



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

**RECUPERACIÓN DE ESPECIES VEGETALES CLAVE PARA LA RESTAURACIÓN
EN LA SELVA TROPICAL HÚMEDA DE LA UNIDAD DE MANEJO PARA LA
CONSERVACIÓN DE LA VIDA SILVESTRE DEL EJIDO PLAYÓN DE LA GLORIA
MARQUÉS DE COMILLAS, CHIAPAS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALEJANDRA LÓPEZ VALENZUELA

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALMA DELFINA LUCÍA OROZCO SEGOVIA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. ANA ELENA MENDOZA OCHOA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**DRA. CHRISTINA D. SIEBE GRABACH
INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

**RECUPERACIÓN DE ESPECIES VEGETALES CLAVE PARA LA RESTAURACIÓN
EN LA SELVA TROPICAL HÚMEDA DE LA UNIDAD DE MANEJO PARA LA
CONSERVACIÓN DE LA VIDA SILVESTRE DEL EJIDO PLAYÓN DE LA GLORIA
MARQUÉS DE COMILLAS, CHIAPAS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALEJANDRA LÓPEZ VALENZUELA

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALMA DELFINA LUCÍA OROZCO SEGOVIA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR :
DRA. ANA ELENA MENDOZA OCHOA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**DRA. CHRISTINA D. SIEBE GRABACH
INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 03 de marzo de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, de la alumna **LÓPEZ VALENZUELA ALEJANDRA** con número de cuenta: **512026745**, con la tesis titulada "**Recuperación de especies vegetales clave para la Restauración en la Selva Tropical Húmeda de la Unidad de Manejo para la Conservación de la vida silvestre del ejido Playón de la Gloria, Marqués de Comillas, Chiapas**", bajo la dirección de la **DRA. ALMA DELFINA LUCÍA OROZCO SEGOVIA**:

Presidente: DR. ROBERTO ANTONIO LINDIG CISNEROS
Vocal: M. EN C. MARÍA JULIA CARABIAS LILLO
Secretario: DRA. ANA ELENA MENDOZA OCHOA
Suplente: DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA
Suplente: DRA. CHRISTINA DESIREE SIEBE GRABACH

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de abril de 2014

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por ser parte fundamental en mi formación académica y al Programa de Apoyo a Estudiantes del Posgrado (PAEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo recibido para asistir al congreso “5Th World Conference on Ecological Restoration (Madison, Wisconsin, 2013) donde se presentaron los resultados de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado (número CVU/becario: 440685/ 270084).

A Natura y Ecosistemas Mexicanos, A.C., ya que sin su apoyo, la realización de esta tesis no hubiera sido posible y al proyecto PAPIIT IN201912 por el apoyo recibido para la conclusión de este trabajo.

A mi tutora, la Dra. Alma Orozco Segovia, por haberme aceptado y por haber confiado en mí para realizar éste proyecto, por todo su apoyo y cariño a lo largo de este proceso. Gracias por todas las horas de trabajo, sus valiosos consejos y por todo lo que he aprendido a su lado.

También agradezco a los miembros de mi comité tutorial, Dra. Ana Elena Mendoza Ochoa y la Dra. Christina D. Siebe Grabach por su asesoría, las observaciones realizadas durante la elaboración de esta tesis y sobre todo por su tiempo y paciencia.

.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a los miembros del jurado, el Dr. Roberto Lindig, la M. en C. Julia Carabias Lillo, la Dra. Margarita Collazo, la Dra. Christina Siebe y a la doctora Ana Elena Mendoza, por sus valiosos comentarios y sugerencias que enriquecieron esta tesis.

A la M. en C. María Esther Sánchez Coronado por el apoyo técnico otorgado.

A Natura y Ecosistemas Mexicanos, A.C., en especial a Julia Carabias Lillo y a Javier de la Maza, por todo el apoyo que me brindaron y por haberme dado la oportunidad de trabajar en la selva y vivir muchas experiencias inolvidables que marcarán mi camino por siempre.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco del laboratorio de Desarrollo en Plantas (Facultad de Ciencias, UNAM) por el apoyo técnico para realizar el estudio histológico, por su tiempo y sus consejos. A la Dra. Judith Márquez Guzmán por su ayuda en la caracterización histológica y por todo el apoyo y por la calidez que la caracteriza.

A la M. en F. Ana Isabel Bieler Antolín del Laboratorio de Microcine (Facultad de Ciencias, UNAM) por la toma de fotografías de las preparaciones de los cortes histológicos.

A todo el laboratorio de Ecología Fisiológica (Instituto de Ecología, UNAM), por los momentos divertidos y el apoyo continuo: Marimar, Ale Ro., Elsa, Juan, Alexis, Diana, Esther, Sandra, Erik, Luis, Humberto, Ángel, Ximena, Manu, Alfredo, ¡Gracias a todos!. A Laura E. Malagón de la Torre gracias por siempre estar ahí para ayudar, platicar y caminar.

A todo el equipo de Natura, por ser un excelente grupo de trabajo y por haberme enseñado y explicado tantas cosas; en especial a Violeta, Rocío, Renata y Alicia. A Noe Vazquez, David Jimenez y Mario Lombera, por su apoyo en el trabajo de campo y por enseñarme tantos secretos de la selva

A los del laboratorio de Desarrollo en plantas (Facultad de Ciencias, UNAM).

A Luz María Aranda y Erika Rodríguez Reyes por el apoyo en la realización de diversos trámites, a la Biol. Georgina García Méndez por el apoyo logístico brindado durante la realización de la maestría.

A mis padres Jorge y Angeles, por darme la libertad de elegir mi camino, por enseñarme a defender mis ideas, por su inmenso cariño. A mi hermana Mariana por compartir mi vida y por siempre estar a mi lado. Los adoro.

A toda mi familia: abuelos (Licha, Jorge, Isabel y Enrique), tías, tíos (Mary, Qety, Vic, Augusto y Gabriel), primos (Tania, Ana, Pablo, Enrique, Augusto, Andrea, Moises y Adrian y Gus) y sobrinos (Julián, Esteban, Diego, Isabel, Mila y Mateo), por siempre creer en mí y alentarme a seguir adelante.

A mis amigos revoltosos: Harumy, Karen, Miguel, Aline, Mercedes, Frida y María por su apoyo incondicional y por compartir la mitad de nuestras vidas. A Betty por su inmenso cariño, a Bernardo, a Val y Chanto por apoyarme tanto.

A Bruno A. Barrales Alcalá por su generosidad, compañía, entrega y por enseñarme tantas cosas a diario.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	4
Disturbios, cambio de uso de suelo y fragmentación de los bosques tropicales	10
Restauración ecológica	11
Almacenamiento de semillas.....	12
Almacenamiento de <i>Mucuna</i> y <i>Aristolochia</i>	13
Germinación.....	15
Latencia.....	15
Métodos para romper la latencia	16
a) Latencia física.....	16
b) Latencia fisiológica	18
c) Latencia morfológica.....	19
OBJETIVOS	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares	20
Especies estudiadas	21
<i>Aristolochia grandiflora</i> (Aristolochiaceae).....	21
<i>Mucuna argyrophylla</i> (Fabaceae).....	21
Recolecta de semillas	23
Germinación.....	24
Germinación de semillas de <i>A. grandiflora</i> y <i>A. máxima</i> recolectadas en febrero de 2012	24
Prueba piloto	24
Germinación de semillas de <i>A. grandiflora</i> y <i>A. máxima</i> recolectadas en marzo de 2012	24
Tratamientos en temperatura fluctuante.....	24

Germinación de semillas de <i>A. grandiflora</i> recolectadas en julio de 2012	25
Rompimiento de la latencia con giberelinas.....	25
Rompimiento de la latencia con imbibición en agua de humo	25
Rompimiento de la latencia debido a la dureza de los cotiledones	26
Rompimiento de la latencia con concentraciones altas de giberelinas, incubación en agua de humo y estratificación caliente y fría	26
Germinación de <i>Mucuna argyrophylla</i> recolectadas en febrero de 2012	27
Rompimiento de la latencia física con escarificación mecánica	27
Germinación de <i>Mucuna argyrophylla</i> recolectadas en abril de 2012	27
Rompimiento de la latencia física con agua caliente.....	28
Perfil edafológico del suelo	28
Germinación en campo de ambas especies <i>Mucuna argyrophylla</i> y <i>Aristolochia grandiflora</i> recolectadas en julio de 2012	28
Plantación en campo de <i>Mucuna argyrophylla</i>	29
Histología de las semillas de <i>Aristolochia grandiflora</i>	30
Preparación del material	30
Tinción y pruebas histoquímicas	31
Fotomicrografía	31
Análisis estadísticos	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Recolecta de semillas	32
Germinación.....	33
Prueba piloto y tratamientos en temperatura fluctuante.....	33
Rompimiento de la latencia con giberelinas	35
Rompimiento de la latencia con imbibición en agua de humo	36
Tratamiento para romper la latencia con solventes y tratamiento para romper latencia debido a la dureza de los cotiledones.....	38
Rompimiento de la latencia con concentraciones altas de giberelinas, incubación en agua de humo y estratificación caliente y fría.....	40
Rompimiento de la latencia física con escarificación mecánica de <i>Mucuna argyrophylla</i>	45
Rompimiento de la latencia física con agua caliente y enterramiento en campo	47
Descripción general del suelo	51
Gremiación en campo	52
Plantación en campo	52
Histología de las semillas de <i>Aristolochia grandiflora</i>	53

Pruebas histoquímicas	57
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	62
COSTOS PARA GERMINAR EN CAMPO	63
LITERATURA CITADA.....	63
ANEXO I.....	74
ANEXO II	80

RESUMEN

En Playón de la Gloria, Chiapas, los ejidatarios crearon una unidad de manejo para la conservación de la vida silvestre (UMA) para conservar la selva y minimizar los efectos de la deforestación. Durante los muestreos realizados en el 2009 para establecer el programa de manejo de ésta, no se obtuvo registro de algunas especies de los géneros de mariposas *Battus*, *Parides* y *Morpho* que tienen importancia económica para la zona. Por lo que es necesaria, la conservación de los hábitats que necesitan para completar sus ciclos de vida. Una alternativa es iniciar la restauración de su hábitat reintroduciendo las especies de plantas de las que se alimentan (*Mucuna* y *Aristolochia*). Se tienen muy pocos datos sobre la germinación y conducta en almacén de las semillas de estas especies, incluso a nivel de género, por lo que es necesario generar información básica sobre estos tópicos. Para esto se determinaron las condiciones de germinación de *Mucuna argyrophylla*, *Aristolochia grandiflora* y *Aristolochia máxima* en cámaras de germinación a 25 y 25°C y en vivero (en el campo) y se probaron distintos tratamientos para inducir su germinación. Las semillas recién recolectadas, al inicio de la época de producción de semillas, germinaron en porcentajes relativamente altos, 89% *A. máxima* y 45% *A. grandiflora*, sin embargo semillas recolectadas un mes después presentaron una germinación casi nula. Con la adición de giberelinas (250 ppm) no se removió la latencia (germinación = 12%); con mayores concentraciones (1500 ppm) se removió parcialmente la latencia (20% de germinación). El tratamiento de agua de humo incrementó significativamente la germinación (23%) con respecto al control. Las semillas de *Mucuna argyrophylla* presentaron latencia física, por lo que germinaron en un 60% al hacerles un orificio en la región chalazal. Para saber por qué las semillas de *A. grandiflora* tuvieron una baja capacidad germinativa se realizaron cortes

histológicos de las semillas. Se observó un embrión pequeño pero bien diferenciado y tejidos que funcionan como una capa mecánica e impiden el paso del agua a la semilla. Esto, aunado al hecho de que las semillas no se embeben, sugiere que las semillas producidas en los meses más calientes al año presentan latencia física. Además se sembraron semillas en campo, por lo cual se hicieron análisis edafológicos para saber si estas plantas requieren condiciones específicas para su crecimiento. Dada la baja germinación y sobrevivencia de la plántula de *A. grandiflora* en vivero, en campo, solo se trasplantaron las plántulas de *M. argyrophylla*, donde la sobrevivencia en la selva fue del 2%, en el acahual del 25% y en la ribera del 7%. Para fines prácticos de restauración ecológica y manejo de estas especies, las semillas de *Mucuna argyrophylla* tienen mejor desempeño que las de *Aristolochia grandiflora*, por su buena capacidad germinativa, y posibilidad de almacenamiento a largo plazo. Mientras que, las semillas de *A. grandiflora* se deben recolectar al principio de la producción de semillas y germinarse inmediatamente. Esto garantiza una alta producción de plántulas sin necesidad de ningún tratamiento pregerminativo. La principal limitante para la producción de estas plantas es la dificultad para su recolección, las plantas crecen en pequeñas poblaciones separadas por grandes distancias.

ABSTRACT

Currently, in Playon de la Gloria (Lacandon rain forest, Chiapas, Mexico) residents created an environmental management unit to preserve the rainforest and minimize the effects of deforestation. In 2009, some important lepidoptera species previously registered for this area was not recorded again (genera of butterflies *Battus*, *Parides* and *Morpho*). To favor the reestablishment of these species it is necessary the conservation of habitats and the reintroduction of feed plant for butterflies (*Mucuna* and *Aristolochia*). But few studies have been made on their

germination, storage behavior, even at the genus level; so it is necessary to generate basic information about this topic. For this we determined the effect of different treatments on seed germination of *Mucuna argyrophylla*, *Aristolochia grandiflora* and *Aristolochia maxima*. Seeds were germinated at 25°C and 25-35°C and in the field. Freshly collected seeds of *Aristolochia* germinated in high percentages *A. maxima* (89%) and *A. grandiflora* (45%). However, in seeds collected one month later, the germination percentage of *A. grandiflora* was very low (12% with 250 ppm of gibberellins). In this species 1500 ppm of gibberellins removed partially dormancy and germinated in 20%, water smoke also improved significantly germination (23%) in respect to the control. We had no sufficient seeds of *A. maxima* to test these treatment. Seeds of *M. argyrophylla* had physical dormancy thus seeds germinated in 60% after we did a hole in the chalazal area. To know why the seeds of *A. grandiflora* had low germination, In the seed were made longitudinal cuts, perpendicular to the median plane. We observed a small but differentiated embryo, and a tissue that act as a mechanical layer that prevents the seed water uptake, this together with the fact that the seeds are not embedded, suggests that seed produced in the hottest months of the year have physical dormancy. Seeds also were sown in the field, so pedological analyzes were made to see if these plants require specific conditions for growth. Given the low germination and survival in a shade house of *A. grandiflora* seedling, we only transplanted *Mucuna* seedlings to the field under different conditions. Survival was 2% in the forest, 25% in the "acahual" and 7% in the river.bank For practical purposes of ecological restoration seeds of *Mucuna argyrophylla* work better than those of *Aristolochia grandiflora*, because they have good germination capacity and the possibility of long-term storage. The seeds of *A. grandiflora* should be collected at the beginning of the production of seeds and germinated

immediately; this ensures high production of seedlings without any pretreatment. The main limitation for the production of these plants is the difficulty for sowed collection because the plants grow in small populations separated for large distances.

INTRODUCCIÓN

La Selva Lacandona es uno de los ecosistemas naturales del trópico húmedo mexicano más importantes, por su gran diversidad biológica y los servicios ambientales que presta. Aún conserva la quinta parte de la diversidad biológica del país en un área que representa el 0.16% del territorio nacional (de la Maza, 2006). Los estudios sobre la biota realizados en la zona indican la presencia de 630 especies de mariposas diurnas, las cuales se reportan en el ejido Boca de Chajul (dentro del municipio Marqués de Comillas). Representan el 30% de las 1800 especies conocidas en el país. Entre ellas se encuentran algunas consideradas como especies con importancia comercial y ecológica (de la Maza, 1985).

La problemática ambiental actual en el municipio Marqués de Comillas depende de varios factores, entre los que destacan: la pérdida y fragmentación de los ecosistemas naturales por la extracción de maderas, la expansión de la frontera agropecuaria, la colonización no planificada y la sobreexplotación de los recursos forestales. Muchos espacios talados entraron en un proceso irreversible de empobrecimiento de la tierra debido a la erosión y al progresivo agotamiento del suelo fértil de este ecosistema (Jan de Vos, 2002). Esta problemática se refleja en el ejido Playón de la Gloria, en donde la vegetación remanente tiene especial importancia para la conservación de la biodiversidad, debido a que funciona como un corredor biológico entre la Reserva de la Biosfera Montes Azules y los fragmentos de selva de los ejidos circundantes, tales como El Pirú,

Santa Rita, Galacia, Flor de Marqués y Chajul (Carabias *et al.*, 2008). La tasa anual de deforestación de este ejido, hasta 2007, era de 3.5% anual, superando la media estatal, lo cual significa una pérdida de aproximadamente 60 ha por año, para el periodo del 2008-2010, la tasa de deforestación anual para el ejido Playón de la Gloria disminuyó drásticamente hasta alcanzar valores menores a 1% (Carabias *et al.* 2012). Gracias a esto, aún existen importantes manchones de vegetación original, distribuidos de manera fragmentada, los cuales se deben conservar ante las amenazas de su destrucción (Carabias *et al.*2008).

Dentro de las acciones que se han realizado para conservar la selva en esta zona, debido a la gran diversidad de lepidópteros ahí encontrados, en 1996 se estableció un proyecto ejidal de cultivo extensivo y comercialización de las mariposas en los ejidos de Chajul, Playón de la Gloria y El Pirú (J. de la Maza, com. pers), el cual por diferentes motivos finalizó en 2001. En 2008 y 2009 estos ejidos se incorporaron al programa de pago por servicios ambientales por biodiversidad (PSA-B) (Carabias *et al.*2008). Aunado a este programa, actualmente en Playón de la Gloria se desarrolló un proyecto de UMA (Unidad de manejo para la conservación de la vida silvestre) extensiva de mariposas en el área que se encuentra registrada en el PSA-B (254 hectáreas), lo que representa el 19% de la superficie total del ejido y corresponde al 38% de la cobertura forestal remanente del mismo. El desarrollo de esta UMA creó una oportunidad para los ejidatarios que aún tienen terrenos con selva conservada para obtener beneficios de su aprovechamiento, manejo y conservación, ya que proporciona empleos e ingresos generados gracias a un exhibidor turístico de mariposas y un taller de artesanías hechas con las alas de mariposas muertas. Estos ingresos han ayudado a frenar la deforestación de los terrenos

conservados por los ejidatarios ya que ofrece una alternativa para ellos, distinta a las actividades agropecuarias que implican el cambio de uso de suelo (Natura y Ecosistemas Mexicanos, 2014).

En 2009, durante los muestreos realizados para establecer el programa de manejo de la UMA, no se obtuvo registro de algunas especies de mariposas con importancia comercial o ecológica y algunas especies que pueden considerarse endémicas, las especies de los géneros *Battus*, *Morpho* y *Parides*, que se habían encontrado en los muestreos realizados anteriormente entre 1979 y 2000. El hecho de que el registro de estas especies se haya modificado, se debe posiblemente a la ampliación de la frontera agropecuaria, la cual ha afectado los hábitat tan específicos que éstas necesitan para completar sus ciclos de vida, como son las orillas de los ríos y las partes altas de algunas lomas (de la Maza y de la Maza, 1993). La conservación de estos tipos de hábitat es necesaria para mantener la biodiversidad de mariposas. Una alternativa es iniciar la restauración ecológica de su hábitat reintroduciendo las especies de plantas de las que se alimentan en su estado larvario. Para los géneros *Battus* y *Parides*, sus plantas hospederas son clave para la alimentación de estas mariposas en estado larvario. Las especies hospederas son varias especies de lianas del género *Aristolochia*, mientras que para el género de mariposas *Morpho*, una de sus plantas de alimentación son lianas del género *Mucuna*. Las lianas son parte fundamental de la estructura y función de los bosques tropicales. Además estas especies (*Aristolochia* y *Mucuna*) tienen importancia económica y cultural, características que son fundamentales para su aplicación en proyectos de restauración ecológica.

