



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA VIABILIDAD
DE SEMILLAS DE *Quercus rugosa* L. y *Quercus***

Los Reyes Iztacala, noviembre del 2004.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL

TÍTULO DE BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Olvera Lugo Ma. Guadalupe

Director de tesis. M. en C. Juan Gerardo Ortiz Montiel





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dios me ha permitido haber sido, ser
y le agradeceré humildemente
que en el futuro seré.

Mil gracias Dios.

DEDICATORIA.

Quiero dedicar mi trabajo a las personas que han sido especialmente importantes para que yo llegase a este momento.

A mis queridos padres, a quienes debo la vida, su amor, su ejemplo, mi formación y educación y por ser mi gran motivación para enriquecerme y engrandecerme día con día como persona, enseñándome que el aprendizaje es lo más importante para lograrlo.

A mi gran hermana Guille, por la fortaleza que me demuestra, por enseñarme que las personas bien formadas no se caen en ningún momento por ser la fuerza.

A mi hermana Pauli, por aguantarme, apoyarme y divertirme, por ser la renovación.

A mi adorado y apreciado hermano Vic, porque hasta este momento ha sido el gran amigo que no necesite encontrar fuera y quien deseo de todo corazón que lo siga siendo, por ser la paciencia.

A mis amigos, Alicia, Jazmín, Selene, Antonio, Yola, por compartir conmigo este sueño de lograr lo deseado por considerarme.

A mi, asesor, guía y amigo, mi profesor Gerardo, por dedicarme de su tiempo, por ser algo más que un asesor y por molestarse en regalarme algunos de sus valiosos consejos.

AGRADECIMIENTOS.

Aunque unas cuantas palabras sean poca cosa para reconocer lo mucho que recibí de ayuda, debo agradecer muy sinceramente a:

La Dra. Silvia Romero Rangel, por su valiosa ayuda en la identificación de las especies utilizadas en la presente investigación y sobre todo porque fue una ayuda total y desinteresada.

A la M. en C. Antonia Trujillo, por su gran humildad al enseñarme algunas técnicas bromatológicas sin perder en ningún momento su gran paciencia para conmigo.

A la Bióloga Ma. Esther., por su valiosa colaboración en la aplicación de la técnica para observar las muestras en microscopio electrónico de barrido.

A la M. en C. Socorro Sánchez Correa, por sus interesantes comentarios al trabajo escrito y por su asesoramiento en técnicas bromatológicas.

Al M. en C. Ismael Aguilar Ayala por sus comentarios al presente trabajo.

Al M. en C. Manuel Mandujano Piña, por sus comentarios y sugerencias al trabajo escrito.

A la M. en C. Josefina Vazquez Medrano por ser como es, por el gran ejemplo que es para mi y mil, gracias por sus comentarios para enriquecer mi trabajo.

Debo agradecer a la persona que además de ser mi asesor, ha sabido ser un gran amigo, ejemplo, ayuda y guía para mi formación no sólo profesional si no como persona, a mi profesor Juan Gerardo Ortiz Montiel, M. en C.

Finalmente debo agradecer a mis compañeros de laboratorio, Goyo, Oscar, Yola y Coca por la tolerancia, apoyo, ayuda, y buena convivencia para poder trabajar juntos.

INDICE.

	Pág.
Resumen	1
1 INTRODUCCIÓN.	2
1.1 Fruto y semilla de encinos	3
1.2 Recalcitrancia	4
1.3 Almacenamiento	7
1.4 Breve descripción e importancia de las especies estudiadas	8
1.4.1 <i>Quercus rugosa</i>	8
1.4.2 <i>Quercus crassipes</i>	8
2 JUSTIFICACIÓN	9
3 ANTECEDENTES	10
3.1 Almacenamiento y viabilidad	10
3.2 Estructura del pericarpio	12
3.3 Presencia de proteínas, lípidos y azúcares	12
4 HIPOTESIS	14
5 OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares	15
6 MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1 Material vegetal	15
6.2 Almacenamiento y pérdida de viabilidad	16
6.2.1 Almacenamiento	16
6.2.2 Determinación del contenido de humedad	18
6.2.3 Porcentaje de humedad	19
6.3 Microscopia electrónica de barrido	20
6.3.1 Análisis y descripción del pericarpio de las semillas de <i>Quercus rugosa</i> y <i>Quercus crassipes</i>	21
6.4 Cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos totales.	22
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	25
7.1 Almacenamiento con impermeabilización sobre pérdida de agua y germinación	25
7.2 Estructura del pericarpio	35
7.3 Contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos totales	40
8 CONCLUSIONES	42
Sugerencias	43
Apéndice 1 y 2	44
Referencias Bibliográficas.	45

RESUMEN

México es el país que presenta el mayor número de especies de encino, sus bosques han sido devastados por diversos factores, por lo que la repoblación es un problema que aún no tiene solución. Las características recalcitrantes de las semillas de encino han conducido a buscar alternativas de almacenamiento de estas para lograr una propagación *ex situ*. Por lo que es necesario estudiar las características fisiológicas, anatómicas y bioquímicas del mayor número posible de especies de *Quercus* a fin de lograr una mayor comprensión del problema. En la presente investigación se evaluaron cinco tratamientos de almacenamiento bajo impermeabilización con barniz y cera (0, 50, 75, 90, 100%), en las especies de *Quercus rugosa* y *Quercus crassipes*, además se analizó y describió la estructura del pericarpio de ambas especies con observaciones en Microscopio Electrónico de Barrido, se cuantificó el contenido total de proteínas, lípidos y carbohidratos presentes en las semillas de ambas especies. Las semillas de *Quercus crassipes* presentaron una menor capacidad de ser almacenadas al perder entre 36 y 39% de su peso fresco. No así *Quercus rugosa* quien tuvo una pérdida de entre 6 a 16% de su peso fresco en semillas impermeabilizadas con cera y de 12 a 17% con barniz. Demostrando con esto que la cera es más eficiente para conservar la humedad en las semillas que el barniz. *Quercus crassipes* presentó el pericarpio más ancho que *Quercus rugosa*, además las capas que conforman este pericarpio de *Quercus crassipes* son más anchas que sus respectivas de *Quercus rugosa*, sin embargo fue *Quercus rugosa* quien presentó una menor pérdida de agua. *Quercus rugosa* presentó 20.57% de lípidos y 2.24% de carbohidratos como reserva energética y *Quercus crassipes* 7.78% de proteínas y 1.97% de carbohidratos.

Palabras clave: *Quercus*; semillas; recalcitrancia; almacenamiento; viabilidad.

I INTRODUCCION

Los Encinos comprenden el género taxonómico *Quercus*, el cual pertenece a la familia Fagaceae del orden Fagales (Zavala, 1996). México es el país que posee el mayor número de especies, Nixon (1993) reporta 135 y Rzedowski (1988) reporta 150, la mayoría de estas especies son endémicas, Bonfil (1993) estima unas 125 aproximadamente. Estos forman un grupo de árboles y arbustos decíduos y perennifolios y constituyen la agregación de maderas duras más importante en Norteamérica. Los encinos representan una gran riqueza biológica para México y junto con el género *Pinus* constituyen la mayor parte de la cubierta vegetal de áreas de clima templado y semi húmedo además forman parte de la vegetación de climas calientes, son elementos del bosque tropical perennifolio y bosque mesófilo de montaña y existen en las regiones semiáridas siendo parte del matorral xerófilo asumiendo forma arbustiva (Rzedowski , 1988).

