chile: 81-98.

Goel, A., Kumar, A., Singh, I. 2003. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. J. Plant Physiology, **160**: 1093 – 1100.

Herman G. Mattick L.1976. Association of lipid oxidation with seed ageing and death. Nature **260**:323-324.

Hernández M. H., y Godínez Á. H. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. Acta Botánica, **26**:33-52.

Hunt D.1999. CITES. Cactaceae. Checklist.Royal Botanic Gardens. Kew. p 90.

ISTA. 2003. International rules of seeds testing. seeds Science and technology. Supplement **27**:333.

Kigel J. 1995. Seed germination in arid and semiarid regions In: Seed Development and Germination. New York. 853pp.

Lehner A., Bailly, C., Flechel, B., Poels, P., Come, D., Corbineau, F. 2006. Changes in wheat seed germination ability, soluble carbohydrate and antioxidant enzyme activities in the embryo during the desiccation phase of maturation. Journal of Cereal Science, **43**: 175-182.

Lehner A., Mamadou. N., Poels. P., Come. D., Bailly. C.,Corbineau. F. 2008.Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. Journal of Cereal Science **47**: 555-565.

Li A., Herrera J., Barboza R. 1996. Efecto del envejecimiento acelerado sobre la germinación y el vigor de la semilla de china sultani (*Impatiens wallerana*) en almacigo. Agronomía costarricense. **20**(2): 173-180.

Lozada V. Y. 2005. Peroxidación de ácidos grasos de semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis* en condiciones de almacenamiento a largo plazo. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.

Manuell C. I. E. B. 2006. Efecto del envejecimiento acelerado sobre los niveles de ácidos grasos insaturados de semillas de *Pachycereus hollianus*. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.

McDonald M. B. 1999. Seed Deterioration: Physiology, Repair and Assessment. Seeds Science and Technology **27**: 177-237.

Madrid C. G. 2001. Enzimas supresoras de especies reactivas de oxígeno y su asociación con la sensibilidad al envejecimiento de diferentes especies de semillas. Tesis de Licenciatura para Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. UNAM. México.

Niembro R. A. 1990. La composición química de y sus efectos en la conservación In: Memoria del seminario en taller sobre investigaciones en semillas forestales. Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal. Bogotá-Colombia. pp. 111-118.

Nobel P.S. 1988. Environmental Biology of agaves and Cacti. Cambridge: Cambridge university Press. 270pp pendiente posiblemente lo quitaré.

Olvera C. Y. 2001. Estudio Ecofisiológico de la germinación sobrevivencia y crecimiento de *Opuntia tomentosa* en la reserva del pedregal de San Ángel Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Omran G. Ref. 1980. Peroxide levels and the activities of Catalase Peroxidase and Indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings. Plant physiology , **65**:407- 408.

Otero A., Casas A., James L. Cruses J. 2005. Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, México. Molecular Ecology **14**:1603-1611.

Pons T.L. 1992. Seed responses to Light . In M. Fenner, Seeds: the ecology of regeneration in plant communities, 259-284.

Puntarulo S. y Boveris A. 1990. Effect natural and accelerated aging on the hidroperoxide metabolism of soybean embryonic axes. Plant Science 68:27-32.

Priesley D.A y Leopold, A.C. 1979. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of Soybean seeds. Plant Physiology **63**: 726-729.

Priesley D.A. y Leopold, A.C. 1983. Lipid changes during natural ageing of soybean seeds. Plant Physiology **59**:467-470.

Quinn P., Vertucci C. 1985. Acquisition and loss of desiccation tolerance. Seed germination in arid and semiarid regions In: Seed Development and Germination. New York. 853pp

Rojas-Aréchiga M., Orozco-Segovia A., Vazquez-Yanes C. 1997. Effect of light on germination of seven species of cacti from the Zapotitlan Valley in Puebla, Mexico. Journal of Arid Environments **36**: 571-578.

Rojas-Aréchiga M., Vazquez-Yanes C., Orozco-Segovia A. 1998. Seed response to temperature of Mexican cacti species from two life forms: an ecophysiological interpretation. Plant Ecology 135:207-214.

Rojas-Arechiga M., Vázquez-Yanes C. 2000. Cactus seed germination: a review. Journal of Arid Environments **44**:85-104.

Rojas-Arechiga M., Casas A. Vazquez-Yanes C. 2001. Seed germination of wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacan- Cuicatlan Valley. Central México. Journal of Arid Environments **49**:279-287.