La forma más común de propagar a las especies vegetales que se integran a estos proyectos de restauración ecológica, es por semilla, ya sea inicialmente en un vivero o bien, la siembra directa en campo. La propagación de las plantas en vivero tiene varias ventajas, la principal es que se

puede brindar a las semillas y a las plántulas los cuidados suficientes para que se trasplanten al campo individuos de una talla adecuada, para incrementar las posibilidades de supervivencia de las plántulas. Mientras que la siembra directa permite la aclimatización de la semilla y la de la plántula desde etapas tempranas, sin embargo, reduce la probabilidad de éxito de los nuevos individuos, debido a la depredación, las variaciones climáticas y otros factores inherentes al sitio, que cambian en el espacio y en el tiempo (A. Orozco-Segovia, com. pers).

Ya que la información que se tiene sobre las especies de alimentación de mariposas es muy limitada, en este trabajo nos proponemos generar información básica sobre la propagación de *Mucuna argyrophylla*, *Aristolochia grandiflora* y *A. máxima* y sobre su posible manejo en proyectos de restauración ecológica.

ANTECEDENTES

Plantas de alimentación de mariposas importantes para la zona

Además de su importancia para la alimentación de mariposas, las plantas de los géneros *Aristolochia* y *Mucuna* tienen importancia económica y cultural, características que son fundamentales para su aplicación en proyectos de restauración (Tabla 1).

Tabla1. Importancia económica y cultural para las especies incluidas en este estudio (Información tomada de: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana 2009, Herbario CICY 2010, Bello *et al.*, 2006).

Género	Uso
<i>Aristolochia</i>	Se utiliza como planta medicinal, en el tratamiento para la picadura de alacrán y mordedura de serpientes venenosas; además tiene valor ornamental.
<i>Mucuna</i>	Este género tiene propiedades medicinales. Son plantas con fijación simbiótica de nitrógeno. Se utilizan para controlar malezas debido a su gran producción de follaje y también se utilizan como abono verde en los cultivos. La semilla se utiliza en artesanías. Colorante.

Las lianas, incluyendo las de los géneros de interés de este trabajo, son plantas trepadoras, herbáceas o leñosas que inician su desarrollo como plantas terrestres y dependen de otras especies para crecer en altura y alcanzar el dosel, en donde encuentran una mayor disponibilidad de luz, ya que a diferencia de los árboles, las lianas tienen relativamente poco apoyo estructural, por lo que pueden destinar más recursos a la reproducción, el desarrollo de follaje de dosel, el tallo y la elongación de las raíces (Schnitzer y Bongers, 2002). Las semillas de estas plantas germinan en el suelo (no son epífitas) y las plántulas pueden crecer de forma independiente hasta cierta altura, pero ya que no pueden sostenerse por sí mismas después de pasar esa altura, se apoyan en otro individuo. Para esto las lianas han desarrollado adaptaciones que les permiten anclarse a los

árboles con estructuras como ganchos, zarcillos y tallos volubles (Garrido-Pérez *et al.* 2012).

La lianas están distribuidas geográficamente de forma desigual, la mayoría de ellas se encuentra en los bosques tropicales, donde son más abundantes, más diversas y presentan mayor variedad de formas y tamaños que en los bosques templados (García, 2009). En el mundo existen por lo menos 97 familias y 9216 especies de plantas de hábitos trepadores: para la región de Chajul (Chiapas, México) se han descrito 128 especies de lianas (Ibarra-Manríquez y Martínez-Ramos, 2002; Solórzano *et al.*, 2002).

Se sabe muy poco sobre la ecología de estas plantas, muchos investigadores antes asumían que las lianas jugaban un papel limitado en la dinámica del ecosistema, pero actualmente se ha reconocido que las lianas tienen un papel importante en la ecología del bosque (Schnitzer y Bongers, 2002). Ecológicamente, las plantas trepadoras juegan un papel fundamental en la estructura, diversidad y funcionalidad de los bosques tropicales (Solórzano *et al.* 2002; INE. 2000). Las lianas contribuyen a los procesos de transpiración forestal y de secuestro de carbono y pueden ser un componente más dinámico que los árboles del dosel de las selvas tropicales (Jordao, 2009).

Como plantas de alimentación de larvas de mariposas, las lianas proveen varios beneficios a los lepidópteros, este tipo de plantas tiene una tendencia a ser muy tóxica, independientemente de la clase de compuestos químicos que contengan o de su filogenia, pero cuando las larvas comen este tipo de plantas, las toxinas se bioacumulan y adquieren cierta toxicidad que las defiende de depredadores. Las mariposas que crecen sobre lianas pudieron haber evolucionado junto con los

taxones de las plantas tóxicas, para que, además de alimentarse, utilicen los metabolitos secundarios que ofrecen las plantas para su propia protección (Beck y Fiedler, 2008). Un ejemplo bien documentado sobre esta relación entre plantas tóxicas y lepidópteros es el de *Urania fulgens* y *Omphalea oleifera* (Dirzo y Mota-Bravo, 1997). A pesar del papel y la importancia ecológica de las lianas, su uso en proyectos de restauración es limitado.

Disturbios, cambio de uso de suelo y fragmentación de los bosques tropicales

La selva se degrada cuando sus elementos se alteran o se pierden como resultado de una actividad humana. Cuando hay un cambio de uso de suelo para agricultura o ganadería, no solo se pierde la cubierta vegetal si no que éste se degrada o se afecta la calidad del agua. Si la alteración no es muy intensa, el desequilibrio puede ser transitorio y la selva puede recuperarse por sí sola (Meli y Carrasco-Carballido, 2011).

Alrededor de la mitad de la superficie terrestre libre de hielo se ha convertido o modificado sustancialmente por las actividades humanas en los últimos 10.000 años (Lambin *et al.*, 2003). En los trópicos, los disturbios antropogénicos forman un componente apreciable y creciente del medio ambiente, y la comprensión de la dinámica y la gestión sustentable de los bosques secundarios (en los que habitan estas lianas) es cada vez más importante en paisajes modificados por el hombre (Letcher y Chazdon, 2012). Estos cambios de uso de suelo propician la fragmentación del hábitat; la tasa de deforestación tropical excede 15×10^6 ha por año, que dejan una enorme fragmentación de los paisajes forestales, la cual está aumentando (Laurance *et al.*, 2001).

Todos estos disturbios ponen en riesgo la permanencia de los ecosistemas y las interacciones bióticas en éstos. En el caso del ejido Playón de la Gloria, se ha visto que muchas especies de mariposas se han afectado por la pérdida de la vegetación remanente que éstas necesitan para completar sus ciclos de vida, por lo que la conservación y restauración ecológica de sus hábitats es necesaria para su permanencia en los ecosistemas.

Restauración ecológica

La restauración ecológica es una actividad que tiene como propósito iniciar o acelerar la recuperación de la salud de un ecosistema dañado o degradado, lo que implica recuperar su integridad y sustentabilidad, llevándolo a un estado de referencia de la vegetación previamente encontrada en ese sitio (SER, 2004). La restauración abarca las relaciones entre naturaleza y la cultura e involucra a todos los sectores de la sociedad, por lo cual permite la participación de las comunidades indígenas marginales y otros pobladores locales (SER, 2013).

Existen dos grandes retos para la restauración ecológica, el primero es restaurar grandes áreas que estén divididas en varias zonas con distintas fuentes de disturbio, en intensidad y duración, por ejemplo, zonas utilizadas para la ganadería y la agricultura por tiempos prolongados o intermitentes. El segundo reto es mantener un balance entre la conservación de la biodiversidad y el bienestar humano (Gann y Lamb, 2006).

Los proyectos de restauración en los trópicos generalmente están limitados a la utilización de especies arbóreas, sin tomar en cuenta otras formas de vida, a pesar de que este tipo de proyectos asumen un aumento de la riqueza de especies con el fin de restaurar procesos ecológicos. Para poder utilizar otros grupos vegetales se requiere tener conocimiento de la ecofisiología de las

especies que componen el ecosistema en su conjunto, lo que a su vez permitiría dar a cada especie o grupo de especies un uso correcto en la restauración (García, 2009).

Los pocos datos que se tienen sobre el reclutamiento de formas de vida distintas a los árboles, en zonas que se están restaurando, refleja que solo hasta fechas muy recientes se está considerando a estas especies. Esta falta de conocimiento y práctica sobre formas de vida distintas a los árboles es muy evidente en los bosques tropicales, los cuales ofrecen grandes desafíos a la restauración, porque las tasas de deforestación son muy rápidas y aún existen muchos huecos de conocimiento que no permiten enfrentarnos a los efectos de la fragmentación (Tucker y Murphy, 1997) y en general de cualquier tipo de disturbio. Por esto, es preciso obtener información sobre cuál es la mejor técnica para la introducción de las lianas en proyectos de restauración y por ende conocer cuáles son las mejores condiciones de almacenamiento de las semillas, de germinación y establecimiento de plántulas. Estas son fases vulnerables para cualquier especie, por lo que es necesario tener esta información para contar con los propágulos suficientes de las distintas especies a introducir.

Almacenamiento de semillas

La longevidad de las semillas es una característica intrínseca de la especie, sin embargo su extensión puede verse limitada por el tipo de almacenamiento al cual fueron sometidas. Existen condiciones de almacenamiento óptimas en las que se expresa la mayor longevidad potencial de las especies. Ésta se reduce en la medida en que la condición de almacenamiento artificial se aleja de la condición óptima (condiciones subóptimas); como puede ser, dejar las semillas en bolsas de papel sobre una mesa, en frascos de vidrio, en áreas muy húmedas, etc. La longevidad potencial

es útil para resolver cuáles deben de ser las condiciones de almacenamiento de las especies cuyo germoplasma se debe de almacenar en condiciones artificiales para labores de conservación, restauración o simple experimentación (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997). Las condiciones óptimas implican contar con refrigeradores a -15°C , cuartos especiales para deshidratar las semillas en condiciones de humedad atmosférica específica, etc., lo que está lejos de la realidad de la mayoría de los mexicanos y muy especialmente en zonas rurales como Chajul.

Para entender el papel de las semillas en la dinámica de regeneración natural de las comunidades vegetales se debe evaluar la longevidad ecológica. Es decir la duración de la viabilidad cuando las semillas están expuestas a los factores ambientales de los sitios donde las especies crecen y sus semillas permanecen en el suelo como parte de un banco de semillas temporal o permanente (Thompson, 1987). El estudio de la longevidad ecológica tiene las mismas limitantes que de la longevidad potencial (longevidad en condiciones artificiales), por lo que para su estudio las semillas deben ser confinadas en recipientes que las aíslan de algún o algunos factores ambientales o de las interacciones con el ambiente (longevidad en condiciones seminaturales). Por último se puede estudiar la longevidad ecológica en semillas que se incorporan al banco del suelo siempre y cuando se conozca su edad las circunstancias ambientales por las que han pasado (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Almacenamiento de Mucuna y Aristolochia

De acuerdo con los Kew Royal Botanic Gardens, a nivel de género y especie se tienen muy pocos datos sobre las semillas de *Mucuna* y *Aristolochia*. Hasta el momento la información que se tiene sobre su germinación (tres y dos especies, respectivamente) y almacenamiento (siete y cuatro especies, respectivamente) es limitada, es decir incluye a muy pocas especies y algunos de

los datos tienen una interrogación, lo que significa duda sobre su veracidad. Para el género *Mucuna*, se sabe que sus semillas son ortodoxas (semillas con bajo contenido de humedad que se pueden deshidratar aún más y almacenarse a temperaturas menores a 0°C (Hong y Ellis 1996)). Como ocurre comúnmente con especies con cubierta seminal dura e impermeable, como las especies de este género. Por ello, para germinarlas se utilizan métodos pre-germinativos que rompen la cubierta impermeable, como diversos métodos de escarificación que se describirán posteriormente. En muchas especies de la familia Fabaceae, la cubierta seminal es impermeable, lo que impide la germinación al evitar la imbibición y la toma de oxígeno por el embrión (Navarro 2003), mientras que otras tienen una cubierta permeable como en el caso de algunos cultivares de *Phaseolus vulgaris* (Agbo *et al.* 1987) y *P.lunatus* (Korban *et al.* 1981). Algunas semillas de especies de la familia Fabaceae pueden permanecer en el suelo decenas de años sin germinar (Pérez, *et al.*, 2006); los porcentajes de germinación reportados para el género oscilan entre 80 y 100% (RGB Kew, 2012)

En cuanto al género *Aristolochia* también hay poca información; algunas especies tienen semillas ortodoxas y se pueden almacenar por largos periodos de tiempo. En *A. alvida* y *A. argentina* se tienen altos porcentajes de germinación (85 y 98%), respectivamente, sin pretratamiento alguno. Sin embargo para otras especies como *A. galatea* el porcentaje de germinación no supera el 10-20% de germinación (RGB Kew, 2012).

Germinación

La germinación de las semillas es un proceso biológico complejo y organizado, el cual va acompañado de muchos cambios celulares y metabólicos que están regulados por señales internas de la semilla; el proceso de la germinación comienza con la entrada de agua en su interior y termina con el alargamiento del eje embrionario (Bewley 1997, Zhang *et al.*, 2012). Existen varios factores fisiológicos y estructurales que pueden retrasar la germinación de las semillas como la inmadurez fisiológica, el nivel de humedad residual en las semillas maduras, la presencia de una cubierta seminal muy dura, el tamaño y la etapa de desarrollo del embrión, entre otros. Para que las semillas maduren se necesita de requerimientos ambientales específicos para comenzar la germinación (Vazquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1990), como la temperatura, que es un factor muy importante para realizar muchas actividades metabólicas en las plantas y es fundamental en la germinación de las semillas de cualquier especie (Simão, 2009). Además, la temperatura puede inducir o interrumpir la latencia de las semillas y en el proceso de germinación tiene distintos efectos dependiendo de si la temperatura es constante o alterna. En muchas especies, la germinación se reduce o no ocurre en temperaturas constantes (Fenner y Thompson, 2005).

Latencia

La latencia es un rasgo adaptativo que optimiza la distribución de la germinación a través del tiempo en una población de semillas (Bewley, 1997), sin embargo no todas las especies la presentan. Una vez que la semilla ha completado su desarrollo se inician los cambios que darán

lugar al establecimiento del reposo, si éste se continúa por la falta de algún factor externo necesario para la germinación, al reposo se le llama quiescencia, pero cuando el reposo de las semillas se da aun cuando todos los factores ambientales necesarios estén presentes (que la semilla se encuentre en un ambiente óptimo) al reposo se le denomina latencia (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997). Ésta puede ser primaria, es decir se presenta desde que la semilla se dispersa o bien es secundaria cuando es inducida por factores ambientales adversos después de la dispersión.

Métodos para romper la latencia

Las distintas técnicas para romper la latencia se han desarrollado y modificado a través del tiempo para mejorar la respuesta germinativa y hacerla más práctica y eficiente (Kimura y Islam, 2012). La efectividad de los tratamientos varía dependiendo del tipo y grado de latencia, el cual cambia entre las especies (Alcântara, *et al.*, 2001).

Para desarrollar trabajos de restauración es esencial investigar la fisiología de las semillas que se pueden utilizar en los proyectos y determinar cómo mejorar su respuesta germinativa. Por esto, a continuación se explican algunos tipos de latencia y los tratamientos que se utilizan para romperla.

a) Latencia física

Existen varios métodos recomendados para romper la latencia causada por la impermeabilidad de la cubierta seminal y con esto eliminar las limitaciones mecánicas del tegumento para la entrada de agua. Algunos métodos son: la inmersión en agua caliente, alcohol y acetona, la escarificación

química con ácido sulfúrico, la congelación, la exposición a altas temperaturas y la escarificación mecánica (Tabla 2) (Magalhães, 2006).

Es importante diferenciar la latencia física (impedimento para la entrada de agua) de las restricciones impuestas a un embrión poco vigoroso por una cubierta dura, aunque ésta sea permeable. Esta latencia normalmente la superan los embriones con la maduración y el consecuente incremento de vigor de los mismos (Baskin y Baskin 2001). En la literatura encontramos que en muchas ocasiones no se determina cuáles son las características de permeabilidad de la semilla y se tratan a ambos casos como lo mismo, olvidando que una semilla puede tener latencia física aún cuando su cubierta seminal sea relativamente delgada y suave, por ejemplo, en *Dodonaea.viscosa* (A. Orozco-Segovia, com. pers). En algunas especies después de la cosecha puede presentarse latencia física debido a que, con la desecación la testa termina de diferenciarse o bien el embrión no puede tomar agua debido al endurecimiento del endospermo, aunque en este caso el endurecimiento de alguna estructura externa al embrión, como el endospermo, somete al embrión a estrés osmótico (Liptay y Schopfer, 1983).

El revestimiento impermeable al agua es común en las semillas de las familias Cannaceae, Chenopodiaceae, Convallariaceae, Poaceae, Malvaceae, Solanaceae, Rhamanaceae, Anarcadiaceae y Fabaceae. En esta última familia la latencia física se presenta en al menos el 85% de las especies, lo que implica que antes de cualquier prueba de germinación hay que documentar correctamente la presencia de latencia física, lo mismo es válido para las especies de otras familias (Magalhães, 2006).

Tabla 2. Métodos de escarificación y sus resultados en distintas especies (información tomada de Philip,1978 y Magalhães,2006).

Tipo de escarificación	Resultados
Con ácido sulfúrico	Es considerablemente exitoso en muchas especies. Incluso, especies como <i>Lupinus cosentini</i> se vuelven permeables después de 4 a 7 horas de remojo en ácido sulfúrico concentrado. En una investigación llevada a cabo con semillas de <i>Mucuna preta</i> , las pusieron en ácido durante 5 minutos, alcanzando el 95,8% germinación.
Con alcohol y otros disolventes orgánicos	El alcohol reblandece la cubierta dura de las semillas de <i>Nelumbo lutea</i> y algunas Caesalpinioideae se hicieron completamente permeables; mientras que las de Mimosoideae y Papilionoideae fueron dañadas o sólo mostraron un ligero incremento en la permeabilidad con la aplicación de alcohol etílico.
Mecánica	Puede ocasionar lesión en la semilla, disminuyendo el vigor y la viabilidad, pero en algunos casos se presenta germinación de 80% o más.
Exposición a altas temperaturas	Tanto el agua hirviendo como el calor seco se han utilizado con éxito. El calentamiento en seco moderado (~ 41 °C) durante cinco días aumentó notablemente la germinación de <i>Medicago sp.</i> Mientras que en la fabácea <i>Lupinus varius</i> , la inmersión en agua en el rango 70-80° C indujo la germinación.
Congelación	La congelación y descongelación redujo la impermeabilidad de las semillas de <i>Medicago sp.</i> El uso de aire líquido (- 190 °C), nitrógeno líquido (- 195 °C), y oxígeno líquido (- 185 °C) han sido utilizados satisfactoriamente para reducir la cubierta impermeable en varias especies de leguminosas.

b) Latencia fisiológica

La latencia fisiológica es un tipo de latencia endógena o innata, en donde la presencia de inhibidores químicos de la germinación en el embrión o la inmadurez de éste son las causas principales de que este tipo de latencia ocurra, la cual se presenta desde que el embrión cesa de crecer y continúa hasta que el impedimento endógeno cesa (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

En los últimos 30 años, la latencia ha sido muy estudiada, en especial para acelerar su ruptura. Las hormonas, como el ácido giberélico (GA₃), se han aplicado en varios de estos estudios (Keshtkar *et al.*, 2008a). Por lo general, las giberelinas estimulan la germinación de las semillas

con latencia fisiológica poco profunda e intermedia, pero no rompe la latencia fisiológica profunda de las semillas intactas. En algunas especies las giberelinas estimulan el crecimiento de los embriones extirpados de semillas con latencia profunda. En lugar del ácido giberélico también se puede aplicar en semillas con latencia fisiológica la estratificación fría, es decir incubar a las semillas, durante un periodo determinado, a temperaturas cercanas a 5°C y después germinarlas en temperaturas relativamente más altas (Baskin y Baskin, 2001).