La riqueza económica que para México representan, también es innegable. Estos han sido utilizados para elaborar carbón que junto con la leña fue el principal combustible de uso doméstico durante siglos, lo que causó la desaparición de muchos bosques y tuvo un fuerte impacto en otros (Bonfil, 1993). La madera de encino aún se emplea para construcciones, muebles, postes y otros usos. La corteza de muchas especies de *Quercus* y las agallas que forman en sus hojas, son ricas en taninos y se utilizan para la curtiduría (Rzedowski, 1988).

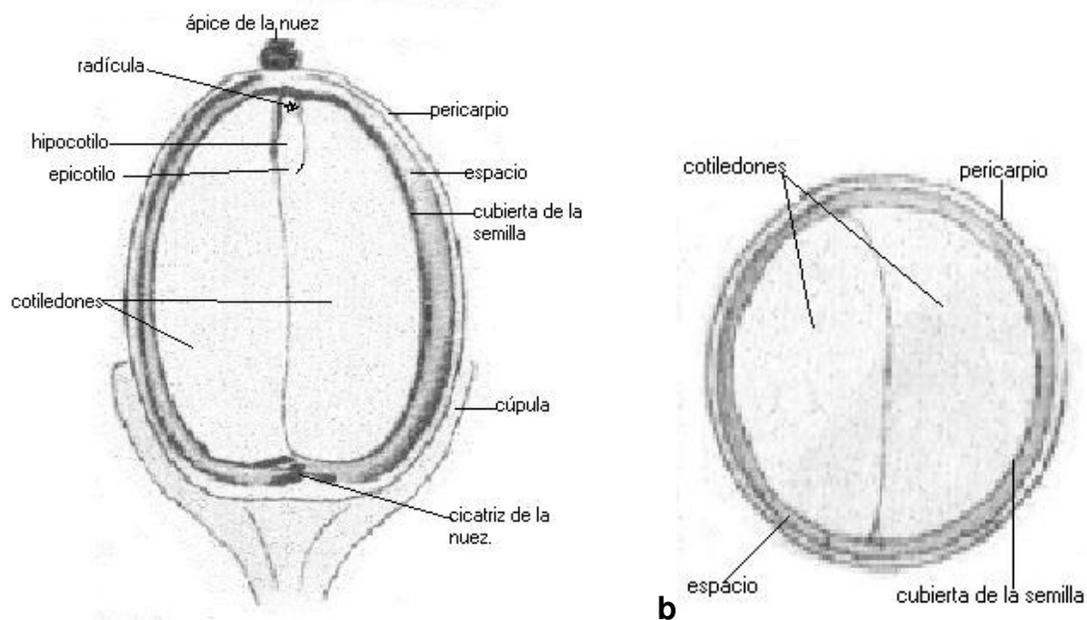
El factor que ha afectado mayormente la distribución de los encinos es el cambio climático y esto podría acentuarse a causa del deterioro ambiental por diversos factores (sobreexplotación de recursos naturales, cambios en el uso del suelo, incendios, etc). Según Challenger (1998), la actividad forestal ha causado la disminución de especies en particular, los bosques de pino-encino. El fuego provoca cambios en la composición y estructura de las comunidades de encinos, las cuales mueren por completo porque no resisten los incendios o porque no se reproducen los árboles dominantes (Rzedowski, 1988).

La reforestación con encinos es un problema que aún no ha sido resuelto, debido a que en muchos lugares no hay incorporación de plantas juveniles y esta es exitosa sólo si las densidades de plántulas en el bosque son relativamente altas. Sin embargo, las observaciones indican que cada especie difiere en sus requerimientos fisiológicos, por lo que parte del problema de repoblación es generar el desarrollo de tecnología a partir de la información generada de unas pocas especies estudiadas. Al respecto Zavala (1996), sugiere que se deben estudiar el mayor número de especies a fin de lograr lo pretendido en cuestión de repoblación, faltando por conocer las especies que podrían reproducirse en vivero de manera exitosa atendiendo a las diferentes técnicas de propagación y el comportamiento *in situ* y *ex situ* de dichas especies.

1.1 FRUTO y SEMILLA DE ENCINOS.

Los encinos son árboles y arbustos monoicos, con su fruto desarrollado característicamente en una nuez. Esta se encuentra asociada a un involucro en forma de copa (cúpula) alrededor de la base de la nuez madura y conectada a ella. El término bellota se utiliza para hacer referencia a la nuez junto con la cúpula. La bellota sin cúpula es el fruto en nuez, esta contiene una semilla carente de endospermo, con un embrión recto y con dos cotiledones. Cabe aclarar que el fruto de los encinos, refiriéndolo como bellota o nuez, comúnmente es sustituido en la literatura por el nombre de semilla, el pericarpio de esta nuez es la cubierta externa del fruto y es muy diferente a una testa de semilla la cual es muy delgada y suave (Zavala, 1996). **(figura 1 y 2).**

Debido a las diferencias fisiológicas que he observado en los frutos de los encinos, estos no permiten hacer generalizaciones acerca de sus aspectos fisiológicos, debido a que éstos son tantos y tan diversos, que muchos de ellos pueden ser diferentes en sus requerimientos. Además como en la mayoría de las plantas silvestres, se carece de información para cada una de las especies que componen al género que ayude a hacer un uso adecuado de ellas.



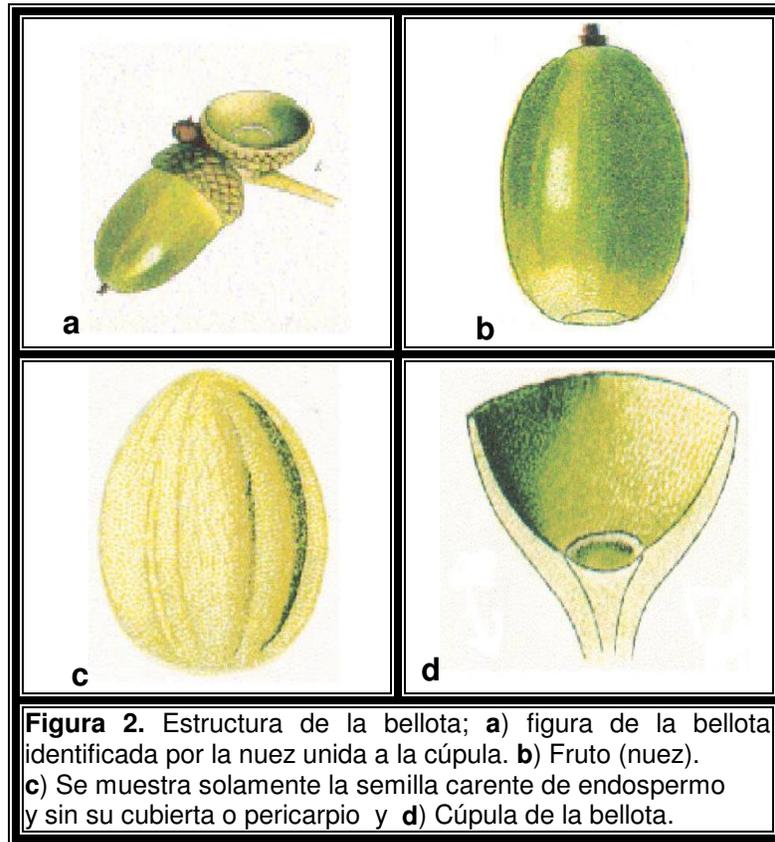
a
Figura 1. Esquema de la semilla de *Quercus*. **a)** corte longitudinal; **b)** corte transversal. (Zavala, 1996).

1.2 RECALCITRANCIA

Las semillas de los encinos se caracterizan entre otras cosas, por ser típicamente recalcitantes. Estas también llamadas no ortodoxas son las que necesitan retener un alto contenido de humedad para continuar siendo viables (Zavala, 1996).