Rzedowsky J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México.

Salinas R. A., Yoldjian A. M., Dietrich M. L., Craviotto M. R., Bisaro V. 2002. Glysin, α -conglycinin and α -amylase behaviour in artificially deteriorated and not deteriorated seeds soybean. Pesq. Agropec. bras., Brasilia. **37** (8):1175-1181

Serna N. L. 2007. Caracterización morfológica de la semilla y germinación de *Mammillaria densispina*. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. Facultad de Ciencias.

Sung J.M., Chiu C.C. 1995. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. Plant Science **110**: 45-52.

Sung J.M. y Jeng, T.L. 1994. Lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. Plant physiology, **91**:51-55.

Sung J. 1996. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging. In soybean seeds during aging. *Physiology Plant*, **97**:85-89.

Scandalios G. J. 1997. Seed development and germination. New York. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold spring Harbor laboratory press.

Stewart R.R.C., Bewley D.J. 1980. Lipid peroxidation with acceleration aging Soybean axes. *Plant. Physiology*, **65**: 245-248.

Trujillo H. A. 2002. Ecología fisiológica de la germinación de las cactáceas del genero *Lophofora*. Universidad nacional Autónoma de México. Facultad de ciencias.

Vann Tooren B., Pons, L.T. 1988. Effect of temperature and light on the germination in chalk in chalk grassland species. *Functional ecology* **2**: 303-310.

Vázquez B. M. E. M., Torres T. A., Zamora V.V.M., Mendoza V.R. 1996. Relación entre tipo y contenido de proteínas con la germinación, vigor y sanidad en semilla de maíz. Departamento de Ciencias Básicas Tesis Maestría en Tecnología de Semillas. Saltillo, Coahuila.

Vázquez Yanes C., Orozco A., Rojas M., Sánchez M. E., Cervantes V. 1997. La reproducción de las plantas: semillas y meristemos. Fondo de cultura económica. México DF. 16pp.

Vergara F. 2002. Inducción de envejecimiento artificiales semillas de *Stenocereus stellatus* y *Brassica napus L.* y su posible relación con la peroxidación de ácidos grasos. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Zar J.H. 1998. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey. 929pp.

Zavaleta P. M. 2003. Relación entre los niveles de ácidos grasos insaturados y la viabilidad en semillas de *Hechtia podantha* y *Beaucarnea gracilis* durante el envejecimiento acelerado. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. Facultad de Ciencias. México. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.

Apéndice A, sección I**TRATAMIENTOS PREVIOS *POLASKIA CHICHIPE***

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza se encontraron diferencias significativas (*) entre de los siguientes tratamientos:

Contraste	Sig	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig	Diferencia	+/-LSD Limites
FRIO - LB	*	-68.7663	7.52882	LB - OBS	*	68.7663	7.52882
FRIO- LBAG	*	-72.2595	7.52882	LB - OBSAG		-0.746718	7.52882
FRIO- OBS		0.0	7.52882	LB - RL		7.24801	7.52882
FRIO - OBSAG	*	-69.513	7.52882	LBAG - OBS	*	72.2595	7.52882
FRIO - RL	*	-61.5182	7.52882	LBAG - OBSAG		2.74655	7.52882
LB - LBAG		-3.49327	7.52882	LBAG - RL	*	10.7413	7.52882
OBS - OBSAG	*	-69.513	7.52882	OBSAG - RL	*	7.99473	7.52882
OBS - RL	*	-61.5182	7.52882				

Apéndice A, sección II**TRATAMIENTOS PREVIOS *POLASKIA CHENDE***

Contraste	Sig	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig	Diferencia	+/-LSD Limites
FRIO - LB		-9.93423	12.3096	LB - RL		4.69511	12.3096
FRIO- LBAG	*	-29.0088	12.3096	LBAG - OBS	*	69.0248	12.3096
FRIO- OBS	*	40.016	12.3096	LBAG - OBSAG		11.744	12.3096
FRIO- OBSAG	*	-17.2648	12.3096	LBAG - RL	*	23.7697	12.3096
FRIO- RL		-5.23912	12.3096	OBS - OBSAG	*	-57.2808	12.3096
LB - LBAG	*	-19.0746	12.3096	OBS - RL	*	-45.2551	12.3096
LB - OBS	*	49.9502	12.3096	OBSAG - RL		12.0257	12.3096
LB - OBSAG		-7.33056	12.3096				