Entre otros métodos, el humo producido durante los incendios es reconocido como un factor clave para la germinación de las especies dependientes de fuego, así como para especies que no dependen de él. El humo y los diferentes compuestos químicos que éste contiene tienen un gran potencial de uso en la horticultura, agricultura, la conservación y la restauración (Gamboa de Buen *et al.*, 2008). Recientemente, se han evaluado sus propiedades, por la capacidad que tiene para sacar a las semillas de la latencia e impulsar la germinación (Kulkarni, *et al.*, 2007). Incluso comercialmente se vende discos de papel filtro impregnado de humo, para usarse como sustrato para la germinación y a la vez como inductores de ésta; estos discos se producen comercialmente en Sudáfrica y Australia (<http://www.florabank.org>; Flematti, *et al.*, 2012). Los estimulantes químicos del humo son estables al calor, volátiles, solubles en agua, pueden ser absorbidos por muchos tipos de materiales, como papel, agar, tierra, etc. y pueden almacenarse por mucho tiempo (Smith, 2006).

c) Latencia morfológica.

Se presenta en especies en las que el desarrollo del embrión no culmina en el momento en que las semillas se separan de la planta madre. En este momento, o no han terminado su crecimiento, o bien no han completado su diferenciación. Este tipo de latencia es muy difícil de romper, ya que,

si bien las temperaturas altas incrementan la velocidad de crecimiento del embrión, la diferenciación, por lo general, requiere de períodos de tiempo más o menos largos para que ésta se complete (Baskin y Baskin, 2004; 2007). Además del pre tratamiento de incubar a las semillas a altas temperaturas (~30-40 °C), después exponerlas a temperaturas frías (~5 °C) y por último germinarlas a temperaturas medias (25 °C) (Alves-Da-Silva *et al.* 2009).

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los requerimientos de germinación de plantas de alimentación (*Mucuna argyrophylla*, *Aristolochia grandiflora* y *A. maxima*) de algunas mariposas amenazadas o raras con importancia económica en el municipio Marqués de Comillas, Chiapas.

Objetivos particulares

- Determinar los requerimientos de germinación e identificar el tipo de latencia en *Mucuna argyrophylla*, *Aristolochia grandiflora* y *A. maxima*.
- Sembrar en vivero semillas con pretratamientos germinativos y evaluar la emergencia y la supervivencia temprana de las plántulas.
- Hacer un perfil edafológico y análisis ecológico del suelo de los lugares donde crecen *Aristolochia grandiflora*, *Aristolochia máxima*, y *Mucuna argyrophylla*, especies alimenticias para mariposas.
- Trasplantar a campo las plántulas de *Aristolochia grandiflora*, y *Mucuna argyrophylla* y evaluar su sobrevivencia.

METODOLOGÍA GENERAL

Especies estudiadas

***Aristolochia grandiflora* (Aristolochiaceae)**

Es una planta trepadora de hojas simples, alternas, cordiformes, con flores de color blanco amarillas, con partes de color lila hacia el ápice, florece de abril a mayo (Ibarra-Manríquez y Sinaca, 1995).

Las semillas del género *Aristolochia* generalmente son aplanadas, algunas veces aladas y de tamaño pequeño o mediano, de forma angular; la cubierta seminal está formada por cinco capas celulares del óvulo. El endospermo celular es de pared gruesa, aceitosa y en algunos casos contiene almidón; tienen un embrión pequeño e indiferenciado, lo que es común entre las especies de la familia (Adams *et al.*, 2005). Las principales características de estas semillas son la unión de los tegumentos a lo largo del curso de la rafe y el desarrollo de dos capas de fibras cruzadas en el tegmen, que constituyen la capa mecánica de la cubierta de la semilla (Corner, 1976). Son de forma lisa o irregular, una característica interesante de muchas especies es que tienen un funículo grande y grueso, que se aplanan contra la semilla y puede llegar a ser del mismo tamaño o más grande que la misma; las células del funículo típicamente se convierten en lignificadas reticulares y se engrosan en la madurez (Corner, 1976; Werker, 1997).

***Mucuna argyrophylla* (Fabaceae)**

Es una liana de hojas compuestas, alternas, trifolioladas, foliolos con el envés verde gris, flor verde amarilla. En Los Tuxtlas, Veracruz florece de septiembre a octubre y fructifica de marzo a

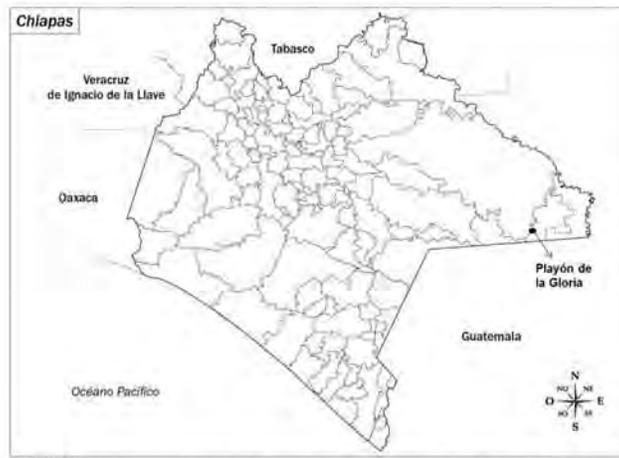
abril. Su distribución en México abarca los estados de Chiapas y Oaxaca (Ibarra-Manríquez y Sinaca, 1995).

Las semillas del género *Mucuna* son generalmente de color negro. Las semillas de *M. argyrophylla* tienen un diámetro aproximado de 2 a 3 cm y un espesor de 0.8 cm, de forma discoide, el hilo se encuentra alrededor de la periferia de la semilla (Woodson y Scherry, 1980).

Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en la UMA del ejido Playón de la Gloria (Mapa. 1-2), en Marqués de Comillas (Mapa. 2) y en los fragmentos de selva de los ejidos colindantes. El municipio Marqués de Comillas se ubica en la zona fronteriza entre México y Guatemala y pertenece a la cuenca del río Usumacinta (de la Maza *et al.*, 2010).

Es uno de los 118 municipios del Estado de Chiapas y se ubica en las coordenadas 16°20'0" N, 92°46'0" W. El clima en Marqués de Comillas es similar al del resto de la Selva Lacandona: cálido con dos subcategorías siguiendo la clasificación de Köppen: Am(f) cálido húmedo y Aw0(w) cálido subhúmedo con lluvias en verano (INE. 2000). La ubicación geográfica de Playón de la Gloria resulta estratégica, ya que se encuentra en el área de influencia de la Reserva de la Biosfera Montes Azules, la cual sólo está separada por el río Lacantún; además, los manchones de selva remanentes funcionan como conectores entre la Reserva y los manchones naturales presentes en el ejido El Pirú (Carabias y Meli, 2008).



Mapa 1. Se Muestra la ubicación del ejido playón de la gloria en el estado de Chiapas. Tomado y modificado de <http://www.mapasmexico.mx/estados/chiapas.html>.



Mapa 2. Se Muestra la ubicación del municipio Marqués de Comillas y la zona cuadriculada representa el ejido Playón de la Gloria. Tomado de Carabias y Meli, 2008.

Recolecta de semillas

Se realizaron varias salidas a campo, en donde se recolectaron a partir de 4 o más individuos por especie, semillas de *Aristolochia grandiflora*, *A. máxima* y *Mucuna argyrophylla* en febrero, marzo, abril y/o julio del 2012.

Germinación

Germinación de semillas de A. grandiflora y A. máxima recolectadas en febrero de 2012

Prueba piloto

Se hizo una prueba piloto de germinación en 10 semillas de *A. grandiflora* recién recolectadas, a las que se les aplicó una prueba agronómica de germinación que consistió en remojarlas por 24 horas en agua previo a la siembra para facilitar la imbibición; posteriormente, las semillas se germinaron a 25°C en cámaras de germinación (Lab-Line Instruments, Melrose Park, IL, USA) equipadas con luz fluorescente, blanco frío (F20T12/CW, Sylvania, 20 W) y lámparas incandescentes (Solar, 25 W). Las semillas se sembraron en cajas Petri de plástico de 10 cm de diámetro, llenas con una capa de agar (1% en agua) de 0.50 cm.

Germinación de semillas de A. grandiflora y A. máxima recolectadas en marzo de 2012

Tratamientos en temperatura fluctuante

Las semillas de *A. máxima* y *A. grandiflora*, de las cuales se tenía una muestra muy pequeña (lo que indica la baja producción de semillas en este periodo), para montar las suficientes réplicas para los tratamientos, se pusieron a germinar semillas recién recolectadas solo a 25 y 25/35°C en un termoperiodo 18/6 h a las temperaturas indicadas y un fotoperiodo de 12/12 h luz/oscuridad. En donde la temperatura constante era el control. Para cada temperatura se colocaron 5 réplicas con 30 semillas cada una. Las semillas se sembraron en recipientes de plástico cerrado de 15 × 15 cm y 8 cm de altura, llenos con una capa de agar (1% en agua) de 2 cm. Las semillas en los otros

tratamientos o experimentos se sembraron de la misma manera, a menos que se indique lo contrario.

Germinación de semillas de A. grandiflora recolectadas en julio de 2012

Rompimiento de la latencia con giberelinas

Dada la baja capacidad germinativa de semillas recién colectadas de *Aristolochia grandiflora* se hizo un experimento con un diseño factorial: 2 temperaturas (25 y 25/35°C) × 3 concentraciones de giberelinas: (0, 500 y 250 ppm) × 4 réplicas, con 30 semillas por réplica

Rompimiento de la latencia con imbibición en agua de humo

Las semillas almacenadas durante tres meses se embebieron en agua de humo y se sembraron en cajas de Petri de 15 cm de diámetro con papel filtro mojado con agua de humo y se germinaron en 2 temperaturas 25 y 25/35°C; en cada temperatura se puso un control; cada tratamiento con 5 réplicas, cada una con 30 semillas. Para obtener el agua de humo se fabricó un artefacto con una olla vaporera de aluminio dentro de la cual se quemó hojarasca proveniente de la zona de estudio. A la olla se le colocó una manguera plástica de 1 pulgada, la cual sirvió para dirigir al humo hacia un matraz de 2 litros, en donde burbujeó hasta que se completó la ignición.

Tratamiento para romper la latencia con solventes

Dado el limitado número de semillas que teníamos, en semillas almacenadas durante 4 meses, se hizo un tratamiento exploratorio, con sólo con 3 réplicas de 10 semillas en cada temperatura. Las

semillas fueron pre-tratadas con acetona para intentar remover la cubierta lipídica que impide el paso del agua a la semilla durante 3 minutos y se incubaron, en cajas de Petri de 10 cm de diámetro sobre papel filtro húmedo, a 35°C durante una semana y después de este periodo fueron puestas a 25°C; otros dos grupos de semillas tratadas con acetona fueron puestas directamente en cámaras de germinación a 25° y a 25/35°C.

Rompimiento de la latencia debido a la dureza de los cotiledones

Se hizo un pre-tratamiento exploratorio en semillas almacenadas durante 4 meses, con H₂O₂ a 20 mM, en el cual las semillas se embebieron en la solución durante 24 horas y otro grupo durante 48 h. De igual modo, se aplicó un pre-tratamiento con H₂O₂ a 50 mM de. También se hizo un tratamiento en el que las semillas se pusieron a remojar en cloro durante 5 minutos para ablandar la cubierta seminal. Las semillas se incubaron a 25 y 25/35°C en cajas de Petri de 10 cm de diámetro sobre papel filtro húmedo.

Rompimiento de la latencia con concentraciones altas de giberelinas, incubación en agua de humo y estratificación caliente y fría

Se realizaron 4 tratamientos con semillas que fueron almacenadas durante 7 meses, tres de estos se pusieron en cámaras de germinación a 25 y 25-35° C, en cada temperatura y tratamiento se colocaron 4 réplicas de 30 semillas por tratamiento y un control para cada tratamiento y temperatura. Los distintos tratamientos puestos a 25 y 25-35°C fueron: a) Se utilizó un tratamiento de agua de humo, en donde las semillas se incubaron en esta solución. b) Para otro grupo de semillas, se hizo un pre-tratamiento con H₂O₂ a 50 µm, en el cual las semillas se

embebieron en la solución durante 24 h y después se incubaron sobre papel filtro. c) Las semillas fueron incubadas con 1500 ppm de GA₃. Finalmente para la estratificación caliente las semillas se incubaron a 35°C durante dos semanas y después las semillas de este tratamiento se pasaron a una temperatura de 15°C durante otras dos semanas, y finalmente se dejaron incubando en una temperatura constante de 25°C. Las semillas de estos tratamientos se sembraron en recipientes de plástico cerrado de 15 × 15 cm y 8 cm de altura, llenos con una capa de agar (1% en agua) de 2 cm, en el caso de las semillas tratadas con agua de humo el sustrato fue papel filtro.

Germinación de Mucuna argyrophylla recolectadas en febrero de 2012

Rompimiento de la latencia física con escarificación mecánica

Se pusieron 5 réplicas cada una con 20 semillas recién recolectadas. Las semillas se sembraron en cajas de plástico de 24 × 15 cm × 6 cm de altura y se llenaron con 2 cm de arena. Antes de sembrarlas cada semilla fue escarificada con un DREMEL (Multipro 3956-02, Mexico) provisto de una broca de joyería 0.8 mm de diámetro, con la cual se hizo un orificio en el extremo opuesto al micrópilo (región chalazal). También se escarificaron las semillas haciendo con la broca un orificio directo en el estrofiolo.

Germinación de Mucuna argyrophylla recolectadas en abril de 2012

Rompimiento de la latencia física con agua caliente

En vasos de precipitados de 2 L conteniendo 500, 1000 y 1500 mL de agua hirviendo se sumergieron 100 semillas recién recolectadas en cada vaso hasta que el agua regresó a temperatura ambiente. Se hicieron 5 réplicas de 20 semillas y también se sembraron semillas control (sin tratamiento).

Rompimiento de la latencia física con enterramiento en campo (acondicionamiento natural)

Se enterraron a las semillas al inicio de la época lluviosa durante dos semanas y se desenterraron y se secaron en condiciones de laboratorio durante una semana y finalmente se sembraron a 25°C.

Perfil edafológico del suelo

La descripción e interpretación del perfil de suelo en donde se encuentran las plantas, se hizo siguiendo la metodología presentada por Siebe. *et al.* (2006) en el “Manual para la descripción y evaluación ecológica de suelos en el campo”.

Germinación en campo de ambas especies *Mucuna argyrophylla* y *Aristolochia grandiflora* recolectadas en julio de 2012

Para cada especie se utilizó el tratamiento que en laboratorio produjo mejores resultados. En campo se sembraron 300 semillas de cada especie, las de *A. grandiflora* se pre-embebieron en una solución de 1500 ppm de giberelinas y las 900 de *Mucuna argyrophylla* se pre-escarificaron

antes de la siembra en la región chalazal. Las semillas se sembraron en charolas de plástico de 20 × 30 cm, bajo una malla sombra.

Plantación en campo de *Mucuna argyrophylla*

De las semillas germinadas en la casa de sombra se sembraron 300 plántulas de *Mucuna argyrophylla* en tres ambientes distintos (100 plántulas por sitio), en la selva cerrada, en un acahual y en la ribera del río Lacantún (Fig. 1). En la selva cerrada (Fig. 1 A) los individuos se plantaron junto a árboles con un diámetro mayor a 6 centímetros y un espacio promedio entre ellas de 1 metro, mientras que en el acahual (Fig. 1 B) las plantas fueron colocadas en 10 hileras de 10 metros con un metro de distancia entre cada planta. En la ribera del río (Fig. 1 C) las plántulas fueron sembradas en una línea de 100 metros con un metro de distancia entre plantas. En estos dos últimos lugares fueron plantas al lado de diversas especies que midieran más de 1.5 m de alto, para que las lianas las utilizaran de soporte.

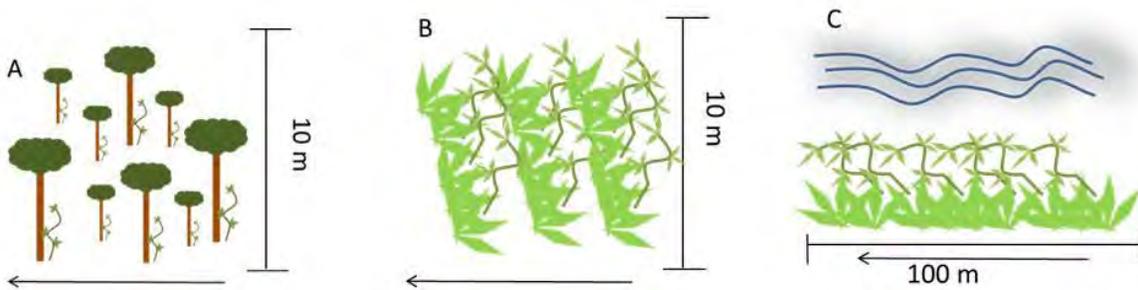


Fig. 1. Esquemas de la plantación en campo en: A: la selva cerrada, B: en un acahual y C: en la ribera del río Lacantún.

Histología de las semillas de *Aristolochia grandiflora*

Preparación del material

Para describir la estructura de la semilla de *Aristolochia grandiflora* y definir si el embrión es indiferenciado (como lo han reportado en la literatura), se realizaron cortes histológicos tangenciales en las semillas, siguiendo la metodología de López-Curto *et al.* (2005). Primero se realizó una técnica de fijación y deshidratación, en la cual un grupo de semillas previamente escarificado (para que la semilla se embebiera) fue hidratado durante 24 horas en agua y después se colocaron en FAA (formol:alcohol:ácido glaciál acético, 1:1:1) durante 120 horas (5 días); al quinto día se empezaron a deshidratar en soluciones acuosas con diferentes porcentajes de alcohol: 1 hora al 30%, 1 hora al 50%, y alcohol al 70% por 5 días. Se continuaron deshidratando en alcohol al 85% durante 1 hora, al 96% 1 hora y al 100% 3 horas, luego se pasaron a una mezcla de alcohol absoluto-xilol 1:1 durante 30 minutos y después en alcohol absoluto-xilol (1:2) otros 30 minutos y finalmente en xilol puro durante 30 minutos. Después se realizó la técnica de inclusión en parafina, en donde el material deshidratado se pasó a una mezcla de xilol-paraplast 1:1 a 56 °C durante 48 horas y posteriormente en paraplast puro durante 2 días. Una vez terminado este proceso se realizó la inclusión en bloques; para lo cual, se colocaron unos cubos metálicos sobre un vidrio de 10 por 20 cm, los cuales se llenaron con parafina líquida y una vez que se empezó a solidificar la parafina, se colocó la semilla en el fondo del cubo, evitando la formación de burbujas y orientando a las semillas con la ayuda de una aguja de disección. Ya que la parafina está sólida, se separa de los cubos, se le añade a cada cubo un palo de madera para sostenerlo y se cortan las muestras en el micrótopo.