El término semillas recalcitantes fue propuesto por Roberts (1973), en oposición al de semillas ortodoxas. Las semillas recalcitantes son intolerantes a la desecación y pierden su viabilidad (capacidad germinativa), cuando su contenido de humedad desciende por debajo del rango del 40 al 50% de su peso fresco (Black y Derek, 2000). Alternativamente, Hanson (1984) ha usado otra terminología para describir el mismo fenómeno, dividiendo las semillas en sensibles a la desecación y no sensibles. En otros trabajos se muestran descripciones similares dependiendo de los grados de intolerancia a la desecación, estas pueden ser tolerantes a la desecación, de vida larga o especies ortodoxas y a su vez sensibles a la desecación, de vida corta o especies

recalcitrantes (Farrant et al., 1988; Bonner, 1990, citados por Black y Derek, 2000; Hartman y Kester, 1991).



Las semillas recalcitrantes difieren de las ortodoxas principalmente en los pasos que siguen hacia la dormancia. La gran mayoría de las semillas ortodoxas siguen cronológicamente el siguiente desarrollo; a) crecimiento del embrión y diferenciación de los tejidos; b) expansión de la semilla, deposición de reservas y relleno vacuolar; c) desecación interna, diferenciación de organelos y estabilización de las membranas; d) metabolismo quiescente; e) imbibición, movilización de las reservas y reanudación del metabolismo en respuesta a señales del ambiente y f) germinación (Farnsworth, 2000). Las semillas recalcitrantes carecen de dormancia, y el desarrollo de la semilla, la germinación y el establecimiento representan un continuo (Black y Derek, 2000), por lo tanto los pasos de maduración y secado y consecuentemente el metabolismo quiescente son omitidos procediendo directamente a la fase de germinación (Farnsworth, 2000).

En especies recalcitrantes la pérdida de agua metabólica durante el prolongado secado, es acompañada frecuentemente por la fusión de vacuolas, la vesiculación del retículo endoplásmico y la peroxidación de lípidos y componentes proteicos de la membrana celular, lo que lleva eventualmente a un colapso celular y por lo tanto a la muerte del embrión (Hendry, 1993; Smirnoff, 1993; Pammenter, 1994; Oliver, 1997, en Farnsworth, 2000). La germinación de las semillas, su crecimiento, la integridad del ADN, la síntesis de proteínas, la estructura de la membrana, la formación de los organelos, y el desarrollo normal del embrión se interrumpen cuando los niveles de humedad interna del embrión se encuentran en un punto crítico (Macintyre, 1987; Kermode, 1990; Osborne, 1994; en Farnsworth 2000). Además se ha observado que la cantidad de electrolitos presentes en las semillas, disminuye como va disminuyendo la viabilidad (Chaitanya y Naithani, 1994). Así también se ha relacionado la presencia o ausencia de azúcares solubles con la pérdida de tolerancia a la desecación entre los cuales se menciona a los oligosacáridos (Koster y Leopold, 1988). Algunas proteínas comunes también son asociadas con la adquisición de tolerancia a la desecación, algunas de estas proteínas son producidas por los tejidos de las semillas durante los períodos de estrés hídrico, aunque actúan también durante otro tipo de estrés por lo que se le confiere a estas múltiples funciones de protección (Farnsworth, 2000). Se ha relacionado a la cubierta de la semilla con la tolerancia a la desecación al presentar características de semipermeabilidad y estar compuesta de una capa cerosa y una acumulación de callosidades que regula la entrada y salida del agua (Yim y Bradford, 1990).

Las semillas recalcitrantes de los encinos no son tolerantes a la desecación durante la maduración, por lo cual se deben estudiar estrategias para la conservación de bancos de semillas para la actividad forestal.

1.3 ALMACENAMIENTO

Los bancos de semillas son un recurso natural muy apreciado, sin embargo la regeneración de las especies no depende solamente de la persistencia de las semillas en el suelo, sino del almacenamiento de estas para un uso posterior (Black y Derek, 2000).

El objetivo general del almacenamiento es mantener una cantidad de semillas viables desde que son recolectadas hasta el momento en que serán requeridas para la siembra. La duración del almacenamiento dependerá de las características propias de la semilla así como de las condiciones ambientales. La viabilidad de la semilla se ve afectada principalmente por el contenido de humedad de esta, la temperatura y la atmósfera de almacenamiento, el contenido de humedad determinará la duración del almacenamiento (Hartman y Kester, 1991). Sin embargo un aumento en la humedad de las semillas puede provocar problemas tales como; reproducción de insectos, actividad de hongos, calentamiento e incluso provocar la germinación de la semilla.

El almacenamiento de semillas recalcitrantes debe hacerse en lugares donde se realice un adecuado intercambio gaseoso para evitar el calentamiento de las semillas, además de que requieren de la existencia de oxígeno para mantener su viabilidad, así como la presencia de una buena proporción de humedad. (Hartman y Kester, 1991).

Generalmente el almacenamiento de las semillas de *Quercus* es importante para su protección y debe ser considerado en los tratamientos para la repoblación de encinos. Aún cuando estas semillas sean almacenadas en condiciones de humedad, su periodo de vida es frecuentemente breve y sólo excede ocasionalmente pocos meses (Zavala, 1996), por lo que se requieren estudios enfocados a mantener o alargar el período de viabilidad.

1.4 BREVE DESCRIPCON E IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.

1.4.1 *Quercus rugosa*.

Es un árbol que según Bello y Labat, (1987) mide de 3-25 m de alto, y el diámetro de su tronco mide 10-80 cm o más y para Romero et al., (2002), mide de 5-30 m de alto y el diámetro de su tronco 1 m o más. Tiene una distribución continua en la cordillera Neovolcánica, forma parte del matorral subtropical o del bosque mesófilo de montaña, pero generalmente en bosques de pino-encino, encino-pino, encino y en el bosque de oyamel.

Sus nombres comunes son: encino roble, encino prieto, encino de miel, encino negro, sharari y tocas (Bello y Labat, 1987), encino quebracho, doga, encino hojarasca, encino cuero, encino asta, encino avellano, encino quiebra hacha (Romero et al., 2002)

Sus usos son para leña, carbón, postes para cerca, cabos para herramienta, elaboración de café con la bellota y está se usa como forraje (Vazquez, 1992). La corteza se utiliza para curar la disentería, dolor de muelas, hemorragias y fortalecimiento de los dientes (Chino y Jacques, 1986 citados por Romero et al., 2002).

1.4.2 *Quercus crassipes*.

Bello y Labat (1987) lo describen como un árbol que mide de 10-35 m de alto y el diámetro de 15-100 cm ocasionalmente más. En el 2002 Romero et al., lo presentan como un árbol que mide 4-17 m de alto o más, con el tronco de 0.40-1 m de diámetro. Se distribuye en la parte norte, sur, central y oeste de la cordillera Neovolcánica, se les encuentra en bosques de encino, encino-pino, encino-*cupressus*, bosque mesófilo de montaña, matorral xerófilo, en sitios de transición de pastizal a bosque mixto.

Bello y Labat (1987), mencionan sus nombres comunes, los cuales son; encino pepitillo, encino colorado, encino prieto, encino laurelillo, encino capulincillo, encino roble, encino blanco y encino chilillo. Para Romero et al., (2002), los nombres que mencionan son, encino oreja de ratón y encino laurel.