Apéndice B, sección I**GRADIENTE *POLASKIA CHICHIPE***

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos bajo las condiciones de 45°C/ 45% HR, 45°C/ 55% HR, Sin embargo, si se presentaron diferencias significativas entre los tiempos de las siguientes temperaturas y humedades relativas:

tratamientos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	tratamientos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
45°C/65% HR	1 - 50	*	-16.326	14.6128	T.A/65% HR	10 - 3	*	9.86553	9.34777
	30 - 50	*	-16.0395	14.6128		10 - 5	*	11.2965	9.34777
	5 - 50	*	-16.0395	14.6128		10 - 50	*	9.57903	9.34777
T.A/45% HR	1 - 50	*	-16.326	14.6128	55°C/60% HR	1 - 20	*	19.9651	16.6716
	30 - 50	*	-16.0395	14.6128		1 - 50	*	27.1638	16.6716
	5 - 50	*	-16.0395	14.6128		10 - 50	*	19.113	16.6716
	1 - 10	*	-12.1463	9.26155		20 - 3	*	-25.9194	16.6716
T.A/55% HR	10 - 3	*	10.4288	9.26155	3 - 30	*	27.3189	16.6716	
	10 - 50	*	15.2819	9.26155	3 - 50	*	33.1181	16.6716	
	5 - 50	*	10.3491	9.26155	5 - 50	*	17.5076	16.6716	

Apéndice B, sección II

GRADIENTE *POLASKIA CHENDE*

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos bajo las condiciones de T.A. /55% HR; sin embargo, si se presentaron diferencias significativas (*) entre los tiempos de las siguientes temperaturas y humedades relativas:

tratamientos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	tratamientos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
45°C/55% HR	1 - 20	*	-15.678	14.716	45°C/65% HR	1 - 50	*	32.1916	25.6337
	10 - 30	*	17.757	14.716		10 - 30	*	27.4633	25.6337
	10 - 5	*	23.4275	14.716		10 - 50	*	34.9486	25.6337
	20 - 30	*	24.2175	14.716		20 - 50	*	32.8696	25.6337
	20 - 5	*	29.888	14.716		3 - 50	*	30.0159	25.6337
	3 - 30	*	17.757	14.716		5 - 50	*	28.1266	25.6337
	5 - 50	*	-16.967	14.716		45°C/45% HR	1 - 10	*	-26.5651
3 - 5	*	23.4275	14.716	T.A/65% HR	1 - 50	*	-20.6107	19.047	

Apéndice C, sección I ENVEJECIMIENTO ACELERADO EN SEMILLAS DE *POLASKIA CHICHIFE*

Porcentaje de germinación acumulada en semillas de *Polaskia chichipe*

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 5	*	16.2466	16.1776	5 - 30	*	20.4657	16.1776
1 - 10	*	20.3054	16.1776	5 - 50	*	44.1483	16.1776
1 - 20	*	30.2877	16.1776	10 - 30	*	16.407	16.1776
1 - 30	*	36.7124	16.1776	10 - 50	*	40.0895	16.1776
1 - 50	*	60.3949	16.1776	20 - 50	*	30.1072	16.1776
3 - 20	*	21.7542	16.1776	30 - 50	*	23.682	16.1776
3 - 30	*	28.1788	16.1776				

Tasa Máxima de Germinación (TMG) en semillas de *Polaskia chichipe*

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 5	*	73.9763	39.9474	3 - 5	*	72.5426	39.9474
1 - 10	*	63.8751	39.9474	3 - 10	*	62.4414	39.9474
1 - 20	*	88.3007	39.9474	3 - 20	*	86.8671	39.9474
1 - 30	*	68.5694	39.9474	3 - 30	*	67.1358	39.9474
1 - 50	*	78.6678	39.9474	3 - 50	*	77.2341	39.9474

Tiempo Promedio de Germinación (TPG) en semillas de *Polaskia chichipe*

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 5	*	-2.48977	2.33444	5 - 50	*	2.78107	2.33444
1 - 20	*	-4.1528	2.33444	10 - 50	*	2.37752	2.33444
1 - 30	*	-2.92996	2.33444	20 - 50	*	4.4441	2.33444
3 - 5	*	-2.97023	2.33444	30 - 50	*	3.22127	2.33444
3 - 10	*	-2.56668	2.33444	3 - 30	*	-3.41043	2.33444
3 - 20	*	-4.63326	2.33444				