Tinción y pruebas histoquímicas

Los cortes se hicieron de 10-13 μm de grosor y se tiñeron en safranina-verde rápido, después estos cortes se observaron con microscopía óptica y algunos de ellos se utilizaron en pruebas histoquímicas: Lugol (almidón), rojo "O" de aceite (para reservas lipídicas, cutina y suberina), ácido peryodico- reactivo de Schiff (APS) (para polisacáridos insolubles), azul negro de naftol-APS (para proteínas- polisacáridos insolubles).

Fotomicrografía

Se tomaron fotografías de las preparaciones de los cortes con una técnica de fotomicrografía en microscopía de campo claro, en un fotomicroscopio (Provis AX-70; Olympus, Tokio, Japón) del laboratorio de microcin de la facultad de ciencias de la UNAM.

Análisis estadísticos

Se hicieron los análisis estadísticos para el inicio de la germinación (lag time), velocidad y porcentaje final de germinación en cada tratamiento. La velocidad y el inicio de la germinación se obtuvieron de los ajustes que se hicieron al curso de la germinación de cada réplica. Para ajustar los datos a modelos sigmoide o exponencial sigmoide, los porcentajes fueron transformados a arcosenos. Los ajustes se hicieron con el programa TableCurve 2D. Finalmente

se realizó un análisis de varianza ANOVA en Statgraphics Centurion XV, para cada una de las variables indicadas. La velocidad de germinación fue la primera derivada máxima de cada curva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recolecta de semillas

Las semillas de *Aristolochia grandiflora* tuvieron un largo periodo de producción, a lo largo del cual solo fue posible recolectar muy pocas semillas, en la primera recolecta sólo se obtuvieron alrededor de 200 semillas, muchas de las cuales presentaban malformaciones. Las semillas de *A. máxima* interrumpieron su producción, después de febrero no fue posible encontrar individuos reproductivos. El color de estas semillas de *A. grandiflora* fue café ligeramente más claro que el observado al reinicio de la época producción, cosecha de julio, y posteriores, además fueron más delgadas. Sin embargo todas las semillas recolectadas estaban listas para ser dispersadas en el momento de la recolecta, lo que puede significar que habían completado las tres etapas del desarrollo de las semillas: histodiferenciación, extensión, maduración y secado (Kermode 1995). También se ha visto que en otras especies como *Buddleja cordata* se producen semillas con diferente capacidad germinativa, dependiendo de la disponibilidad de agua en el medio, lo que tiene que ver con la proximidad de la época lluviosa a la época de producción de semillas (Mendoza-Hernández *et al.*,2010).

En especial la temperatura pudo haber afectado las fases de expansión y de maduración y secado del desarrollo de la semilla, lo que tiene repercusión no sólo en el llenado de las semillas, sino también en la diferenciación de la cubierta seminal (Marbach y Mayer, 1974; Argel y Humphreys, 1983; Gutterman, 1992). Altas temperaturas tienen relación en especial con la

dureza de la o las cubiertas de la semilla (Orozco-Segovia *et al.*, 2000). Las diferencias en las temperaturas media y máxima promedio mensual pudieron tener consecuencias en los resultados obtenidos en cada época de recolecta, lo que podría explicar el decremento en la germinación de *A. grandiflora* entre la recolecta de febrero y marzo. En los datos climáticos promedio de ~30 años se observa que entre ambos meses hay un incremento importante de temperatura hacia marzo (SMN, 2014).

Germinación

Prueba piloto y tratamientos en temperatura fluctuante

En las semillas de *A. grandiflora* y *A. máxima* recolectadas al inicio de la producción de semillas (febrero de 2012), debido a la pequeña cantidad de semillas recolectadas, se hizo solo un trabajo exploratorio de su capacidad germinativa y se probó el efecto de la temperatura constante y fluctuante. Para la prueba piloto, las semillas se remojaron 24 horas en agua y después se sembraron, tal y como lo hacen los campesinos con semillas de especies que son de su interés, en cualquier parte de México, desde el maíz hasta alguna especie maderable, como la ceiba (*Ceiba aesculifolia*). Con esta prueba se obtuvo un 90% de germinación en ambas especies. En el municipio Marqués de Comillas, la época lluviosa se extiende de mayo a octubre (precipitación de 1400 a 2600 mm anuales, temperatura máxima promedio 30-34.5°C, temperatura mínima promedio 21-22°C), por lo que las semillas de *A. grandiflora* recolectadas de noviembre a abril (precipitación de 350 a 700 mm anuales, temperatura máxima promedio 27-30 °C, mínima promedia 18-19.5°C) fueron producidas durante la época con temperaturas más frescas y menor

precipitación, aunque con suficiente disponibilidad de humedad, tanto la remanente de la época lluviosa, como la de la temporada de recolección (Hernández-Pérez, 2011, SPDS, 2007).

Las semillas de un mes de edad (recolectadas en febrero de 2012) de *A. maxima* presentaron 89%, de germinación. Mientras que las semillas de *A. grandiflora* recolectadas en marzo solo germinaron en un 45%. En ambas especies no hubo diferencias significativas entre ambas temperaturas en el porcentaje, la velocidad, y el inicio de germinación ($P \leq 0.05$) (Fig.2; Fig.3).

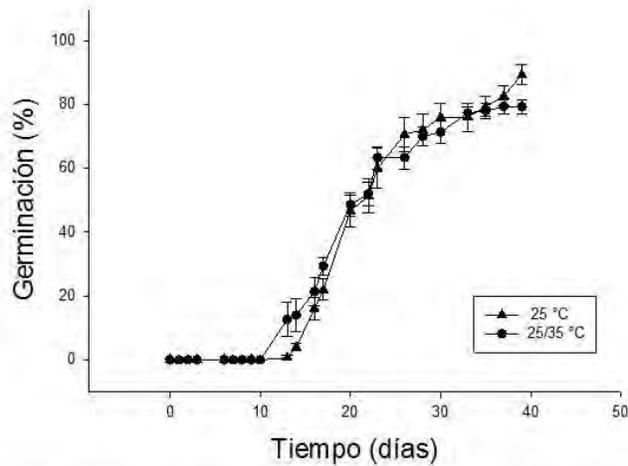


Fig. 2. Germinación de *Aristolochia máxima* en dos condiciones de temperatura (25 y 25/35 °C).

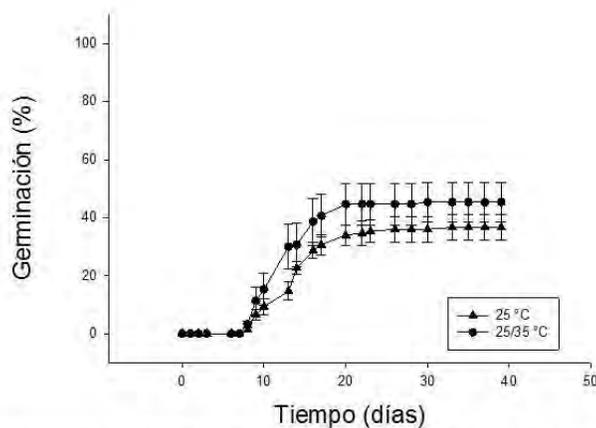


Fig. 3. Germinación de *Aristolochia grandiflora* en dos temperaturas (25 y 25/35 °C).

Las semillas de *A. máxima* continuaron teniendo alta capacidad germinativa un mes después de la recolecta sin diferencia estadística entre temperatura fluctuante y constante (Fig. 2). Las semillas de *A. grandiflora* recolectadas en marzo (temperatura ambiente máxima 34.3°C, temperatura promedio 31°C), a diferencia de las semillas, recolectadas el mes anterior (febrero, máxima mensual 29.9 °C, temperatura promedio 27.7 °C) tuvieron una germinación de 36% a temperatura constante y de 45% en temperatura fluctuante (SMN, 2014) (Fig. 3).

Rompimiento de la latencia con giberelinas

Se tuvo que hacer una nueva recolecta de semillas en julio dada la baja disponibilidad de semillas en los meses previos. En esta ocasión julio fue aparentemente el pico de la producción de semillas, por lo que se tuvo una mayor disponibilidad (aunque insuficiente) de semillas de *A. grandiflora*. La coloración de estas semillas fue café oscuro y las semillas tuvieron un mayor grosor. Considerando los tratamientos control, tanto a temperatura constante como a fluctuante, la germinación fue prácticamente 0 (2.5 y 0.83%. respectivamente; Fig. 4). En julio la temperatura promedio de la zona (31 °C) no difirió de la de marzo. Sin embargo, en la temperatura máxima mensual (32.4 °C) si hay una diferencia importante, marzo (34.3°C) fue un mes más caliente que julio, y febrero (29.9°C) continuó siendo el mes más fresco.

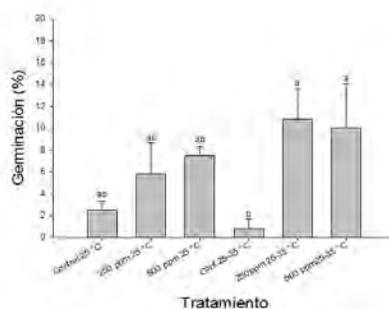


Fig. 4. Germinación de semillas de *A. grandiflora* a diferentes concentraciones de giberelinas (250 ppm y 500 ppm) a temperaturas constante y fluctuante (25 y 25/35 °C). Las columnas que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Inicialmente se asumió que podría haber una latencia fisiológica, por lo que se trató de romperla con giberelinas, en una concentración recomendable para especies tropicales (250 y 500 ppm; Orozco-Segovia *et al.*, 2007; Orozco-Segovia y Sánchez-Coronado, 2009, 2013). Las giberelinas indujeron un pobre incremento ($> 20\%$) en la germinación en ambas concentraciones y en ambos tratamientos de temperatura, estas diferencias fueron significativas ($F_{(5,23)} = 3.82$; $P = 0.015$). La germinación más alta se registró con la combinación de fluctuación de temperatura con ambas concentraciones de giberelinas por igual (10.83 y 10%, 250 y 500 ppm; respectivamente) (Fig. 4.), mientras que la germinación más baja se obtuvo en el control a temperatura fluctuante (0.83%).

Rompimiento de la latencia con imbibición en agua de humo

Un tratamiento alternativo para romper la latencia fisiológica es el uso del agua de humo (Brown y van Staden, 1997, Gamboa de Buen y Orozco-Segovia, 2008; Orozco-Segovia y Sánchez-Coronado, 2009). Con el lote de semillas de julio, almacenadas durante tres meses, se realizó un tratamiento de imbibición de las semillas en el agua de humo preparada con el humo producido por la ignición de la hojarasca recolectada en Chajul. El humo rompe la latencia en diversas

especies principalmente por su acción sobre la actividad enzimática y en la regulación de la actividad de varias hormonas (Keeley y Fotheringham 1997; Fotheringham y Keeley 2005). En *A. grandiflora* el efecto humo a 25 °C y a 25/35 °C, mostró que a temperatura constante mejoró significativamente la respuesta germinativa respecto al control (23%, y 15%, respectivamente) ($F_{(1,9)} = 5.65$; $P = 0.0448$), mientras que con el agua de humo a temperatura fluctuante se obtuvo un 15% de germinación en contraste con el control que a esta temperatura fue de 25%. (Fig. 5; Fig.6). En el momento en que se pudo realizar este experimento las semillas recolectadas en julio tenían tres meses de edad y es de llamar la atención la recuperación de la capacidad germinativa de las semillas control de esta especie en ambas temperaturas. Lamentablemente a la vez que las semillas recuperaron capacidad germinativa, hubo una amplia dispersión de la germinación tanto en el control como en el tratamiento de humo por lo que no hubieron diferencias significativas.

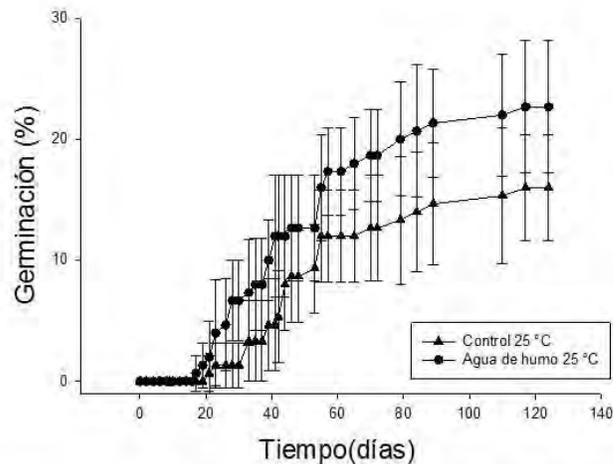


Fig.5. Germinación de semillas de *A. grandiflora* tratadas con agua de humo a temperatura constante.

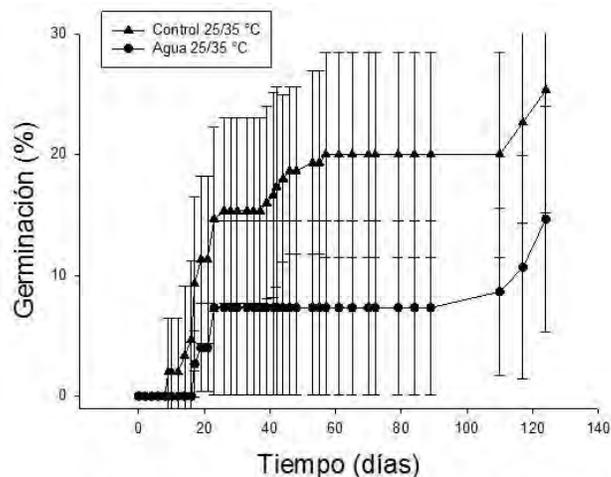


Fig. 6. Germinación de semillas de *A. grandiflora* tratadas con agua de humo a temperatura fluctuante.

Los tratamientos de agua de humo han sido efectivos en la mayoría de las semillas que requieren luz para germinar; los extractos de humo interactúan con las giberelinas, citocininas, el ácido abscísico y el etileno en semillas fotoblásticas (van Staden, *et al.*, 2000), además hacer agua de humo es un procedimiento barato y fácil de realizar en campo. Sin embargo, el bajo porcentaje de germinación obtenido con el agua de humo a temperatura fluctuante comparado con el control, puede deberse a que la interacción de dos factores pueden inhibir la germinación, mientras que de manera independiente la estimulan (Gong, *et al.* 2005). Por lo que se sugiere aplicar en campo este tipo de tratamientos en la sombra, donde la fluctuación de temperatura se reduce.

Tratamiento para romper la latencia con solventes y tratamiento para romper latencia debido a la dureza de los cotiledones

Considerando la baja germinación de la especie se remojaron en agua 10 semillas, las cuales no mostraron señales de haberse embebido (aumento de volumen o cambio en la apariencia o dureza del material) después de dos semanas por lo que se le quitó la mayor parte de la cubierta seminal, las capas que permanecieron fueron a partir de la cutícula del tegumento externo. Las semillas se

volvieron a remojar y se observó que las semillas no absorbieron agua después de este tratamiento y por lo tanto tampoco germinaron. Además se observó una gran cantidad de lípidos en la semilla. Las semillas de *A. grandiflora*, al igual que las de otras especies de esta familia (Corner, 1976), tienen una gran cantidad de lípidos saturados que pudieran impedir la toma de agua en las semillas, por lo que se hicieron tratamientos experimentales de inmersión en acetona para eliminar los lípidos, pero esto no incrementó la germinación. De la misma manera se trató de ablandar la cubierta seminal de las semillas con hipoclorito de sodio, ya que en la familia Aristolochiaceae ésta puede ser dura (Werker, 1997) y como en muchas especies se terminan de definir las características de la cubierta seminal después de la dispersión (Wulff, 1995). La posible dureza del endospermo se trató de romper con el uso de agua oxigenada (Barba- Espín *et al.*, 2002), sin embargo, no se encontraron resultados favorables, la germinación no ocurrió en ambos casos, a ninguna de las dos temperaturas. Cuando fueron tratadas las semillas con H₂O₂ en temperatura fluctuante las semillas germinaron de manera sincrónica; pero a temperatura constante la germinación fue más alta (43%). Mejores resultados a temperaturas constantes también se presentaron en el tratamiento de agua de humo. A pesar de la alta germinación en dos de los tratamientos con H₂O₂ a 25°C, no hubieron diferencias significativas en el porcentaje de germinación con el control (Tabla 3). En este análisis la temperatura tuvo un efecto significativo ($F_{(1, 41)} = 7.05$; $P = 0.0129$), los tratamientos ($F_{(6, 41)} = 12.80$; $P = 0.0001$) y la interacción entre los dos factores no lo fueron ($F_{(6, 41)} = 0.84$; $P = 0.55$). De aquí concluimos que ninguno de los tratamientos fue eficiente para romper la latencia. Lo más interesante fue el incremento en el porcentaje de germinación del control, con respecto a las semillas recién recolectadas de julio. También nos propusimos determinar si algún porcentaje de la población de semillas pudiera tener

un embrión indiferenciado. Para esto se aplicó un tratamiento de estratificación caliente a 35°C, para transferirlas posteriormente a 25°C (Baskin y Baskin, 2004), pero con este procedimiento no se obtuvo germinación alguna (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de germinación bajo diferentes pruebas de germinación *de A. grandiflora*. Letras distintas en los superíndices indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Tratamiento para romper la latencia secundaria		
Temperatura	Tratamiento	Germinación
25 °C	Control	26.67 (± 8.81) ^a
	H2O2 20 mM 24h	30 (± 11.54) ^a
	H2O2 20 mM 48h	43.33 (± 13.33) ^a
	H2O2 50 mM 24h	30 (± 0) ^a
	H2O2 50 mM 48h	43.33 (± 20.27) ^a
	Acetona	0 ^c
	Hipoclorito de sodio	0 ^c
25/35 °C	Control	13.33 (± 8.81) ^{ab}
	H2O2 20 mM 24h	23.33 (± 3.33) ^{ab}
	H2O2 20 mM 48h	16.67 (± 6.66) ^{ab}
	H2O2 50 mM 24h	20 (± 5.77) ^{ab}
	H2O2 50 mM 48h	16.67 (± 3.33) ^{ab}
	Acetona	0 ^c
	Hipoclorito de sodio	0 ^c
35 °C	Incubación 35°C	0

Rompimiento de la latencia con concentraciones altas de giberelinas, incubación en agua de humo y estratificación caliente y fría

Con semillas recolectadas en julio (7 meses de edad) se volvió a tratar a las semillas con agua de humo, solo que en este caso no se remojaron previamente en el agua de humo, se embebieron en éste durante la germinación (Fig. 7 A y B). También se usó un pretratamiento de imbibición de

las semillas en H₂O₂ 50 mM durante 24 horas (Fig. 7 B y E). Además, ya que en los tratamientos anteriores realizados con giberelinas a 250 ppm y 500 ppm no se incrementó significativamente la germinación, también se volvió a germinar las semillas ahora con 1500 ppm (Fig. 7 C y F). Esta decisión se tomó debido a que en un estudio realizado con semillas de una leguminosa tropical (*Astragalus cyclophyllon*) se observó que las giberelinas en bajas concentraciones no indujeron la germinación por el profundo grado de latencia, pero la germinación se incrementó utilizando concentraciones más altas de giberelinas (Keshtkar, *et al.*, 2008a). De igual manera se aplicó estratificación caliente-fría para promover el crecimiento de un embrión inmaduro y romper la latencia fisiológica (Fig. 9). En este momento las semillas tenían 7 meses de edad después de la recolecta (julio).