Sus usos son los siguientes: Romero et al., (2002), recomienda su madera para pisos de residencias, auditorios, museos, almacenes, pista de baile, para chapa fina, muebles de alta calidad ebanística, lambrín, cocinas integrales, baúles, canastos, macetas, mangos para herramientas, hormas para zapatos y cajas para piano. Bello y Labat (2002), exponen un uso regional tal como: leña, carbón, postes para cerca, cabos para herramienta, azadones, horcones, artesanías, y plataformas para camiones.

2. JUSTIFICACION

México es uno de los centros de diversificación del género *Quercus*, estos encinos representan una gran riqueza biológica y económica para nuestro país. Las semillas de los encinos están consideradas dentro de las clasificadas como recalcitrantes, asociados a la recalcitrancia existen aspectos bioquímicos tales como la existencia de moléculas (electrolitos, azúcares solubles, proteínas y lípidos), las cuales confieren tolerancia a la desecación, así como la composición y estructura de la cubierta de este tipo de semillas las cuales funcionan como barrera física para evitar la pérdida de agua, por esto se deben estudiar estrategias para la conservación y almacenamiento de semillas para la actividad forestal, y así poder ayudar a la restauración de comunidades afectadas por los incendios, tala, entre otros usos.

3. ANTECEDENTES.

3.1 Almacenamiento y viabilidad.

Vertucci C.W. et al. (1994), trabajaron con semillas de chícharos, sometiéndolas a diferentes condiciones de humedad relativa, diferentes temperaturas y a la luz y a la sombra y encontraron que las condiciones óptimas de almacenamiento fueron de 0.015g H₂O g⁻¹ de su peso seco a 65°C y 0.101g H₂O g⁻¹ de su peso seco a 15°C bajo condiciones de sombra, y de 0.057 a 35°C a 0.092g H₂O g⁻¹ de su peso seco a -5°C bajo condiciones de luz, y concluyeron que el contenido de humedad no es independiente de la temperatura de almacenamiento.

Pérez-García y Aguinagalde (1995), trabajaron con semillas de *Brassica* clasificadas como ortodoxas o resistentes a la desecación, almacenándolas en un período de tiempo largo de 22 años a -10°C y 3% de contenido de humedad, y un período corto de 5 años bajo 5°C con un 8% de contenido de humedad, al final evaluaron el porcentaje de germinación y la actividad enzimática de ACO, IDH, MDH, ME, PGI, PGM y 6-1'GD, aunque solo hubo cambios en el sistema enzimático ADH. En ninguna de las dos condiciones de almacenamiento hubo deterioro, sin embargo en el período corto se prolongaron las condiciones de germinación, por lo que este resultado ser más favorable.

Probert y Longley (1989) compararon la respuesta de tres especies de semillas recalcitrantes, *Zizania palustris*, *Spartina anglica* y *Porteresia coarctata*, a las siguientes condiciones de almacenamiento; bajas temperaturas (2°C), ambiente estéril y sumergidas en agua, registrando la germinación y el declive de la dormancia al final del experimento. Los resultados que obtuvieron demostraron que a pesar de que *Zizania palustris* y *Spartina anglica* lograron ser almacenadas durante un período relativamente largo de tiempo (26 semanas), no hubo evidencia de un efecto significativo de la dormancia o el período de almacenamiento sobre los límites de tolerancia a la desecación.

En otro trabajo realizado por Nwankwo y Krikorian (1983) con *Elaeis guineensis* (psifera), a la cual almacenaron bajo condiciones estériles con agua durante 6 meses, manteniendo sellados los recipientes y realizando cambios de agua para mantener las condiciones estériles (a $\pm 30^{\circ}\text{C}$). Encontraron que el porcentaje de germinación varió entre 66 y 67%, lo que implicó que las semillas necesitaron de una baja concentración de oxígeno durante el almacenamiento en agua relacionando los requerimientos de oxígeno con el éxito del almacenamiento.

Pritchard (1990) trabajo con semillas de *Quercus rubra*, almacenándolas bajo tres condiciones: a 2°C , con 45% de humedad durante 70 días; a 15°C con 15% de humedad durante 6 días y a 26°C con 35% de humedad durante 3 días, monitoreando el potencial hídrico y la capacidad germinativa. Los cambios comenzaron a observarse entre 45 y 20% de contenido de humedad y la pérdida de la viabilidad se presentó entre -5MPa y -3MPa (humedad de las semillas), al no germinar estas.

Grange y Finch-Savage (1992) midieron el contenido de humedad y el potencial hídrico de semillas de *Quercus robur* con cotiledones y en embriones separados y encontraron que el contenido de humedad decrece durante el desarrollo de la semilla y el potencial osmótico crece concluyendo que la mayor parte de agua almacenada puede estar en los cotiledones. Ese mismo año Finch-Savage continuó trabajando con *Quercus robur*, almaceno sus semillas a 20°C y retiró el pericarpio de ellas llevando a secado un grupo con embrión y otro con embrión y cotiledón, monitoreando el contenido de humedad. Los embriones separados sobrevivieron a un menor contenido de humedad que las semillas intactas, por lo que el nivel de tolerancia a la desecación estuvo sujeto a los cotiledones. Además existe determinado contenido crítico de humedad para la supervivencia de las semillas el cual está determinado por la pérdida de agua libre celular.

3.2 Estructura del Pericarpio.

Los antecedentes sobre la estructura del pericarpio de las semillas de *Quercus* son prácticamente nulos, sin embargo existen trabajos sobre endospermo, entre los cuales se encuentra uno realizado por Welbaum et al. (1994), quienes trabajaron con endospermo de la semilla de melón analizando su estructura y realizando observaciones en microscopio electrónico de barrido antes, durante y después de la imbibición. Encontraron la presencia de dos capas, una adyacente al embrión y otra externa y la aparición de grietas más grandes después de la imbibición la cual ocurrió después de 48 horas.

1998 Welbaum et al. (1998), estudiaron los procesos fisiológicos, bioquímicos y biofísicos que regulan la germinación de las semillas de melón y realizaron observaciones en microscopio electrónico de barrido, describiendo los tejidos principalmente el endospermo. El tejido perispérmico estuvo compuesto de una sola capa de células endospérmicas cubiertas por un depósito de callos. Esta capa callosa fue de naturaleza cerosa la cual fue removida con cloroformo y la cual proporciona características de semipermeabilidad a la semilla de melón para regular la entrada y salida de solutos así como de agua.

3.3 Presencia de proteínas, lípidos y azúcares.

La presencia de azúcares proteínas y lípidos además de intervenir en las actividades celulares, así como servir como sustrato para estas actividades y de formar parte de la estructura de las células, tienen importancia en la adquisición de tolerancia a la desecación (Farnsworth, 2000), y así lo demuestran los siguientes trabajos:

Shewry et al. (1995), realizaron una revisión de varios trabajos sobre las proteínas que pueden estar almacenadas en las semillas de varias especies, entre estas encontraron que los cereales presentaron un 10%, las legumbres y semillas

oleaginosas un 40% con relación a su peso seco. Las que mayormente fueron almacenadas en las semillas incluye a las albúminas, globulinas y prolaminas.

Gifford y Tolley (1989), trabajaron con *Picea glauca*, donde extrajeron y caracterizaron a las proteínas, cuantificándolas durante el desarrollo hasta la germinación. La mayor cantidad se presentó en el megagametofito y fueron encontradas pequeñas cantidades en el embrión. Al acercarse a la germinación las reservas fueron rápidamente hidrolizadas en ambos tejidos y se presentó actividad de leucina-naftilamidasa (leuNAase). Siguiendo a la germinación esta actividad se mantuvo en el megagametofito no así en el embrión donde se incrementó, por lo que concluyeron que probablemente juegan un muy importante papel nutricional durante el desarrollo de las semillas

Finch Savage et al. (1993), identificaron las proteínas de tres especies de árboles recalcitrantes entre ellos *Quercus robur* asociando estas a la sensibilidad que tienen estos a la desecación, encontraron que para *Quercus robur* la cantidad de proteínas incrementa durante el desarrollo de las semillas y LEA mRNA fue inducido por los límites de tolerancia a la desecación y por el ácido abscísico.