Sincronía germinativa (S) en semillas de *Polaskia chichipe*

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 5	*	-0.0972132	0.096770	5 - 30	*	0.130398	0.096770
3 - 5	*	-0.140931	0.096770	5 - 50	*	0.141425	0.096770
3 - 20	*	-0.10135	0.096770	10 - 50	*	0.0971138	0.096770
20 - 50	*	0.101844	0.096770				

Apéndice C, sección II ENVEJECIMIENTO ACELERADO EN SEMILLAS DE *POLASKIA CHENDE*

Porcentaje de germinación acumulada en semillas de *Polaskia chende*

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 10	*	-14.4652	11.576	20 - 3	*	15.115	11.576
1 - 20	*	-15.115	11.576	20 - 30	*	15.7746	11.576
1 - 5	*	-15.9466	11.576	30 - 5	*	-15.9466	11.576
1 - 50	*	-12.5308	11.576	30 - 50	*	-12.5308	11.576
10 - 3	*	14.4652	11.576	5 - 50	*	-16.6062	11.576
10 - 30	*	15.1248	11.576				

Tasa Máxima de Germinación (TMG) en semillas de *Polaskia chende*

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 10	*	-14.4652	11.576	20 - 3	*	15.115	11.576
1 - 20	*	-15.115	11.576	20 - 30	*	15.7746	11.576
1 - 5	*	-15.9466	11.576	3 - 5	*	-15.9466	11.576
1 - 50	*	-12.5308	11.576	3 - 50	*	-12.5308	11.576
10 - 3	*	14.4652	11.576	30 - 5	*	-16.6062	11.576
10 - 30	*	15.1248	11.576	30 - 50	*	-13.1904	11.576

Tiempo Promedio de Germinación (TPG) en semillas de *Polaskia chende*

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 30	*	-0.904656	0.713143	20 - 30	*	-0.980449	0.713143
1 - 50	*	-0.995512	0.713143	20 - 50	*	-1.07131	0.713143
10 - 30	*	-0.980449	0.713143	3 - 30	*	-1.58063	0.713143
10 - 50	*	-1.07131	0.713143	3 - 50	*	-1.67148	0.713143
5 - 50	*	-0.995512	0.713143	30 - 5	*	0.904656	0.713143

Sincronía germinativa (S) en semillas de *Polaskia chende*

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 3	*	-0.710355	0.423237	20 - 3	*	-0.807911	0.423237
10 - 3	*	-0.799214	0.423237	3 - 30	*	0.720398	0.423237
3 - 50	*	0.680349	0.423237	3 - 5	*	0.643024	0.423237

Apéndice D, sección I

ACIDOS GRASOS *POLASKIA CHICHIPE*

Ácido oleico

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 3	*	8.43682	2.41472	5 - 10	*	5.05819	2.41472
1 - 5	*	12.9452	2.41472	5 - 15	*	4.71549	2.41472
1 - 10	*	18.0034	2.41472	5 - 20	*	4.52435	2.41472
1 - 15	*	17.6607	2.41472	5 - 30	*	4.59621	2.41472
1 - 20	*	17.4695	2.41472	3 - 10	*	9.56653	2.41472
1 - 30	*	17.5414	2.41472	3 - 15	*	9.22383	2.41472
3 - 5	*	4.50834	2.41472	3 - 20	*	9.03269	2.41472
3 - 30	*	9.10455	2.41472				

Ácido linoleico

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 3	*	9.41506	3.18715	5 - 10	*	4.76204	3.18715
1 - 5	*	8.75228	3.18715	5 - 15	*	4.2816	3.18715
1 - 10	*	13.5143	3.18715	5 - 20	*	3.41869	3.18715
1 - 15	*	13.0339	3.18715	5 - 30	*	3.90322	3.18715
1 - 20	*	12.171	3.18715	3 - 10	*	4.09926	3.18715
1 - 30	*	12.6555	3.18715	3 - 15	*	3.61881	3.18715
3 - 30	*	3.24043	3.18715				