Los resultados mostraron que la temperatura tuvo un efecto significativo ($F_{(1, 39)} = 52.04$; $P = 0.0001$) al igual que los tratamientos ($F_{(4,39)} = 10.49$; $P = 0.0001$), y que la interacción entre estos dos factores ($F_{(4,39)} = 7.81$; $P = 0.0002$). La respuesta a la temperatura concuerda con los resultados obtenidos por García (2009), en donde las semillas de *A. galeata* germinaron más a temperatura fluctuante (25-35°C) que a temperatura constante (25°C). En otra investigación sobre la germinación de *Aristolochia galeata*, realizada por Alves-Da-Silva *et al.* (2009), se encontró que las semillas de esta especie mostraron altos porcentajes de germinación en tratamientos con nitratos a 30°C y a temperatura fluctuante (27-20°C). Los requerimientos de luz y los efectos estimulantes de los nitratos en la germinación sugieren que el establecimiento inicial de *A. galeata* se favorece en sitios en donde se encuentran estas señales ambientales como ocurre en algunos claros de la selva o en tierras con algún tipo de disturbio reciente. *A. grandiflora* no requirió luz para germinar, por lo que solo la fluctuación de temperatura sería la señal para esta

especie de que se encuentra en un sitio abierto, como en los que crece. En tratamientos que se muestran en páginas anteriores la germinación fue más favorable a temperatura constante. Quizá con el envejecimiento se modifican los requerimientos germinativos de esta especie, como ocurre en otras especies (Bouwmeester *et al.*, 1992).

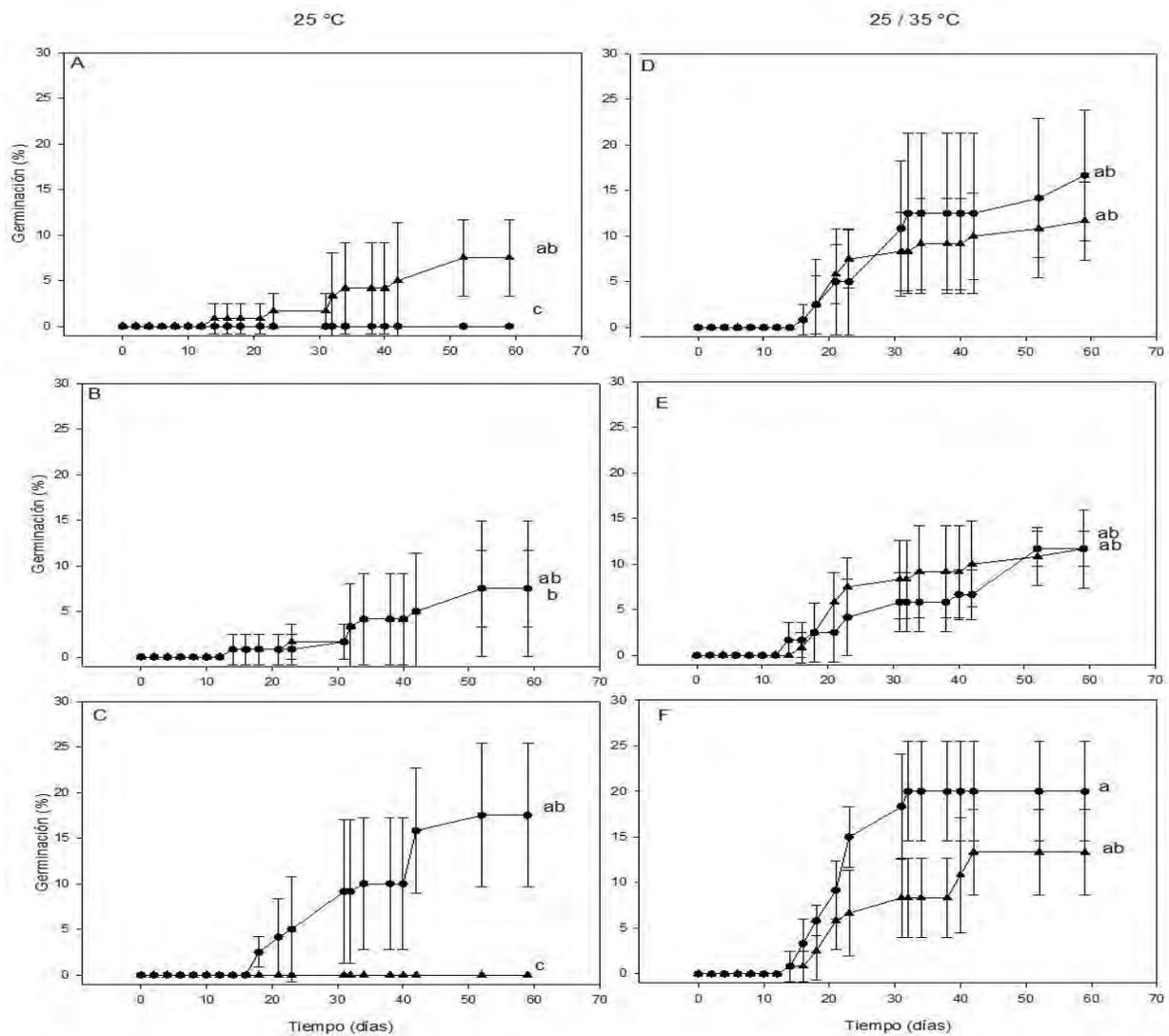


Fig. 7. Germinación de semillas de *A. grandiflora* con distintos tratamientos. Las semillas fueron germinadas en la temperatura indicada en la parte superior de cada columna: A y D: Semillas tratadas con agua de humo, B y E: semillas tratadas con H₂O₂ 50 mM, C y F: semillas tratadas con 1500 ppm de giberelinas. Control(▲), semillas tratadas(●). Las letras indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

En general a 25°C la germinación fue muy baja < 7%, y en menor grado con giberelinas (18%). Como se observa en la Figura 7, el mejor tratamiento fue aplicar giberelinas en concentraciones altas (1500 ppm) tanto a temperatura fluctuante (20%), sin embargo, no tuvo diferencia significativa con el resultado obtenido en temperatura constante (18%), la inducción de la germinación con una concentración alta de giberelinas indica la presencia de una latencia fisiológica profunda, como en *Astragalus cyclophyllon* (Keshtkar, *et al.*, 2008b). Sin embargo, solo germinó una quinta parte de la población. El porcentaje de germinación fue similar al obtenido con agua de humo a 25/35°C (17%), con H₂O₂ a 25/35°C (12%), y con los controles a 25/35 °C y a 25 °C. La germinación no ocurrió en H₂O₂ a temperatura constante y en el control de giberelinas. Estos resultados solo dejan suponer que las giberelinas a temperatura fluctuante pueden ayudar a obtener una germinación más alta, pero no nos lleva a una conclusión contundente. La inmersión de semillas impermeables también podría promoverse con la inmersión de las semillas en H₂O₂ 50 mM, aunque esto podría resultar de hacerse en comunidades rurales, además de que los resultados no fueron contundentes. Por lo que en campo es preferible usar agua de humo, a temperatura constante. En los casos en que la temperatura fluctuante da mejores resultados (en semillas de mayor edad), el costo de este tratamiento es muy bajo y las temperaturas fluctuantes se pueden simular fácilmente en campo sacando los sustratos de germinación al sol y poniéndolos después en la sombra. La razón de la falta de diferencias significativas radica en gran medida en la gran heterogeneidad funcional en la población de semillas, en la que la mayoría tiene una latencia física, que se incrementó después del inicio de la producción de semillas (Fig. 8A) y se redujo en las recolectadas en julio (Fig. 8B). Esto ocurre en

otras especies con latencia física (Jayasuriya *et al.* 2008). La presencia de latencia física en esta especie es un registro que incluye por primera vez a una especie del orden Piperales (de angiospermas basales) entre los que tienen especies con latencia física (Baskin *et al.* 2000).

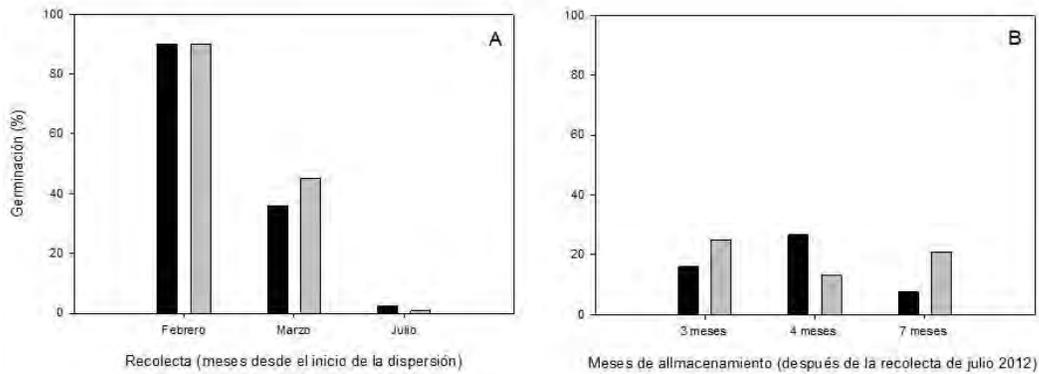


Fig. 8. Heterogeneidad funcional en la población de semillas. A: Porcentajes de germinación de las semillas recolectadas desde el inicio de la dispersión). B: Porcentajes de germinación después de meses de almacenamiento, colectadas en julio 2012. Temperatura constante 25 °C (color negro), temperatura fluctuante 25/35 °C (color gris).

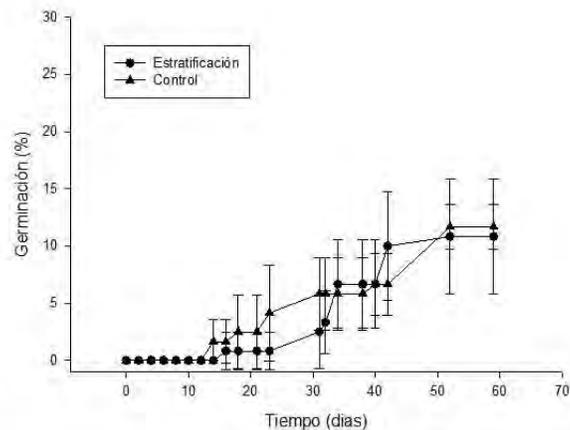


Fig. 9. Germinación de semillas de *A. grandiflora* tratadas con un proceso de estratificación caliente durante 2 semanas a 15°C, después a 35°C otras dos semanas y luego de este periodo fueron puestas a temperatura constante de 25°C.

Asumiendo que entre la familia Aristolochiaceae se ha reportado la presencia de especies con embriones indiferenciados (Corner 1979) se repitió el experimento de estratificación, en esta ocasión con una temperatura caliente que podría promover el crecimiento del embrión (Baskin y Baskin 2004) y una baja que rompería una posible latencia fisiológica. No se obtuvo un incremento de la germinación con este tratamiento. Además, el hecho de que las semillas de la primera recolecta (febrero) germinaran en un 90% también nos hizo sospechar la ausencia de latencia morfológica. Sin embargo el incremento de la germinación con el almacenamiento coincidía con lo reportado por Baskin y Baskin (2007) quienes proponen que la latencia morfológica se rompe luego de un tiempo prolongado de almacenamiento, después del cual las semillas terminan su desarrollo. Estos resultados contradictorios nos motivaron a hacer cortes histológicos de las semillas.

Rompimiento de la latencia física con escarificación mecánica de *Mucuna argyrophylla*

Ya que las semillas de *Mucuna argyrophylla* tienen una cubierta seminal muy dura e impermeable, y al hacer pruebas piloto de germinación con ellas tardaban más de dos meses en empezar a germinar en muy bajos porcentajes (~0), decidimos hacer un tratamiento de escarificación mecánica usando una broca puesta en un rectificador Dremel, con un orificio en la región chalazal, ya que es un procedimiento sencillo que se puede hacer en campo fácilmente. Con este tratamiento las semillas germinaron en un 60% (Fig.10.) Un rectificador cuesta entre \$850.00 y \$1099.00 y 10 brocas menos de \$70.00, dado que el equipo puede también ser usado en la elaboración de artesanías y en la construcción de muebles, etc. Adquirir este equipo es costeable.

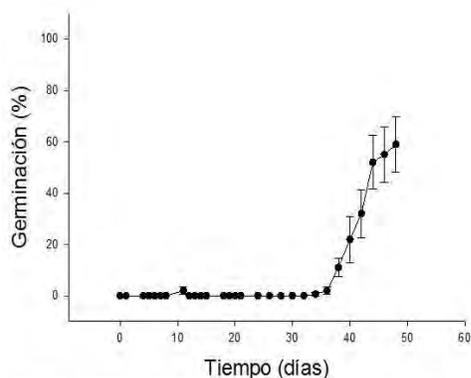


Fig. 10. Germinación de *Mucuna argyrophylla* a una temperatura de 25°C, después de haber sido escarificadas en la región chalazal con una broca de joyería.

Las semillas escarificadas en el estrofiolo (lugar donde se encuentra el water-gap en Fabaceae; Lersten, *et al.* 1992) con la broca de joyería prácticamente no germinaron (Fig. 11). Se debe verificar si se embebieron o no, ya que los porcentajes de germinación del control y las semillas tratadas con el orificio en el estrofiolo fueron iguales; se tiene poca experiencia en el uso de brocas para realizar la escarificación en esta zona de la semilla y probablemente el orificio fue muy superficial y no permitió el paso de agua al embrión o pudo haber sido demasiado profundo dañando las estructuras embrionarias. Verificar la imbibición o no de las semillas tratadas requería de una sierra de corte eléctrica, dada la dureza de las semillas, por lo que no se hizo.

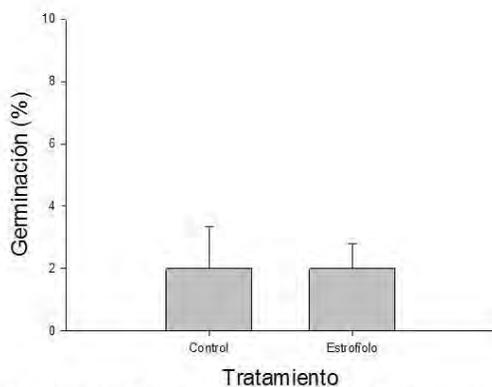


Fig. 11. Porcentaje de germinación de *Mucuna argyrophylla* con escarificación en el estrofiolo.

Las semillas de *M. argyrophylla* presentan una latencia física que impide el paso de agua al embrión, esto mismo se ha visto en semillas de *M. bracteata* en las que su cubierta seminal les confiere este tipo de latencia, la cual se tiene que romper mediante escarificación, lijando las semillas, hirviéndolas durante 20 minutos o removiendo completamente la cubierta seminal (Goh y Chiu, 2007). La escarificación mecánica es muy lenta y hervir a las semillas incluso por algunos minutos es riesgoso, dado que puede producir daños en los embriones, por ejemplo la producción de plantas albinas (A. Orozco-Segovia, com pers).

Dado que el agua es esencial para que ocurra la germinación, la ruptura de la latencia en la naturaleza es un evento crítico en la historia de la vida de las semillas con latencia física. Por ello, para asegurar la supervivencia de las especies cuyas semillas tienen latencia física, los mecanismos de ruptura de ésta deben de ser muy precisos en respuesta al medio ambiente, de tal manera que la germinación se produzca sólo cuando y donde las posibilidades del establecimiento de la planta se maximizan (Baskin, *et al.*, 2000), la función de detectar las condiciones adecuadas de germinación en este tipo de especies la tiene el estrofiolo (lentilla o water gap) (Baskin, 2003), estructura que se abre o se desprende al percibir fluctuaciones altas de temperatura o choques térmicos, como durante los incendios. La latencia física se considera perjudicial para el cultivo de semillas, ya que causa una germinación irregular, afectando el establecimiento del cultivo y generando desarrollo y maduración irregular de las plántulas (Magalhães, 2006).

Rompimiento de la latencia física con agua caliente y enterramiento en campo

Como se muestra en la Figura 12, los tratamientos de escarificación con agua caliente y de enterramiento de semillas no tuvieron éxito en la germinación de *M. argyrophylla* por lo que no

hubieron diferencias significativas ($P > 0.05$). Esto es común cuando las cubiertas seminales son demasiado gruesas o duras.

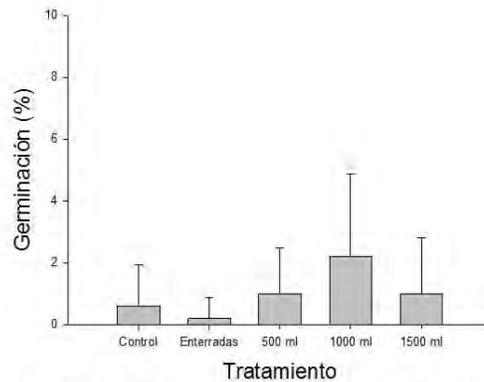


Fig. 12. Porcentaje de germinación de *Mucuna argyrophylla* en varios tratamientos de inmersión en agua hirviendo (se indica el volumen del agua hirviendo en donde se remojaron).

En el caso del enterramiento, probablemente se requiera de más tiempo en el suelo para ablandar la cubierta seminal y promover la acción de los microorganismos sobre ésta (Sánchez-Coronado et al. 2011) y así poder reblandecer la cubierta y en consecuencia eliminar la latencia. El mejor tratamiento fue escarificar (orificio hecho con una broca) en el lado opuesto a la región micropilar (la chalaza), ya que las semillas tratadas de esta forma tuvieron porcentajes de germinación más altos. Como vimos anteriormente, las semillas, tienen diferentes tipos de latencia y algunas pueden entrar y salir de un mismo tipo de latencia o adquirir otro. Un patrón cíclico de latencia similar se observa en semillas con latencia física, el cual distribuye la germinación de éstas a lo largo del tiempo. Las semillas con latencia física pueden tener un ciclo anual en el que de un estado de latencia física, pueden pasar a un estado no latente y saltar a una latencia fisiológica, no latencia y de nuevo latencia fisiológica (Jayasuriya, et al., 2008). En *M. argyrophylla* esto no se observó a lo largo de un año.