Fonseca et al. (1997), extrajeron y caracterizaron las proteínas contenidas en los cotiledones de las semillas de *Quercus suber*. Dentro de sus resultados obtuvieron que las proteínas representan el 5.03% del total de la semilla, los carbohidratos el 53.34% y por último el agua un 40.86%. Los anteriores valores coincidieron con los reportados por Natividade en 1950, con 4.03% para proteínas, 49.12% para carbohidratos y 40.58% para contenido de agua. Encontraron que en base a criterios de solubilidad la mayor parte de proteínas son las glutelinas.

Chaitanya y Naithani (1993), evaluaron el papel de la super-oxidación, lipo-peroxidación y la superoxido dismutasa en la perturbación de la membrana durante la pérdida de la viabilidad en semillas recalcitrantes de *Shorea robusta*. Encontraron que el 100% de la viabilidad se conserva hasta el 4to día a 37% de

humedad. A los 8 días hubo pérdida de electrolitos y comenzó el declive de la viabilidad. Los niveles de lipo-peroxidación se mantuvieron en cero hasta el cuarto día y la acidez aumentó hasta el séptimo día. Por lo que la pérdida en el contenido de humedad en el límite de 37% indujo la pérdida de la viabilidad debido al incremento de la lipo-peroxidación y a la formación de radicales libres O_2^- los cuales son responsables de daños severos en la membrana.

Koster y Leopold (1988), estudiaron las semillas ortodoxas de soya *Glycine max*, chícharos *Pisum sativum* y cereal *Zea mays*. Monitorearon la tolerancia a la desecación cuantificando el porcentaje de germinación, porcentaje de electrolitos y contenido de azúcar soluble durante la transición de tolerancia a la desecación hacia la intolerancia, llevando estas semillas a secado. Se encontró que la sacarosa estuvo presente durante todo el período de tolerancia y esta desapareció cuando los oligosacáridos disminuyeron. Este resultado dio validez a la idea de que la sacarosa otorga tolerancia a la desecación a las semillas

4. HIPOTESIS

Si la viabilidad de las semillas de *Quercus* se debe a la pérdida de agua entonces si se puede evitar la pérdida de esta última con ayuda de un impermeabilizante se puede alargar la capacidad germinativa de las semillas. Además la cantidad y el tipo de reservas energéticas también contribuyen a alargar la viabilidad de la semilla. Y por último la cantidad y el tamaño de poros existentes en el pericarpio de las semillas pueden determinar la pérdida de agua de estas.

5 OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO GENERAL.

-Evaluar algunos factores fisiológicos, anatómicos y bioquímicos que puedan intervenir en la pérdida de la viabilidad de semillas de *Quercus rugosa* y *Quercus crassipes*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar el efecto del almacenamiento de la semilla *Quercus rugosa* y *Quercus crassipes* bajo impermeabilización con barniz y cera (0, 50, 75, 90 y 100 % cubiertas), sobre la pérdida de viabilidad.

- Cuantificar el porcentaje de germinación de las semillas de *Quercus rugosa* y *Quercus crassipes* sometidas a diferentes tratamientos de impermeabilización.

- Describir y analizar la anatomía estructural del pericarpio de la semilla de *Quercus rugosa* y *Quercus crassipes*.

- Cuantificar el contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas totales en semillas de *Quercus rugosa* y *Quercus crassipes*.

6 MATERIAL Y METODOS

6.1 MATERIAL VEGETAL

La recolección de las semillas de la especie *Quercus rugosa* se realizó en Tlalpujahua en el estado de Michoacán entre los 19°48'20" latitud norte y los 100°10'47" longitud oeste a una altitud de 2,580 msnm, durante los primeros días del mes de enero del 2003.

Las semillas de la especie *Quercus crassipes*, se colectaron en el poblado los Molinitos, en el municipio de Villa del Carbón Estado de México, entre las coordenadas 19°40'30" latitud norte y 99°26'21" de longitud oeste a una altura de 2,610 msnm., (fuente: INEGI, 1998) durante los primeros días del mes de octubre del 2003.

Se seleccionaron las semillas por flotación en agua, eligiendo sólo aquellas que no presentaron perforaciones o infestación por larvas de gusanos curculidos (Hartmann y Kester, 1991), se limpiaron y se almacenaron a 5°C.

La identificación de las especies de las semillas se realizó después de haber sido colectadas con las claves de identificación para *Quercus* del estado de México (Romero et al, 2002) y de encinos para Michoacán (Bello y Labat, 1987), posteriormente se verificaron los ejemplares con la Dra. Silvia Romero Rangel del herbario de la FES Iztacala.

6.2 ALMACENAMIENTO Y PÉRDIDA DE VIABILIDAD.

6.2.1 Almacenamiento

Se formaron 5 tratamientos de 20 semillas tanto para *Quercus rugosa* como para *Quercus crassipes*, las cuales se cubrieron con barniz transparente para uñas marca AVON cosméticos (apéndice 2), Méx. a diferentes proporciones, (**figura 3**).

Tratamiento 1: Sin cubrirlas

Tratamiento 2: Cubiertas en un 50%

Tratamiento 3: Cubiertas en un 75%

Tratamiento 4: Cubiertas en un 90%

Tratamiento 5: Cubiertas en un 100%

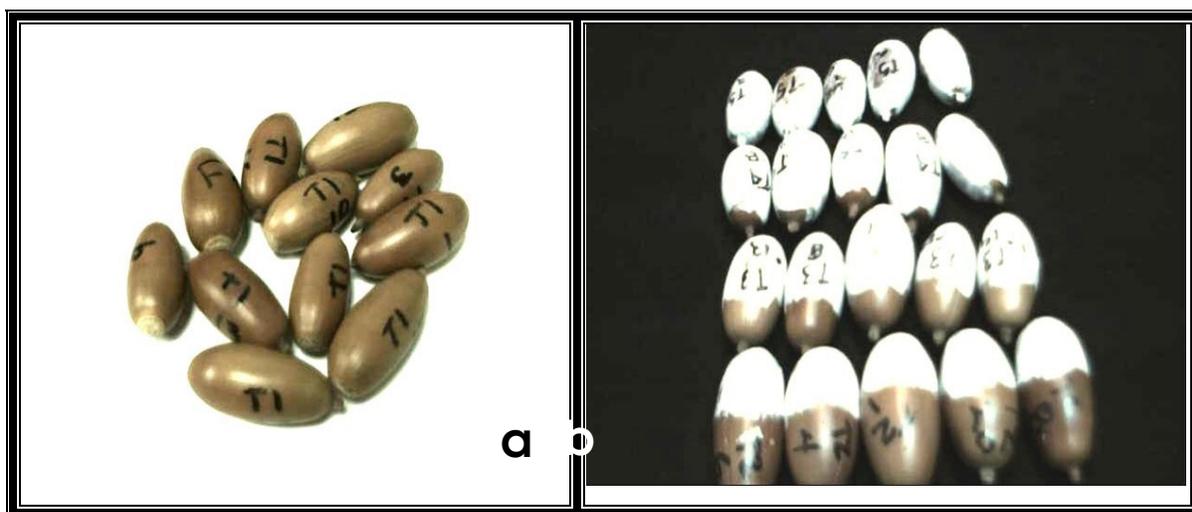


Figura 3. Tratamientos bajo impermeabilización con barniz a) tratamiento sin cubrir, b) de atrás hacia delante; tratamiento 100% cubiertas, tratamiento 90% cubiertas, 75% cubiertas y 50% cubiertas (*Quercus rugosa*).