Ácido estearico

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 3	*	4.49831	1.70687	5 - 10	*	3.77206	1.70687
1 - 5	*	4.38361	1.70687	5 - 15	*	3.19854	1.70687
1 - 10	*	8.15567	1.70687	5 - 20	*	3.00053	1.70687
1 - 15	*	7.58215	1.70687	5 - 30	*	2.99153	1.70687
1 - 20	*	7.38414	1.70687	3 - 10	*	3.65736	1.70687
1 - 30	*	7.37514	1.70687	3 - 15	*	3.08385	1.70687
3 - 30	*	2.87683	1.70687	3 - 20	*	2.88583	1.70687

Ácido araquidonico

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 5	*	0.434411	0.344831
1 - 10	*	0.531534	0.344831
1 - 15	*	0.521099	0.344831
1 - 20	*	0.490544	0.344831
1 - 30	*	0.50424	0.344831

Apéndice D, sección II

ACIDOS GRASOS POLASKIA CHENDE

Ácido oleico

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (*) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 5	*	17.4275	11.4274	3 - 5	*	18.1284	11.4274
1 - 10	*	15.0876	11.4274	3 - 10	*	15.7884	11.4274
1 - 20	*	18.7152	11.4274	3 - 20	*	19.416	11.4274

Acido linoléico

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (-) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
10 - 30	*	-20.2863	14.1503	5 - 30	*	-19.9936	14.1503
10 - 50	*	-14.9539	14.1503	5 - 50	*	-14.6612	14.1503
20 - 30	*	-19.0175	14.1503				

Ácido esteárico

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (-) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
10 - 30	*	-12.3603	12.3218

Apéndice E, sección I

ACTIVIDAD ENZIMATICA *POLASKIA CHICHIPE*

Actividad de peroxidasa

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (-) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 10	*	873.6	587.394	15 - 20	*	689.6	587.394
1 - 20	*	613.6	587.394	15 - 30	*	1008.0	587.394
1 - 30	*	932.0	587.394	15 - 50	*	1006.0	623.026
1 - 50	*	930.0	623.026	10 - 15	*	-949.6	587.394

Actividad de catalasa

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (-) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 20	*	531.095	371.029
1 - 30	*	469.295	422.435
1 - 50	*	373.007	371.029

Apéndice E, sección II ACTIVIDAD ENZIMATICA POLASKIA CHENDE

Actividad de peroxidasa

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (-) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites	Contraste	Sig.	Diferencia	+/-LSD Limites
1 - 10	*	138.4	63.07	10 - 30	*	107.2	63.07
1 - 30	*	245.6	63.07	10 - 50	*	107.2	63.07
1 - 50	*	245.6	63.07	20 - 30	*	187.2	63.07
10 - 20	*	-80.0	63.07	20 - 50	*	187.2	63.07

Actividad de catalasa

De acuerdo con el valor de LSD a 95% de confianza las diferencias significativas (-) se presentaron entre los siguientes tiempos:

Contraste	Sig.	Diferencia	Contraste	Sig.	Diferencia
1 - 30	*	509.419	10 - 50	*	308.727
1 - 50	*	509.419	20 - 30	*	368.0
10 - 30	*	308.727	20 - 50	*	368.0

-Que es ser verdadero?—pregunto un día el Conejo, mientras yacía con el Caballo de Piel junto a la chimenea, en el cuarto de juegos....

-No tiene que ver la forma en que estas hecho –respondió el Caballo de piel

-Es algo que te pasa. Cuando un niño te quiere durante mucho, mucho tiempo, y no solo juega contigo sino que te quiere y te ama de verdad, entonces te vuelves verdadero.

-¿Duele mucho?—pregunto el Conejo.

-A veces....a veces duele mucho –respondió el Caballo de Piel, que nunca mentía.

Una hermosa ave puede adorar a un pez
Y el pez puede amar a la hermosa ave
Pero ¿Dónde vivirían?.....
El ave tiene un cielo para volar libremente
El pez solo tiene el estanque del cuál no debe salir.
Probablemente el error del pez es haber creído en el amor y sentir que podía llegar a volar.....
El error del Ave fue haber olvidado por un instante que ya no debía amar a nadie...eso....eso nunca debió pasarle.....

“Para el único amor de mi vida, por haber tenido la dicha y la suerte de conocerte y permitirme ser por un instante parte de tu vida, gracias por haber estado a mi lado y apoyarme siempre, por ser el refugio de mis tristezas y fuente de mi felicidad....por ser el amigo incondicional. Deseo que seas inmensamente feliz aunque la vida no deje que sea conmigo”.

Tu pequeña niña