Para fines de proyectos de restauración ecológica, las semillas de *Mucuna argyrophylla* pueden ser almacenadas con cierta certidumbre de que van a conservar su viabilidad por más tiempo que las semillas de *A. grandiflora*, a pesar de que ambas tienen latencia física, lo cual representa una protección para el embrión, no conocemos el comportamiento de esta especie en el tiempo y la germinación se asegura germinando a las semillas recolectadas al inicio de la época de dispersión y germinándolas de manera inmediata. Las semillas de *M. argyrophylla*, además, se pueden germinar con cierta facilidad cuando la cubierta se rompe con escarificación mecánica y así obtener plántulas en un periodo de tiempo corto y en la temporada idónea para sembrarlas (Ver la Tabla 4 para comparar los porcentajes de germinación obtenidos en todos los tratamientos de las especies utilizadas en este estudio).

Tabla 4. Porcentajes de germinación de todos los experimentos realizados con *A. máxima*, *A. grandiflora*, y *M. argyrophylla*.

Especie	Fecha de recolecta	Sustrato	Experimento	Tratamiento	Temperatura	Germinación (%)	Edad		
<i>A. maxima</i>	febrero de 2012	Agar	Prueba piloto	24 h de remojo en agua	25 °C	90	Recien recolectadas		
			Tratamiento T° fluctuante	Control T° fluctuante	25 °C 25/35 °C	89.33 79.33	1 mes		
<i>A. grandiflora</i>	febrero de 2012	Agar	Prueba piloto	24 h de remojo en agua	25 °C	90	Recien recolectadas		
	marzo 2012	Agar	Tratamiento T° fluctuante	Control T° fluctuante	25 °C 25/35 °C	36.67 45.33			
	julio 2012	Agar	Rompimiento latencia con giberelinas	Control	25 °C	2.5	25/35 °C	Recien recolectadas	
				250 ppm		5.83			
				500 ppm		7.5			
				Control		0.83			
				250 ppm		10.83			
				500 ppm		10			
		Papel filtro	Rompimiento latencia con imbibición en agua de humo	Control	25 °C	16	25/35 °C	3 meses	
				Agua de humo		23			
				Control		25			
		Papel filtro	Tratamiento para romper la latencia con solventes y tratamiento para romper latencia debido a la dureza de los cotiledones	Control	25 °C	26.67	25/35 °C	4 meses	
				Acetona		-			
				H2O2 20 mM 24 h		30			
H2O2 20 mM 48 h	43.33								
H2O2 50 mM 24 h	30								
H2O2 50 mM 48 h	43.33								
Hipoclorito de sodio	-								
Control	25/35 °C			13.33		15/25/35 °C			-
Acetona				-					
H2O2 20 mM 24 h				23.33					
H2O2 20 mM 48 h				16.67					
H2O2 50 mM 24 h				20					
H2O2 50 mM 48 h		16.67							
Agar	Rompimiento de la latencia con concentraciones altas de giberelinas, incubación en agua de humo y estratificación caliente	Control	25 °C	7.5	25/35 °C	7 meses			
		Control giberelinas		-					
		1500 ppm GA		18					
		Agua de humo		-					
		H2O2 50 mM 24 h		7.5					
		Control		35/15/25 °C			12	-	
Control giberelinas	13								
1500 ppm GA	20								
Agua de humo	17								
<i>Mucuna argyrophylla</i>	febrero de 2012	Arena	Rompimiento de la latencia física con escarificación mecánica	Horificio region chalazal	25 °C	63	Recien recolectadas		
	abril de 2012		Rompimiento de la latencia física con agua caliente y enterramiento en campo	Control		2			
Control				2					
abril de 2012	Rompimiento de la latencia física con agua caliente y enterramiento en campo	Arena	Rompimiento de la latencia física con agua caliente y enterramiento en campo	Control	25 °C	0.6	Recien recolectadas		
				Enterradas		0.2			
				500 ml		1			
				1000 ml		2.2			
				1500 ml		1			

Descripción general del suelo

Con el propósito de conocer las características edáficas de los sitios donde crecen las plantas de interés para este estudio, se realizó una descripción del perfil de suelo en donde se encontraron las plantas (ver descripción completa en el Anexo I).

El suelo se clasificó como un Luvisol Mólico (Éútrico), el cual presentó un drenaje bueno y una profundidad fisiológica profunda (83 cm); la profundidad fisiológica señala el espesor del suelo en donde pueden penetrar y desarrollarse las raíces (Siebe *et al.*, 2006); además este suelo no mostró pedregosidad, así que las raíces pueden penetrar hasta el límite de la profundidad fisiológica, por lo que este tipo de suelo es propicio para el establecimiento de plántulas y crecimiento de sus raíces. Además, el suelo exhibió una mediana capacidad de aireación, y está bien drenado, lo cual, nos indica una vez más que no hay restricciones fisiológicas para el desarrollo y la penetrabilidad de raíces, la cual es de muy buena a buena en los primeros tres horizontes del suelo. La capacidad de retención de agua disponible para las plantas (dCC) es buena al igual que la capacidad total de retención de agua en el suelo a capacidad de campo (CC); la capacidad de intercambio catiónico (CIC) en los horizontes va de regular a mediana. La reserva de nitrógeno es mediana, mientras que la disponibilidad de este es baja (Anexo I).

Con los resultados de este perfil edafológico, se observó que estos suelos, son suelos muy benéficos para el crecimiento de las plantas, ya que son suelos muy profundos, en los cuales no hay restricciones fisiológicas para el desarrollo y la penetrabilidad de raíces y además es un suelo bien drenado, con agua disponible para el crecimiento de las plantas.

Estas características edafológicas, pueden facilitar los trabajos de restauración ecológica y beneficiarían el crecimiento de *Mucuna argyrophylla* y *Aristolochia grandiflora*, incluyendo

especies arbóreas que sirvan de soporte a este tipo de lianas y sean útiles para restaurar en conjunto las zonas ribereñas y acahualadas de la selva.

Germinación en campo

De las 900 semillas de *M. argyrophylla* plantadas en el vivero en mayo, germinó el 64% y para el mes de agosto de 2013 la supervivencia fue de 84%. De las 300 semillas de *A. grandiflora* solo germinó el 16% y para agosto sobrevivió el 43.7%.

Plantación en campo

Solo se trasplantó a campo a *M. argyrophylla*. A los dos meses de la siembra en campo, en la selva cerrada sobrevivió el 2% de los individuos plantados, en el acahual el 25% y en el río el 7%. Cabe destacar que dos semanas antes del muestreo el nivel del río subió, inundando la zona en la que se localizaban las plantas y las cubrió con aproximadamente metro y medio de agua. Se ha reportado que *Mucuna globulifera* en Costa Rica coloniza también áreas abiertas, soleadas o perturbadas, tales como las orillas de algunas lagunas y los márgenes de los bosques (de Moural *et al.*, 2013). Dado que las márgenes del río están deforestadas se esperaba una alta supervivencia, pero el río pudo haber arrastrado a las plántulas o haberlas cubierto con fango. La ampliación de la frontera agropecuaria puede influir en este tipo de sucesos, las plántulas se sembraron a 3 metros de distancia del río, y al no haber vegetación que frene un poco el agua, la inundación puede extenderse varios metros más. Como se ha visto, los suelos de las orillas del río Lacantún son fértiles y bien drenados a los cuales no les falta materia orgánica y son suelos poco compactados y generalmente las parcelas agrícolas suelen establecerse en suelo de vega, debido a que la calidad del mismo es buena para los cultivos; pero cuando el río crece puede llevarse

completamente la ribera si no hay vegetación que sostenga el suelo. Por lo que en proyectos de restauración de riberas se ha recomendado sembrar algunas especies con raíces fuertes y capaces de tolerar las crecientes del río y la inundación (Meli y Carrasco-Carballido, 2011); estas especies pueden ser especies arbóreas que sirvan a las lianas de este estudio como soporte para su crecimiento.

En cuanto a la germinación en campo, pudimos observar que los porcentajes de germinación fueron muy similares a los obtenidos en las cámaras de germinación en el laboratorio. El porcentaje de germinación de *Mucuna argyrophylla* fue de 64% en campo, mientras que en el laboratorio se obtuvo un 60%. De igual manera, la germinación en campo de las semillas de *Aristolochia grandiflora* tratadas con giberelinas a 1500 ppm fue de 16%, mientras que las que fueron tratadas en el laboratorio con la misma concentración de giberelinas obtuvieron un porcentaje de germinación de 20%. De las plántulas de *Aristolochia grandiflora* que se obtuvieron en el vivero en campo sobrevivieron el 43%, pero por la poca cantidad de plántulas, éstas no pudieron utilizarse para hacer un esquema de trasplante a campo, que pudiera validarse estadísticamente.

Histología de las semillas de *Aristolochia grandiflora*

Las semillas de *A. grandiflora* son relativamente grandes, 1 cm de largo, y contienen una gran cantidad de tejido de reserva (perispermo) y endospermo rodeando al embrión, el embrión ocupa un pequeño espacio en el extremo micropilar de la semilla (Fig 13), en esta figura también se

puede observar que la cubierta seminal es muy gruesa en proporción al tamaño de la semilla y en especial del embrión.

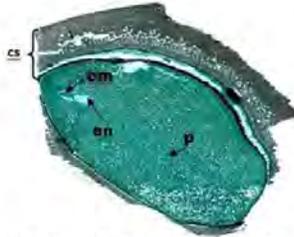


Fig 13. Corte longitudinal de una semilla de *A. grandiflora*.
em: Embrión, en: endospermo , P: perispermo y cs: cubierta seminal.

La cubierta seminal está formada por testa, tegmen ya que proviene de un óvulo bitégmico; la exotesta está formada por una capa monoestratificada de epidermis con células de paredes ligeramente engrosada, que posee la cutícula externa, le sigue un tejido de células pequeñas de paredes no engrosadas que dejan espacios, que albergan un contenido, el origen de estos espacios intercelulares puede ser esquizogeno (por separación de las células existentes debido al crecimiento celular) (Fig. 15), los cuales están rodeados por células parenquimáticas, ésta es una capa muy gruesa. Después de esta capa se observa un tejido de células pequeñas con paredes engrosadas que se continua con otras células pequeñas, en cuyo interior se alojan cristales, como también lo reportan otros autores (Nakonechnaya *et al.* 2013).

El tegmen comienza con una capa colapsada de aspecto fibroso de dos o tres estratos, que se continúan con otros dos o tres estratos de células con fosos. La cutícula interna del tegmen se une a la cutícula nucelar y separa a la nucela de la cubierta seminal (Figs 14 y 16).

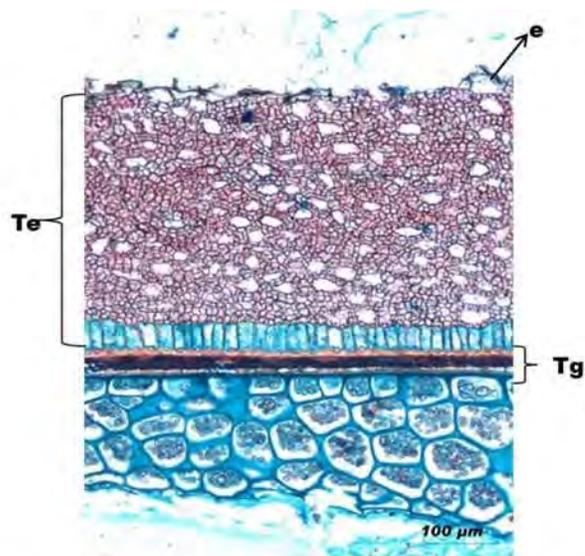


Fig. 14. Fotomicrografía en microscopía de campo claro que muestra un corte longitudinal perpendicular al corte mediano de, Te: la Tg: testategmen y e: la epidermis de *A. grandiflora*.

La testa presenta espacios, de células del mesófilo más o menos reticuladas engrosadas y lignificadas que permiten a la semilla flotar (Fig. 15).

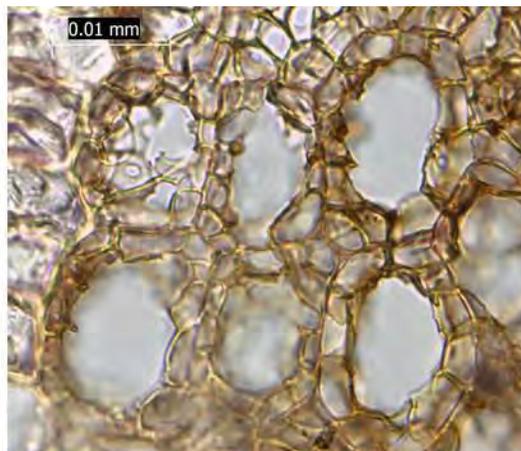


Fig. 15. Corte longitudinal perpendicular al corte mediano del tejido de la testa con espacios aéreos.

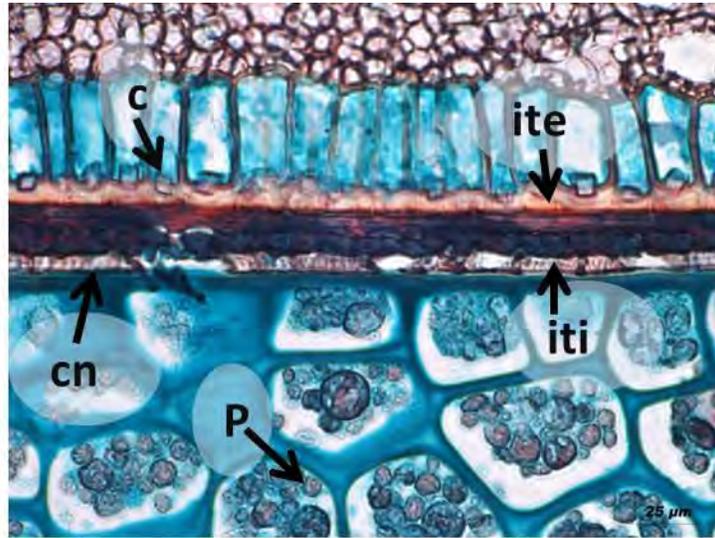


Fig. 16. Fotomicrografía en microscopía de campo claro que muestra un corte longitudinal perpendicular al corte mediano donde se observa un acercamiento a la cubierta seminal y al tejido de reserva de la semilla .Células con cristales (c), cutícula interna del tegumento externo (ite), la cutícula interna del tegumento interno (iti) la cutícula nucelar (cn) y el perispermo (p).

Dentro del tejido parenquimático se localizan unas estructuras que probablemente secretan toxinas, las cuales están rodeadas por los espacios intercelulares (Fig. 17).

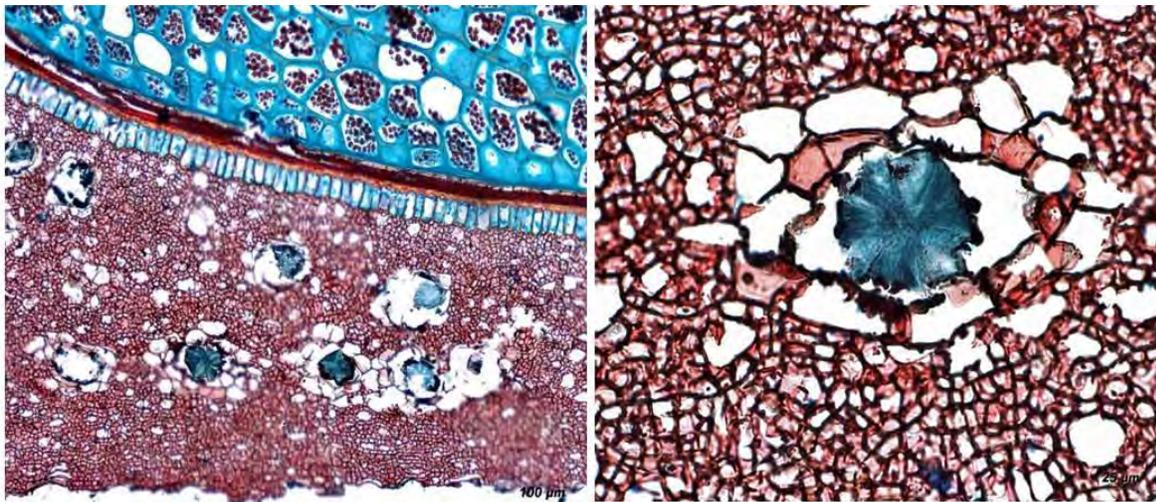


Fig. 17. Fotomicrografía en microscopía de campo claro que muestra un corte longitudinal perpendicular al corte mediano donde se observa: A: la cubierta seminal y B: un acercamiento a células secretoras.

En cuanto a los cortes realizados para observar al embrión (Fig. 18), se puede apreciar que éste está bien diferenciado y claramente se pueden distinguir todas sus partes, los cotiledones (Fig. 18B), el tejido provascular, el meristemo apical (Fig. 18C) y el meristemo radicular (Fig. 18D); en la figura A se aprecia que el endospermo está aparentemente vacío, también se puede observar que el embrión ocupa un espacio muy pequeño de la semilla, proporcionalmente el embrión cabe 9 veces dentro de la semilla y todo el saco embrionario cabe 6.

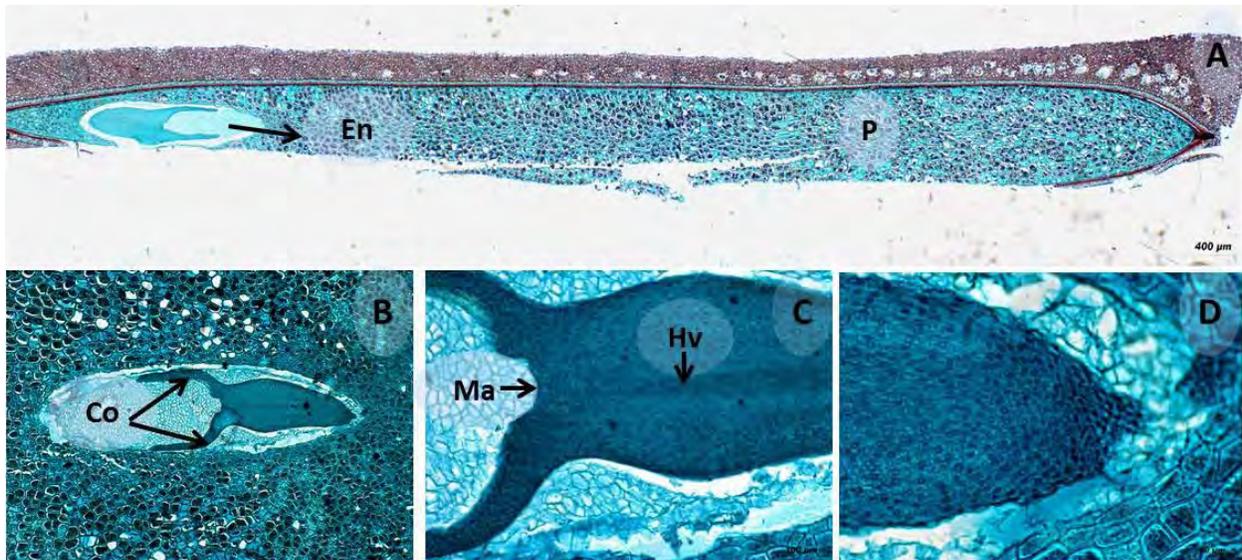


Fig. 18. Fotomicrografía en microscopía de campo claro que muestra el embrión y sus diferentes estructuras: Se muestra la relación del embrión, A: en: endospermo, p: perispermo; B: embrión completo y sus Co: cotiledones; C: Ma: meristemo apical, (Hv) haz vascular (tejido provascular) y D: meristemo radicular (D).