El almacenamiento con impermeabilización se realizó a 24° C con un 45% de H.R., libre de corrientes de aire, a partir de los 10 días después de haberse obtenido las semillas en ambas especies.

En el caso de *Quercus rugosa* se formaron otros cinco grupos cubriendo las semillas con parafina comercial con punto de fusión a 70° C fabricado por PROFINA, México. (figura 4).



Figura 4. a y b; tratamientos de impermeabilización con cera, de atrás hacia delante, 100% impermeabilizadas, 90% cubiertas, 75% cubiertas y 50% cubiertas (*Quercus rugosa*).

Para *Quercus crassipes* no se realizó este experimento debido a la alta humedad que presentaron las semillas y a que el agua que perdían no permitió el poder encerarlas.

Se evaluó el peso de las semillas tomando este, cada tres a cuatro días durante dos meses en el caso de *Quercus rugosa* y durante un mes y medio para *Quercus crassipes* para esta última se escindieron las semillas al término de los tratamientos y se observaron deterioradas en cuanto a calidad y viabilidad se refiere (Villagómez et al., 1979 y Bonner, 1993; en Galín, 1999).

Al finalizar los tratamientos se compararon entre sí, aplicando ANOVA simple entre tratamientos y ANOVA para dos factores entre especies y entre materiales, aplicando su respectiva prueba de Tukey cuando se presentaron diferencias.

Se obtuvieron los valores promedio en gramos peso para cada día aplicando la desviación estándar y graficando estos contra días de almacenamiento.

6.2.2 Determinación del contenido de humedad.

La valoración del contenido de humedad total de las semillas se realizó sobre un lote de 20 semillas de *Quercus rugosa* y otro lote de 20 semillas también para *Quercus crassipes*, cada grupo se llevó a secado en una estufa a 70° C hasta peso constante. Se obtuvo el valor del peso promedio de estos lotes antes y después del secado y la diferencia entre ambos se consideró como el peso del agua perdida durante el secado. Este valor se tomó como referencia para compararlo con los valores obtenidos al final de cada tratamiento de almacenamiento bajo impermeabilización.

Se graficaron los resultados en porcentaje de pérdida total de agua aplicando la desviación estándar a cada tratamiento y se compararon entre sí.

6.2.3 Porcentaje de germinación.

Se determinó la capacidad germinativa de un lote de 50 semillas de *Quercus rugosa* puestas a germinar en bolsas de plástico con agua, cambiando esta agua frecuentemente para evitar la oxidación y contaminación presente. Para *Quercus crassipes* se realizó el mismo procedimiento con tan sólo 25 semillas puestas a germinar. Se tomó un registro a los ocho días y otro a los 15 días, considerando sólo este último.

Se obtuvo el porcentaje de semillas germinadas con respecto al total, para utilizarlo como índice externo y realizar las comparaciones con los valores obtenidos de germinación de los nuevos tratamientos propuestos para almacenamiento (ISTA, 1993).

Al término del almacenamiento, todas las semillas de cada uno de los tratamientos bajo impermeabilización se germinaron en recipientes de plástico con tierra estéril para obtener el porcentaje de germinación de cada uno de estos con la siguiente fórmula.

$$\% = a / b \times 100$$

donde **a** es el número de semillas germinadas, **b** el número total de semillas puestas a germinar y 100 el valor porcentual del recuento.

Se consideró como semillas germinadas a las que produjeron una radícula de 5 mm de longitud, (Farrant, et al. 1986; Chaitanya K.S.K. y Chandra N.S., 1994). **(figura 5).**



Figura 5. Semillas con formación de radícula consideradas como germinadas.

6.3 MICROSCOPIA ELECTRONICA

Se desprendió la cubierta de la semilla de cada una de las especies estudiadas, cortando muestras que no sobrepasaron un milímetro de ancho y un centímetro de largo, se realizaron cortes en sentido transversal de la cubierta de la semilla y también en sentido longitudinal de cada una de las especies.

Las muestras ya cortadas se fijaron en Glutaraldehído al 2% durante una hora. Después se realizaron tres lavados consecutivos durante 10 minutos cada uno, con solución amortiguadora.

La postfijación se realizó con Tetraóxido de Osmio al 1% (O_4O_3), durante una hora. Al término de este tiempo se realizaron otra serie de tres lavados, con solución amortiguadora durante diez minutos para cada lavado.

La deshidratación comprendió un tren de soluciones con alcohol etílico de la siguiente manera: 10 minutos en alcohol al 50%, 10 minutos en alcohol al 60%, 10 minutos en alcohol el 70%, 10 minutos en alcohol al 80%, 10 minutos en alcohol al 90%, 15 minutos en alcohol al 100% y por último otros 15 minutos en alcohol al 100%.

Al término de la deshidratación las muestras se sacaron y se colocaron en pequeños sobres de papel filtro ya rotulados con los nombres de las especies correspondientes. Se secaron a punto crítico con CO_2 durante 15 minutos a $38^\circ C$ y a una presión de 1300 libras en un secador Samdri-7803, E.U.A.

Para el montaje, los porta muestras se limpiaron con pasta limpiadora y después se colocaron en un sonicador Branson 1510, E.U.A. durante 20 minutos para desprender todos los residuos.

Se extrajeron las muestras ya secas de los sobres y se colocaron de manera ordenada; en un porta muestras cortes longitudinales de *Quercus rugosa* y en otro cortes transversales de esta, y lo mismo para *Quercus crassipes*. Las muestras fueron fijadas en los porta muestras con cinta conductiva Cat #70030 Diamond Tip Scriber, E.U.A., que además sirvió para captar los iones de oro.

El último paso fue cubrir las muestras con 3 µm de oro en un equipo ionizador de oro Denton Vacuum Desk II, E.U.A. durante cuatro minutos a una presión de 100 millitorr y una corriente de 15 milliamps.

Se observaron las muestras y se fotografiaron bajo microscopio electrónico de barrido, para su posterior análisis (JFM 5800 LV, JEOL, Inc. E.U.A.). La anterior técnica fue la descrita por Bozzola y Russell (1998).

6.3.1 Análisis y descripción del pericarpio de las semillas de *Quercus rugosa* y *Quercus crassipes*.

Se contó el número de capas y se describió la ornamentación de la zona externa de la cubierta de la semilla. Además de describir la posición y forma de cada capa que conforma el pericarpio de la semilla. Se utilizó el número de aumentos y la escala de las fotografías para realizar una comparación entre las dos especies estudiadas en cuanto a dimensiones como fue grosor de las capas, número promedio de orificios de cada capa, tamaño de los orificios.

6.4 CUANTIFICACION DE PROTEINAS, AZUCARES Y LIPIDOS.

La determinación tanto de lípidos, azúcares así como para proteínas se realizó sobre muestras previamente secadas en estufa a 70°C, hasta obtener peso constante, triturando las muestras hasta reducirlas a polvo. Sólo se utilizó la semilla como tal sin considerar el pericarpio, ya que los antecedentes sólo hacen referencia a la composición química de semillas que carecen de este pericarpio y sólo presentan endospermo. Se realizaron tres repeticiones para cada determinación.