Pruebas histoquímicas

Las pruebas histoquímicas presentadas en la figura 19a, dieron resultados positivos para la prueba de Lugol en el perispermo, la prueba de rojo “O” de aceite para reservas lipídicas, cutina y suberina fue positiva, marcando fuertemente la zona entre la cutícula interna del tegumento interno y la cutícula nucelar (Fig. 19B), la prueba histoquímica ácido peryodico- reactivo de

Schiff para identificar polisacáridos insolubles fue negativa (Fig. 19C), azul negro de naftol-APS (proteínas-polisacáridos insolubles) fue positiva en las células de reserva del perispermo (Fig. 19D).

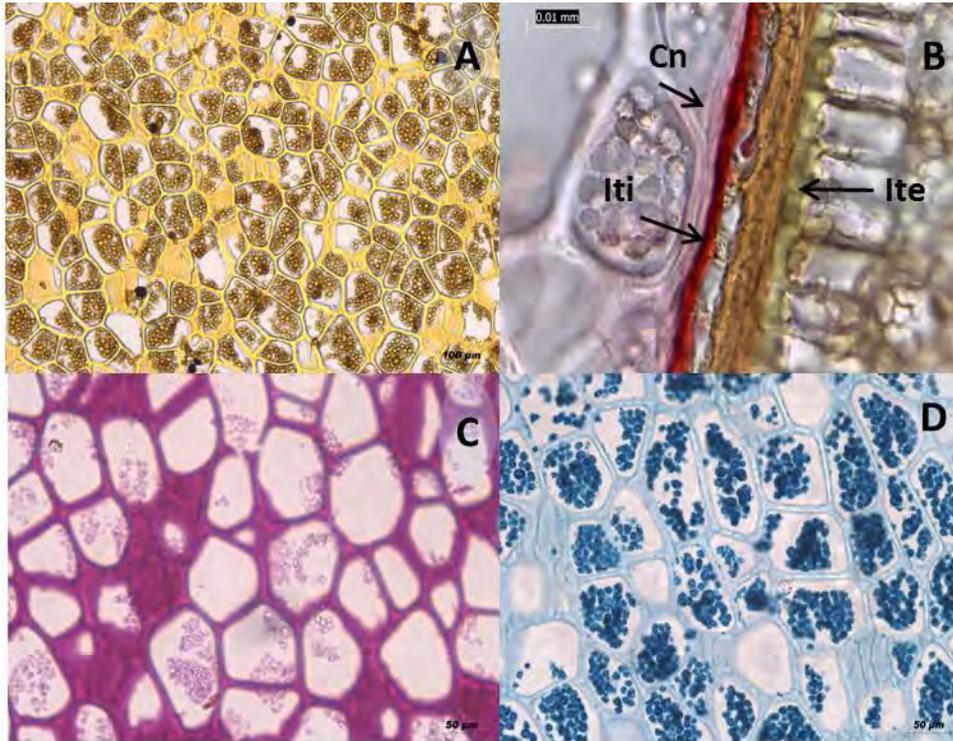


Fig. 19. Técnica de fotomicrografía en microscopía de campo claro que muestran los resultados de las pruebas histoquímicas.: A: prueba de lugol, B: rojo O de aceite; Cn: cutícula nucelar, lti: cutícula interna tegumento interno, lte: cutícula interna tegumento externo, C: peryodico- reactivo de Schiff y D: azul negro de naftol.

El tejido parenquimático con espacios esquizogenos, nos indica que estas semillas se dispersan por agua. Además de este tejido, la presencia de reservas lipídicas en la cubierta seminal, en la zona entre la cutícula interna del tegumento interno y la cutícula nucelar y la cutícula interna del tegumento externo, comprobada por la prueba histoquímica de rojo “O” de aceite, corrobora que estas semillas pueden tener ese tipo de dispersión; ya que estos tejidos, más la epidermis de la semilla funcionan como una cubierta mecánica impermeable que impide la toma de agua por el

embrión, con lo que las semillas tendrían una latencia física. Esto se confirma al cortar semillas que han estado embebidas en agua varios días o incubación y no muestran una aparente toma de agua. En semillas como las de *A. grandiflora* es difícil remover esta cubierta lipídica, ya que las semillas son muy planas y sería prácticamente imposible hacer algún tipo de escarificación mecánica sin dañar estructuras importantes para el desarrollo del embrión; pero, la licuefacción de los lípidos a ciertas temperaturas hacen que la germinación de semillas de varias especies ocurra solo en determinados sitios, y en ocasiones tiene relación con la distribución geográfica de las especies (Besbes, *et al.* 2009).

Contrario a lo reportado por Corner, 1976 sobre que las semillas de la familia Aristolochiaceae tienen embriones indiferenciados, las semillas de *A. grandiflora* presentaron un embrión pequeño pero bien diferenciado, lo cual explica por qué estas semillas tienden a germinar pronto después de la dispersión; pero al pasar algunos meses dentro de la época de dispersión entran en latencia. Si no se ha probado la capacidad germinativa inicial en cualquier especie, pueden llegar a confundirse los tipos de latencia, lo cual lleva a conclusiones incorrectas, como aparentemente ha ocurrido en las especies de este género.

En el 2013, Nakonechnaya *et al.* observaron algo similar con los embriones de *Aristolochia contorta* ellos definieron al embrión de estas semillas como bien diferenciado y de tamaño pequeño en comparación con la longitud de la semilla y basándose en la clasificación de Baskin y Baskin (2001) lo describieron como un embrión subdesarrollado ya que está diferenciado porque tiene un eje discernible y dos cotiledones, pero no llena la mitad de la longitud de la semilla. En el caso de las semillas de *A. grandiflora* vimos que el embrión ocupa un espacio muy pequeño de la semilla, como se describió anteriormente.

En las semillas de algunas familias del orden Piperales, como las Aristolochiaceae, el tejido de almacenamiento se compone principalmente de perispermo en lugar de endospermo el cual es delgado y escaso (González, *et al.*, 2003). La prueba histológica de azul negro de naftol-APS, mostró que en las semillas de *A. grandiflora* el perispermo contiene proteínas, lo cual es muy común en semillas de algunas familias como las cactáceas (Wallace, *et al.* 1996). Esto no había sido reportado previamente en las Aristolochiaceae. La demora de la germinación puede deberse a que los tejidos de almacenamiento pueden actuar como barreras mecánicas para restringir el crecimiento del eje embrionario impidiendo el paso del agua, lo que lleva a la semilla a un estado de latencia (Bewley y Black, 1994), como ocurre con el endurecimiento del endospermo en semillas de *Lycopersicum esculentum* y *Phaseolus* spp, en las cuales es posible que el endospermo restrinja o impida la germinación por la naturaleza de las paredes celulares del endospermo, y para permitir la protrusión de la radícula de la semilla, se requiere el debilitamiento de esas paredes (Gong *et al.*, 2005).

Es interesante notar que las características anatómicas de la semilla nos pueden permitir entender aspectos sobre su ecología, que de otra forma nos sería muy difícil elucidarlos y esto nos permite tener una visión más completa para conocer los requerimientos de las semillas para su germinación y el establecimiento de las plántulas, lo cual facilita introducir estas especies en proyectos de restauración ecológica.

CONCLUSIONES

- Las semillas de *Aristolochia grandiflora*, no tienen latencia morfológica, ya que recién recolectadas tienen la mayor capacidad germinativa registrada en este estudio (90%) que después de 2 meses de almacenamiento.

- Los resultados de germinación, de las primeras pruebas realizadas con las dos especies de *Aristolochia* (Tratamiento a temperatura constante y fluctuante), nos indican que estas especies pueden germinar a la misma velocidad.
- *A. grandiflora* necesita temperatura fluctuante para germinar sin importar el tratamiento. aunque este requerimiento puede cambiar a temperatura constante a lo largo de la vida de las semillas.
- Las semillas de *Mucuna argyrophylla* presentaron una latencia física y el mejor tratamiento para romperla y comenzar la germinación, fue escarificar en el lado opuesto a la región micropilar (la chalaza).
- Para fines de proyectos de restauración ecológica, *Mucuna* puede ser almacenada con la certidumbre de que van a conservar su viabilidad por más tiempo, dado que la cubierta impermeable representa una protección para el embrión.
- En *A. grandiflora*, el tejido parenquimático con espacios vacíos intercelulares, nos indica que estas semillas se dispersan por agua, además de éste tejido, la presencia de reservas lipídicas en la cubierta seminal, en la zona entre la cutícula interna del tegumento interno y la cutícula nucelar corrobora que estas semillas tienen dispersión secundaria por agua.
- Las semillas de *A. grandiflora* presentaron un embrión pequeño pero bien diferenciado, lo cual nos explica el por qué estas semillas tienden a germinar pronto y en altos porcentajes, al inicio de la época de dispersión y al pasar algunos meses, ya dentro del pico de la época de dispersión entran en latencia física.

- El hecho de encontrar en las semillas de *A. grandiflora* perispermo con contenido proteico, puede explicarnos la demora de la germinación; ya que tejidos como éstos pueden actuar como barreras mecánicas para restringir el crecimiento del eje embrionario provocando un estado de latencia, en este caso la combinación de las capas lipídicas con el perispermo impiden la hidratación de la semilla.
- Para fines prácticos de restauración ecológica las semillas de *Mucuna argyrophylla* funcionan mejor que las de *Aristolochia grandiflora*, por su buena capacidad germinativa, pero con tratamientos adecuados y recolectando las semillas de *A. grandiflora* en el principio de la producción de semillas, éstas plantas también pueden ser utilizadas en este tipo de proyectos.

RECOMENDACIONES

Para la propagación de estas plantas de alimentación de mariposas en campo, en proyectos de restauración, se recomienda sembrar las semillas en lugares donde puedan estar al menos 6 horas expuestas a la luz total y 6 horas a la sombra durante el día en un vivero rural y así obtener una alternancia de temperaturas. Además para saber si el tipo de suelo es un factor limitante para su crecimiento y establecimiento, se recomienda hacer un experimento en donde se siembren las semillas en macetas o bolsas forestales con distintos tipos de suelos y evaluar su supervivencia, crecimiento y establecimiento, para saber si estas especies pueden ser sembradas en distintos hábitats con suelos distintos y diferentes grados de disturbio para su recuperación.

También es necesario sembrar especies arbóreas acompañantes para el crecimiento de estas lianas, para que se apoyen en ellas.

COSTOS PARA GERMINAR EN CAMPO

Agua de humo:

Olla para tamales grande..... \$200

1 metro de manguera de 1 pulgada.....\$20

Escarificación mecánica:

Mototool Dremel 395 77 Acc..... \$1099

Brocas para Joyería (paquete de 10).....\$70

Charola de germinación..... \$50

Bolsa forestal $\frac{1}{2}$ L, 3 Kg..... \$90

LITERATURA CITADA

Adams C. A., Baskin J.M., Baskin C. C. 2005. Trait stasis versus adaptation in disjunct relict species: evolutionary changes in seed dormancybreaking and germination requirements in a subclade of *Aristolochia* subgenus *Siphisia* (Piperales). *Seed Science Research*. 15(02): 161-173.

Agbo G. N., Hosfield G. L., Uebersax M. A., Klomparens K. 1987. Seed microstructure and its relationship to water uptake in isogenic lines and a cultivar of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food microstructure*. 6:91-102.

- Alcântara B. R. L., Alves E.U., Oliveira A. P, Paula E. R. C. 2001. Tratamentos pré-germinativos para superar a dormência de sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. *Revista Brasileira de Sementes* 23(2):136-143.
- Alves-Da-Silva D., Borghetti F., Thompson K., Pritchard H., Grime J. P. 2011. Underdeveloped embryos and germination in *Aristolochia galeata* seeds. *Plant Biology*, 13(s1):104-108.
- Argel PJ y Humphreys LR. 1983. Environmental effects on seed development and hard seed edness. in *Stylosanthes hamata* cv. Verano. II. Moisture and illuminance. *Australian Journal of Agricultural Research* 34:271-277.
- Barba-Espín G., Hernández J. A., Diaz-Vivancos P. 2012. Role of H₂O₂ in pea seed germination. *Plant signaling & behavior*, 7(2):193-195.
- Baskin C. C. 2003. Breaking physical dormancy in seeds—focussing on the lens. *New Phytologist*, 158(2):229-232.
- Baskin J. M., Baskin C. C. 2001. *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press. USA. 667 p.
- Baskin J. M., Baskin C. C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1–16.
- Baskin J. M., Baskin C. C. 2007. A revision of Martin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. *Seed Science Research* 17:11–20.
- Baskin J. M., Baskin C. C., Li, X. 2000. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, 15(2):139-152.
- Baskin J.M., Baskin C.C., Li X. 2000. Taxonomy, ecology, and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology* 15:139–152.
- Beck J., Fiedler K. 2008. Adult life spans of butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea Hesperioidea): broadscale contingencies with adult and larval traits in multi-species comparisons. *Biological Journal of the Linnean Society*, 96(1):166-184.
- Bello M. A., Valois-Cuesta H., González F. 2006. *Aristolochia grandiflora* sw. (Aristolochiaceae): desarrollo y morfología de la flor más larga del mundo. *Rev. acad. colomb. cienc.:* 30 (115).
- Besbes S., Blecker C., Deroanne C., Drira N. E., Attia H. 2004. Date seeds: chemical composition and characteristic profiles of the lipid fraction. *Food chemistry*, 84(4): 577-584.

- Bewley J. D. 1997. Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9(7): 1055.
- Bewley J. D., Black M. 1994. *Seeds*. Springer Us. 33p.
- Bouwmeester H. J., Karssen C. M. 1992. The dual role of temperature in the regulation of the seasonal changes in dormancy and germination of seeds of *Polygonum persicaria* L. *Oecologia*, 90(1):88-94.
- Brown N. A. C., van Staden J. 1997. Smoke as a germination cue: a review. *Plant Growth Regulation*, 22(2):115-124.
- Carabias J., Hernandez G., Meli P. 2009. Análisis comparativo de la deforestación de los ejidos de Marqués de Comillas, y determinación de corredores biológicos que conecten los fragmentos de selva de los ejidos con la Reserva de la Biosfera Montes Azules. Informe Técnico. INE-UNAM, México.
- Carabias J., Meli P. 2008. Proyecto de servicios ambientales para la protección a la biodiversidad ejido Playón de la Gloria, Marqués de Comillas, Chiapas. Informe. *Natura mexicana* 30 p.
- Carabias J., Meli P., Hernandez G., Almeida G. 2006. Estrategia de Restauración Ambiental y Prevención de Incendios en Ejidos Ribereños del Río Lacantún, colindantes a la Reserva de la Biosfera Montes Azules. Reporte final. INE-UNAM, México 109 p.
- Carabias J., P. Meli, Hernández G.. 2007. Reforestación y restauración ecológica en siete ejidos de las márgenes del río Lacantún, al sur de la Reserva de la Biosfera Montes Azules. CBM- *Natura Mexicana*. 128 p.
- Carabias J., Meli P., Hernandez G. 2012. Evaluación de los impactos de proyectos de desarrollo sustentable sobre la reducción del cambio de uso de suelo en ejidos de Marqués de Comillas, Chiapas. INE-UNAM, México 122 p.
- Cervantes V., López M., Salas N., Hernández G. 2001. Técnicas para propagar especies nativas de selvas bajas caducifolias y criterios para establecer áreas de reforestación. Mexico D.F. Las Prensas de Ciencias, UNAM.
- Corner E. J. H. 1976. *The Seeds of Dicotyledons (Vol. 1)*. Cambridge University Press. 313p.

- D.R. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7294>. Consultada 2012.
- de la Maza J. 2006. Montes Azules, patrimonio natural de México y del mundo. Una experiencia exitosa de conservación. Revista Pulso Ambiental, México.
- de la Maza J., Carabias J. 2011. Usumacinta: bases para una política de sustentabilidad ambiental. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua- Natura y Ecosistemas Mexicanos. 246 p.
- de la Maza J., Mastretta A., Ruiz L., Carabias J. 2010. Plan para el Desarrollo Ecoturístico del Municipio Marqués de Comillas, Selva Lacandona, Chiapas. Natura mexicana- Agencia para el Desarrollo Internacional (USAID). 408 p.
- de la Maza R. 1985. La fauna de mariposas de Boca de Chajul, Chiapas, México. Rev. Soc. Mex.Lepidopterología. (9)2:23-44.
- de la Maza R., de la Maza J. 1993. Mariposas de Chiapas. Gobierno del Estado de Chiapas / Espejo de Obsidiana Ediciones. México. 224 p.
- de Moura T. M., Zamora N. A., Lewis G. P., de Freitas Mansano V., Tozzi A. M. G.2013. *Mucuna globulifera* (Leguminosae: Papilionoideae), a new species from Costa Rica, Panama and Colombia. Kew Bulletin, 68: 151-155.
- de Vos J. 2002. Una tierra para sembrar sueños: Historia reciente de la Selva Lacandona (1950-2000). FCE-CIESAS, México. 501 p.
- de Vries P. J. 1987. The Butterflies of Costa Rica and Their Natural History, Vol. I: Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae. Princeton University Press. New Jersey. 327 p.
- del Amo S., Vergara M. C., Ramos J. M., Saiz C. 2009. Germinación y manejo de especies forestales tropicales. Universidad Veracruzana. Mexico. 248 p.
- Dirzo R., y Mota-Bravo L. M. 1997. *Omphalea oleifera* 130-133pp, en Historia Natural de Los Tuxtlas. González E., Dirzo R. y Vogt R.C. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología: Instituto de Ecología. 647 p.

- Fenner, M., Thompson, K. 2005. The ecology of seeds. Cambridge University Press.179 p.
- Flematti G. R., Ghisalberti E. L., Dixon K. W., Trengove R. D. 2004. A compound from smoke that promotes seed germination. *Science*, 305(5686):977-977.
- Gamboa de Buen A., Orozco-Segovia A. 2008. Hydrophyllaceae Seeds and Germination. *Seed Science and Biotechnology* 2 (1):15-26.
- Gann G., Lamb D. 2006. Ecological Restoration – a Means of Conserving Biodiversity and Sustaining Livelihoods. Society for Ecological Restoration International, Tucson, Arizona, USA and IUCN, Gland, Switzerland .6 p.
- Garcia J. 2009. Lianas da floresta estacional semidecidual: ecofisiologia e uso em restauração ecológica. Universidade de São Paulo. 103 p.
- Garrido-Pérez E. I., Durán R., Gerold G. 2012. Las relaciones liana-árbol: repercusiones sobre las comunidades arbóreas y sobre la evolución de los árboles. *Interciencia*, 37(3):183-189.
- Gong, X., Bassel, G. W., Wang, A., Greenwood, J. S., Bewley, J. D. 2005. The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- β -mannanase activity. *Annals of Botany*, 96(7):1165-1173.
- González F., Rudall P. J. 2003. Structure and development of the ovule and seed in Aristolochiaceae, with particular reference to *Saruma*. *Plant Systematics and Evolution*, 241(3-4): 223-244.
- Gutterman Y.1992. Maternal effects on seeds during development. In: *The Ecology of Regeneration en Plant Communities* (ed. M Fenner), 27-59. CAB International, Wallingford, UK.
- Herbario CICY, Unidad de Recursos Naturales Flora de la península de Yucatán. 2012. http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/indice_tax_especies.php?genero=Serjania.
- Hernández-Pérez G.2011. Plan de desarrollo municipal 2011-2012 municipio Marqués de Comillas, Chiapas. Disponible en: <http://www.maderasdel pueblo.org.mx/archivos/pdf/planmarques.pdf>.