La cuantificación de azúcares totales se realizó mediante el método de Fenol-Acido-Sulfúrico (Dubois, 1956). Para realizar la curva patrón se hizo una solución de sacarosa al 0.06 M. diluida 1/70. Agregando en el siguiente orden las

cantidades correspondientes a cada tubo 1,2,3,4 y 5; 0.000, 0.025, 0.050, 0.075 y 0.100 ml de solución de sacarosa, añadiendo 1 ml de fenol y 5 ml de ácido sulfúrico a cada tubo.

La muestra problema se hizo con 100 mg de muestra tanto de *Quercus rugosa* y como de *Quercus crassipes*, diluidas en 10 ml de agua destilada cada una por separado; de estas solamente se tomo una alícuota de 0.1 ml añadiendo también 1 ml de fenol y 5 ml de ácido sulfúrico. Se dejaron todos los tubos reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente 22° C y 20 minutos a 33° C dentro de la estufa.

La lectura se realizó a una absorbancia de 490nm. Para calcular la concentración de azúcares totales presentes en las muestras problema se realizó un modelo de regresión lineal con la curva patrón antes mencionada, interpolando los valores de longitud de onda de estas.

Para la cuantificación de lípidos totales se utilizó el método de Soxhlet descrito por González et al., (1999). Para esta determinación se tomo la totalidad de la semilla y se colocó en un cartucho de papel filtro, se peso tanto el cartucho como la muestra antes de la extracción, utilizando como solvente cloroformo. Se colocó en el aparato Soxhlet y se sometió a baño maría en una parrilla eléctrica hasta ebullición para así iniciar el reflujo, manteniendo estas condiciones durante 3 horas. Después del tiempo establecido se retiró el cartucho y se dejo primeramente expuesto al aire, posteriormente se colocó en la estufa a 70° C para terminar de secar la muestra y por último esta fue pesada nuevamente.

Con la diferencia de peso antes y después de la extracción se determinó la cantidad de grasa de la muestra empleada en % (x), mediante la siguiente fórmula:

$$X = (a - b) / c \times 100$$

Donde **a** fue la masa del cartucho en gramos antes de la extracción, **b** la masa en gramos del cartucho después de la extracción y **c** la cantidad en gramos de la muestra utilizada, 100 es el porcentual del recuento.

En tanto que la determinación de proteínas totales se realizó por el método de Kjeldahl, modificado como Micro Kjeidahl por Gonzalez (2000).

Se utilizaron 30 mg de la semilla totalmente triturada, colocando esta en el matr az para la digestión con 2 g de mezcla catalizadora (99 g de K_2SO_4 , 0.18 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ molidos y 1 g de HgO) m as 1 ml de de ácido sulfúrico concentrado, se digirió la muestra hasta que se formó un líquido totalmente cristalino y dejaron de salir humos blancos. Se disolvió el digerido con agua destilada sin sobrepasar 50 ml en total, pasando este digerido al matr az donde se realizó la destilación con 8 ml de una solución de 50 g de $NaOH$ y 5 g de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ aforada a 100 ml. En el otro extremo del condensador se recogieron aproximadamente 50 ml de la muestra destilada en un matr az que contenía 8 ml de una solución de ácido bórico al 4% m as 3 gotas de solución indicadora (mezcla de una parte de solución etanólica de rojo de metilo al 0.2% con cinco partes de solución etanólica de verde de bromocresol al 0.2%). Y por último se tituli  el destilado con una solución valorada de HCl al 0.02N. Los c culos se realizaron siguiendo el ejemplo presentado por González en el 2000, para el método macroKjeldahl.

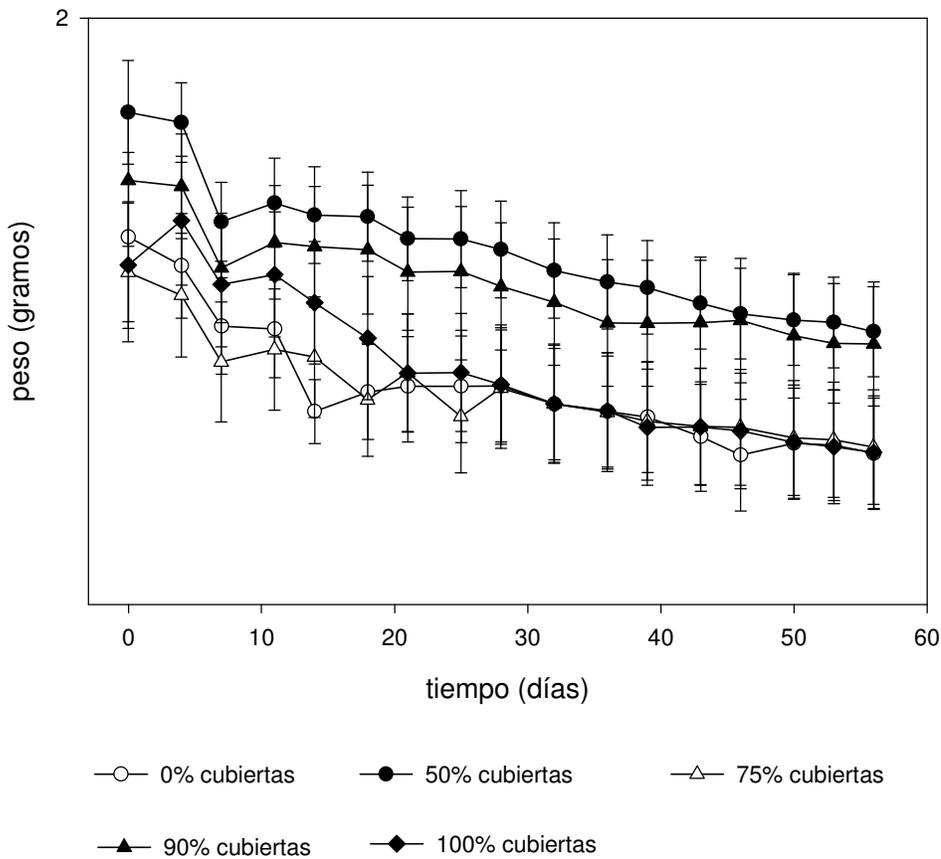
El anterior procedimiento se repitió tres veces para cada una de las especies estudiadas y además se realizó un blanco bajo el mismo procedimiento.

Después de obtenido el total de las fracciones analizadas, se realizaron los c culos correspondientes para expresar los resultados en porcentaje con respecto al peso fresco.

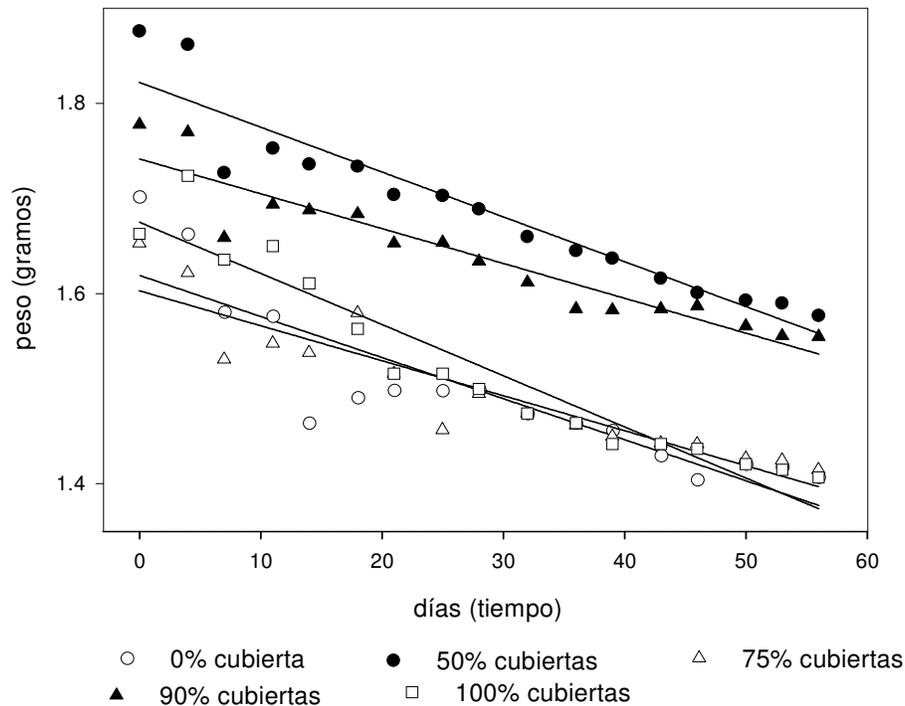
7. RESULTADOS Y DISCUSION.