- Hilhorst H. W. M. 1998. The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited. *Seed Science Research* 8: 77–90.
- Hill P.N., van Staden J. 2003. Thermoinhibition of seed germination. *South African Journal of Botany*. 69: 455–561.
- Hong, T. D., & Ellis, R. H. (1996). A protocol to determine seed storage behaviour (No. 1). Bioversity International. 60p.
- <http://www.florabank.org.au/files/documents/seedgerminationanddo/20070801-20.pdf> 2012.
- <http://www.mapasmexico.mx/estados/chiapas.html> 2014.
- Ibarra-Manríquez G., Sinaca C. 1995. Lista florística comentada de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz, México. *Revista de biología tropical* 43(1-3): 75-115.
- Ibarra-Manríquez G., Martínez-Ramos M. 2002. Landscape variation of liana communities in a Neotropical rain forest. *Plant ecology*, 160(1): 91-112.
- INE. 2000. Programa de manejo: Reserva de la Biósfera de Montes Azules, México. INE-Semarnap. 256 p.
- Jayasuriya G.K.M.G., Baskin J.M., Baskin C.C. 2008. Cycling of sensitivity to physical dormancy-break in seeds of *Ipomoea lacunose* (Convolvulaceae) and ecological significance. *Ann Bot* 101:341–352.
- Jordão, S. M. S. 2009. Manejo de lianas em bordas de floresta estacional semidecidual e de cerrado, Santa Rita do Passa Quatro, SP. 248 p.
- Keeley J. E., Baer-Keeley M., Fotheringham C. J. 2005. Alien plant dynamics following fire in Mediterranean-climate California shrublands. *Ecological Applications*, 15(6):2109-2125.
- Keeley J. E., Fotheringham C. J. 1997) Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. *Science*, 276(5316): 1248-1250.

- Kermode A. R. 1995. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, 273-332.
- Keshtkar H.R., Azarnivand H., Etemad V., Moosavi S.S. 2008a. Seed dormancy-breaking and germination requirements of *Ferula ovina* and *Ferula gummosa*. *Desert.*, 13(1): 45-51.
- Keshtkar, A. R., Keshtkar, H. R., Razavi, S. M., Dalfardi, S. 2008b. Methods to break seed dormancy of *Astragalus cyclophyllon*. *African Journal of Biotechnology*, 7(21).
- Kimura E., Islam M.A. 2012. Seed Scarification Methods and their Use in Forage Legumes. *Research Journal of Seed Science*, 5: 38-50.
- Korban S. S., Coyne D. P., Weihing J. L. 1981. Rate of water uptake and sites of water entry in seeds of different cultivars of dry bean. *HortScience*. 16:545-546.
- Kulkarni M. G., Sparg S.G., Van Staden J. 2007. Germination and post-germination response of Acacia seeds to smoke-water and butenolide, a smoke-derived compound. *Journal of Arid Environments* 69:177–187.
- Lambin E. F., Geist, H. J., & Lepers, E. (2003). Dynamics of land-use and land-cover change in tropical regions. *Annual review of environment and resources*, 28(1):205-241.
- Laurance W.F., Pérez-Salicrup D., Delamónica P., Fearnside P.M, Angelo S. D, Jerozolinski A., Pohl L. y Love joy T.E. 2001. Rain forest fragmentation and the structure of Amazonian liana communities. *Ecology* 82:105–116.
- Lersten N. R., Charles R. G., Curt L. B. 1992. Comparative Morphology of the Lens on Legume (Fabaceae) Seeds, with Emphasis on Species in Subfamilies Caesalpinioideae and Mimosoideae. U.S. Department of Agriculture Technical Bulletin No. 1791. 44 pp.
- Letcher, S. G., & Chazdon, R. L. (2012). Life history traits of lianas during tropical forest succession. *Biotropica*, 44(6): 720-727.
- Liptay A., Schopfer P. 1983. Effect of Water Stress, Seed Coat Restraint, and Abscisic Acid upon Different Germination Capabilities of Two Tomato Lines at Low Temperature. *Plant Physiol.* 73:935-938.

- López-Curto M. L., Márquez-Guzmán J. y Murguía-Sánchez G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas, 2° ed. Las prensas de ciencias, México.
- Lozano-Vilano M. L., García-Ramírez M.E., Contreras-Balderas S. y Ramírez-Martínez C. 2007. Diversity and Conservation Status of the Ichthiofauna of río Lacantún basin in the Biosphere Reserve Montes Azules, Chiapas, México. *Zootaxa* 1410:43-53.
- Magalhães C. A. 2006. Absorção de água, germinação e dormência de sementes de *Mucuna Preta*. Universidade estadual Paulista. Brasil. 94 p.
- Mapas de México. <http://www.mapasmexico.mx/estados/chiapas.html>. 2014.
- Marbach I., y Mayer A.M. 1974. Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. *Plant Physiology* 54: 817-820.
- Meli, P., Carrasco-Carballido, V. 2011. Restauración ecológica de riberas. Serie Diálogos / Número 5. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. 66 p.
- Mendoza-Hernández P. E., Orozco-Segovia A., Pisanty I. 2010. Germination, emergence, and survival of *Buddleja cordata* in an urban forest. *Ecological Restoration*, 28(3):263-265.
- Moreno F., Plaza G. A., Magnitskiy S. V. 2006. Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell). *Agronomía Colombiana* 24(2): 290-295.
- Nakonechnaya O. V., Gorpenchenko T. Y., Voronkova N. M., Kholina A. B., Zhuravlev Y. N. 2013. Embryo structure, seed traits, and productivity of relict vine *Aristolochia contorta* (Aristolochiaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 208(4):293–297.
- Natura y Ecosistemas Mexicanos, A.C. 2013. <http://naturamexicana.org.mx/>. Consultada 2014.
- Navarro M. 2003. Desempeño fisiológico de las semillas de árboles leguminosos de uso múltiple en el trópico. *Pastos y Forrajes* 26 (2): 97-114.

- Orozco-Segovia A., Márquez-Guzmán J., Sánchez-Coronado M. E., De Buen A. G., Baskin J. M., Baskin C. C. 2007. Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Annals of botany*, 99(4):581-592.
- Orozco-Segovia A., Brechú-Franco A. E., Zambrano-Polanco L., Osuna-Fernández R., Laguna-Hernández G., Sánchez-Coronado M. E. 2000. Effects of maternal light environment on germination and morphological characteristics of *Sicyos deppei* seeds. *Weed Research*, 40(6):495-506.
- Orozco-Segovia A., Sánchez-Coronado M. E. 2009. Functional diversity in sedes and its implications for ecosystem functionality and restoration ecology. *Research Signpost*. 978 (81): 175-216.
- Pérez A., Matías C., González Y., Alonso O. 2006. Producción de semillas de gramíneas y leguminosas tropicales. En: Recursos forrajeros herbáceos y arbóreos. Universidad de San Carlos, Guatemala EEPF .Indio Hatuey, Matanzas, Cuba. 135 p.
- Philip R. 1978. Water impermeable seed dormancy. *The botanical review*. 44(3): 365:369 .
Royal Botanic Gardens Kew: <http://data.kew.org/sid/sidsearch.html> 2012.
- Sánchez-Coronado M. E., Márquez-Guzmán J., Rosas-Moreno J., Vidal-Gaona G., Villegas M., Espinosa-Matías,S., Orozco-Segovia A. 2011. Mycoflora in exhumed seeds of *Opuntia tomentosa* and its possible role in seed germination. *Applied and Environmental Soil Science*, 2011:1-8.
- Schaefer S. 2009. Manejo de lianas em bordas de floresta estacional semidecidual e de cerrado, Santa Rita do Passa Quatro, SP. Universidade de São Paulo. 248 p.
- Servicio meteorológico nacional (SMN) <http://smn.conagua.gob.mx> 2014.
- Siebe C., Jahn R., Stahr K. 2006. Manual para la descripción y evaluación ecológica de suelos en el campo. Instituto de geología Universidad Nacional Autónoma de México. 70 p.

- Simão E. 2009. Aspectos ecofisiológicos da germinação, sobrevivência E (Doctoral dissertation, Universidade Estadual Paulista).
- Smith T. 2006. Seed Priming and Smoke Water Effects on Germination and Seed Vigor of Selected Low-Vigor Forage Legumes. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University. 102 p. Society for Ecological Restoration (SER): <http://www.ser.org/> 2004.
- Society for Ecological Restoration (SER): <http://www.ser.org/> 2013.
- Solórzano S., Ibarra-Manríquez G., Oyama K. 2002. Liana diversity and reproductive attributes in two tropical forests in Mexico. *Biodiversity and Conservation* 11: 197–212.
- SPDS.2007. Secretaría de Planeación y Desarrollo Sustentable; Dirección de Geografía, Estadística e Información; Perfiles Municipales. 31 p. Disponible en: http://www.haciendachiapas.gob.mx/planeacion/Informacion/Programacion_Sectorial/Programas_Institucionales/pdfs/2PROG_INST_SPYDS%20100907.pdf.
- Thompson B. K. 1987. Seeds and Seed Banks. *New Phytologist*, *Frontiers of Comparative Plant Ecology* 106:123-34.
- Tucker N. I. J., Murphy T. 1997. The effect of ecological rehabilitation on vegetation recruitment: Some observations from the wet tropics of north Queensland. *Forest Ecology and Management* 99: 133–52.
- Van Staden J., Brown N. A., Jäger A. K., Johnson T. A. 2000. Smoke as a germination cue. *Plant Species Biology*, 15(2): 167-178.
- Vázquez-Yanes C., Orozco-Segovia A., Rojas M., Sánchez M. E., Cervantes V. 1997. La reproducción de las plantas: semillas y meristemos. Fondo de Cultura Económica. México. 170 p.
- Vázquez-Yanes, C., Orozco-Segovia, A. 1990. Ecological significance of light controlled seed germination in two contrasting tropical habitats. *Oecologia*, 83(2): 171-175.
- Wallace R. S., & Cota, J. H. 1996. An intron loss in the chloroplast gene *rbcL* supports a monophyletic origin for the subfamily Cactoideae of the Cactaceae. *Current genetics*, 29(3):275-281.

- Werker E. 1997. Seed anatomy. (Encyclopedia of Plant Anatomy Bd. 10). Gebrüder Borntraeger, Berlin. 424p.
- Woodson R. E., Scherry R. W. 1980. Flora of Panama part 5, fascicle 52. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 67:523–818.
- Wulff R. D., 1995. Environmental maternal effects on seed quality and germination. En Kigel J., Galilei G., eds. Seed development and germination. Marcel Dekker, New York. 491-505 pp.
- Zhang L., Hu Y., Yan S., Li H., He S., Huang M., Li L. 2012. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. *Plant molecular biology*, 79(3):285-293.

ANEXO I

I) Descripción general del suelo

I . Información acerca de la localidad

Número de perfil: 1

Nombre del sitio: Parcela de Noé río Chajulillo

Clasificación del suelo: Luvisol Mólico (Éutrico)

Fecha de descripción: 27/07/2012

Autor: Alejandra López Valenzuela

Localización:

Coordenadas UTM: 0719937, 1778969 ± 6m

Altitud:

Forma del terreno: Plana-plana

Posición fisiológica: Terraza aluvial

Forma del terreno: plana-plana

Pendiente: 0

Uso de suelo o vegetación: Acahual, 14 años de descanso, vegetación riparia

Clima: Af (tropical húmedo)

II. Información general acerca del suelo:

Material parental: Es difícil saberlo porque son depósitos fluviales

Drenaje natural: Bueno

Condiciones de humedad en el perfil: Húmedo

Profundidad del manto freático: Desconocida, no influye al perfil

Presencia de rocas superficiales: no hay

Evidencia de erosión: no

Presencia de sales o soda: Efervescencia fuerte

Influencia humana: Influencia de ganado, acahual

III Descripción breve del perfil:

Perfil de profundidad mediana, bien drenado, color pardo grisáceo oscuro, uniforme en apariencia, pedregosidad nula. El desarrollo de la estructura subangular en bloques, con agregados de tamaño mediano a fino. Es friable, con pocos poros y muy permeable. La densidad de las raíces es alta en el primer horizonte (0-8 cm) y muy alta en el segundo (8-10cm), comenzando a bajar su densidad en el tercer horizonte (10-24 cm), y con presencia de actividad biológica (lombrices).

Horizonte	Espesor (dm)	Descripción
Ap	0-8 cm	Color pardo grisáceo oscuro (2.5 Y ⁴ / ₂), textura franco-arenosa (CA), con un contenido medio de materia orgánica (3%), un pH de (6) ligeramente ácido, de estructura subangular en bloques mediana-fina, poros finos, sin pedregosidad , presenta efervescencia fuerte pero breve (K3) contiene una alta densidad de raíces y presenta un limite gradual y uniforme.
2Ah	8-10 cm	Color pardo grisáceo muy oscuro (10 YR ³ / ₂), textura franco-limosa-fina (CLF), contenido medio de materia orgánica (4%), pH ligeramente ácido (6), de estructura granular media-granular media fina, poros comunes finos, sin pedregosidad, presenta efervescencia fuerte pero breve (K3), densidad muy alta de raíces, limite gradual y uniforme.
2AB	10-24 cm	Color pardo grisáceo oscuro (2.5 Y ⁴ / ₃), textura franco-limosa-fina (CLF), pH (6), contenido medio de materia orgánica (2%), estructura subangular en bloque que rompe a fino, pocos poros finos, no presenta pedregosidad, presenta efervescencia fuerte pero breve (K3), densidad baja de raíces, limite gradual y uniforme.
2Bw	24-29 cm	Color pardo grisáceo muy oscuro (10 YR ⁴ / ₄), textura franco-

arcilloso (CR), pH (6), estructura subangular en bloques fina, pocos poros finos, no presenta pedregosidad, presenta efervescencia fuerte pero breve (K3), densidad baja de raíces, limite gradual y uniforme.

2Bt 29-38 cm Color pardo grisáceo oscuro (2.5 Y $4/2$), textura arcilloso-limosa (RL), pH (6), estructura subangular en bloques fino, pocos poros finos, no presenta pedregosidad, presenta efervescencia fuerte pero breve (K3), densidad baja de raíces, limite gradual y uniforme.

3Bw1 38-56 cm Color pardo grisáceo oscuro (2.5 Y $3/3$), textura franco-limosa-fina (CLF), pH (6) , estructura subangular en bloques fina, no presenta pedregosidad, presenta una reacción ligera de efervescencia apenas visible (K2), densidad muy baja de raíces, limite difuso.

3Bw2 56-83 cm Color pardo grisáceo oscuro (2.5 Y $3/3$), textura franco-limosa-fina (CLF), pH (6), estructura subangular en bloques fina, pocos poros finos, no presenta pedregosidad, presenta efervescencia (K2), densidad muy baja de raíces, limite difuso.

3Bw3 83 cm en Color pardo grisáceo oscuro (2.5 Y $4/4$), textura franco-limosa-

adelante fina (CLF), pH (6), estructura de grano simple, poros comunes finos, no presenta pedregosidad, presenta efervescencia fuerte pero breve (K3), densidad muy baja de raíces, limite difuso.

V. Interpretación de las características del suelo:

Procesos pedogenéticos dominantes:

El suelo se clasificó como un Luvisol mólico (éutrico), y se formó en terrazas aluviales a partir de depósitos fluviales; el horizonte A es mólico, porque tienen buena estructura, con una densidad aparente media, presenta un color oscuro y tiene un espesor >20 cm. Se le clasificó como éutrico porque presenta el 50% de saturación de bases, inferido por el pH. Presenta un mantillo de tipo Mull, lo que indica un aporte importante de materia orgánica, debido a una descomposición rápida y la presencia de actividad biológica, la presencia de este mantillo ofrece protección a los horizontes minerales. Tiene un horizonte B árgico, producto de la iluviación de arcillas (Fig 20).

Características ecológicas:

El suelo presenta un buen drenaje, con una conductividad hidráulica mediana, de poro fino y la profundidad fisiológica es profunda; la capacidad de retención de agua aprovechable es alta, lo cual indica que no limita que agua sea aprovechada por las plantas durante la mayor parte del ciclo vegetativo, el suelo no presenta pedregosidad así que es propicio para el establecimiento de plántulas y crecimiento de sus raíces. Presenta una mediana capacidad de aireación, que indica un movimiento eficaz del agua y el aire, por lo que no hay restricciones fisiológicas para el

desarrollo y la penetrabilidad de raíces, la cual es de muy buena a buena en los primeros tres horizontes del suelo. La profundidad fisiológica es de 83cm; la capacidad de retención de agua disponible para las plantas (dCC) es buena al igual que la capacidad de agua total retenida en el suelo a capacidad de campo (CC); la capacidad de intercambio catiónico (CIC) en los horizontes va de regular a mediana. La reserva de nitrógeno es mediana, mientras que la disponibilidad de éste es baja.



Fig 20. Se muestra el perfil edafológico realizado en la zona donde crecen *M. argyrophylla* y *A. grandiflora*

ANEXO II

Pruebas Post-Hoc de Tukey HSD, aplicadas a la germinación de *A. grandiflora*

Rompimiento de la Latencia con giberelinas

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Cont 25/35 °C	4	2.62993	X
Control. 25 °C	4	7.8898	XX
250 ppm GA 25 °C	4	11.7249	XX
500 ppm GA 25 °C	4	15.8312	XX
500 ppm GA 25/35 °C	4	17.2553	X
250 ppm GA 25/35 °C	4	18.6166	X

Tratamiento para romper la latencia con solventes y tratamiento para romper latencia debido a la dureza de los cotiledones

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
50 mM 24h 25 °C	4	0.0	X
Control GA 25 °C	4	0.0	X
Agua de humo 25 °C	4	13.2624	X
Control 25 °C	4	15.4657	XX
Control 25/35 °C	4	19.7274	XX
Agua de humo 25/35 °C	4	19.9258	XX
50 mM 24h 25/35 °C	4	21.2129	XX
Control GA 25/35 °C	4	23.6269	XX
1500 ppm GA 25 °C	4	24.2068	XX
1500 ppm GA 25/35 °C	4	26.4094	X

Rompimiento de la Latencia con imbibición en agua de humo

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control 25 °C	5	4.85854	X
Agua de humo 25 °C	5	8.71842	X

Rompimiento de la latencia con concentraciones altas de giberelinas, incubación en agua de humo y estratificación caliente.

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Acetona 25/35 °C	3	0.0	X
Cloro 25 °C	3	0.0	X
Acetona 25 °C	3	0.0	X
Cloro 25/35 °C	3	0.0	X
Cont 25/35 °C	3	17.2153	XX
20 48h 25/35 °C	3	23.3603	XX
50 mM 48h 25/35 °C	3	23.855	XX
50 mM 24h 25/35 °C	3	26.0703	XX
20 mM 24h 25/35 °C	3	28.7803	XX
Control 25 °C	3	30.2925	X
20 mM 24h 25 °C	3	32.2153	X
50 mM 24h 25 °C	3	33.2109	X
50 mM 48h 25 °C	3	40.3671	X
20 mM 48 h 25 °C	3	41.0703	X