7.1 ALMACENAMIENTO CON IMPERMEABILIZACIÓN, SOBRE PÉRDIDA DE AGUA Y GERMINACIÓN.

A los 58 días de almacenamiento no se observaron diferencias significativas entre tratamientos para la especie *Quercus rugosa*, utilizando al barniz como impermeabilizante (**grafica 1**). La velocidad y el ritmo de pérdida de agua durante determinado tiempo fueron similares en todos los tratamientos (**gráfica 2**) y no hubo diferencias entre tratamientos, por lo que el barniz no funcionó como impermeabilizante ya que en todos los tratamientos, el tiempo afectó de la misma manera la pérdida de agua.



Gráfica 1. Comparación de la pérdida de agua de las semillas de *Quercus rugosa* bajo los diferentes tratamientos de impermeabilización con barniz, durante los 58 días de almacenamiento.

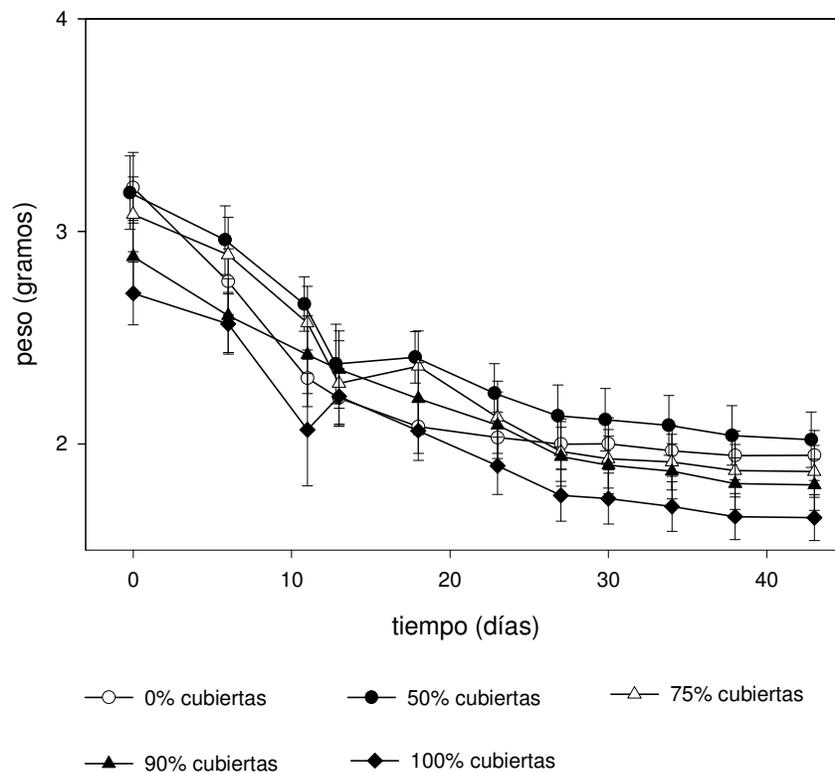


Gráfica 2. Relación polinomial-lineal existente entre la pérdida de agua con los diferentes tratamientos de impermeabilización con barniz en semillas de *Quercus rugosa* durante el tiempo de almacenamiento.

Grange y Finch-Savage (1992), encontraron que los sitios con mayor cantidad de agua mátrica almacenada, son precisamente los cotiledones y que el éxito de la sobrevivencia de la semilla estuvo sujeto a evitar la pérdida de toda el agua libre celular, esto no se logró con ninguno de los tratamientos que representan la fracción de cotiledón cubierto.

En el caso de la especie *Quercus crassipes*, no hubo diferencias significativas entre tratamientos al finalizar el almacenamiento, en donde la impermeabilización también se realizó con barniz (**gráfica 3**), todos los tratamientos perdieron agua a un ritmo y velocidad parecidos como lo indica la pendiente de cada tratamiento y también para esta especie el tiempo afectó de la misma manera a todos los lotes

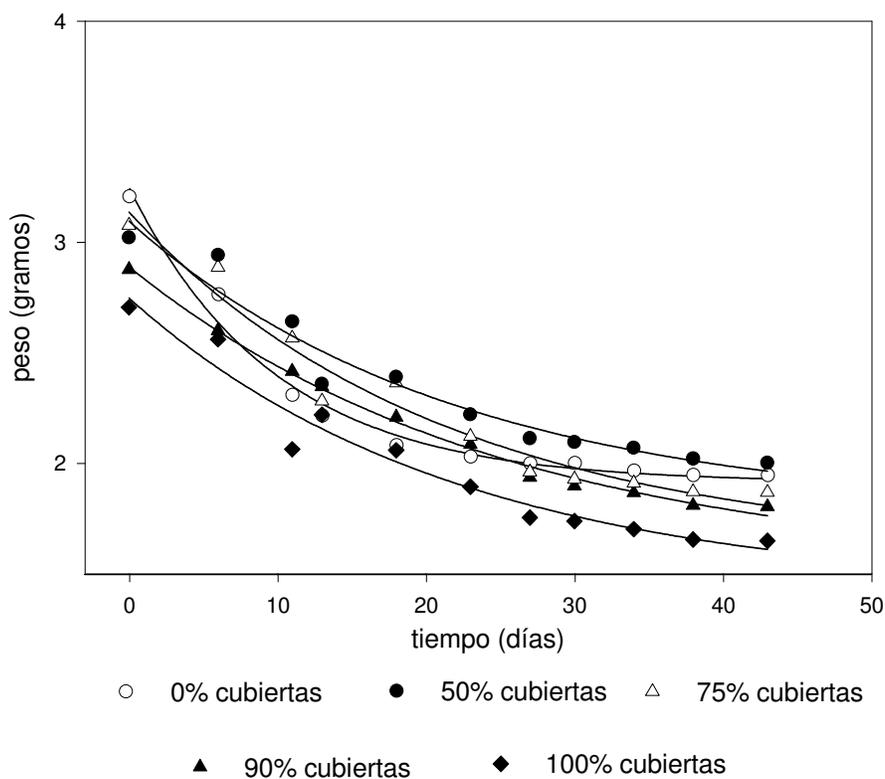
de semillas sobre la pérdida de agua (**gráfica 4**), por lo que también en este caso se consideró que el barniz no funcionó como impermeabilizante. Yim y Bradford (1998) y Wealburn (1998), removieron la capa lipídica del perispermo con cloroformo por lo que la naturaleza lipídica de la cubierta de la semilla pudo ser afectada por los diferentes solventes que componen el barniz y esto influyó para que el barniz no funcionará como impermeabilizante.



Gráfica 3. Comparación de la pérdida de agua de los cinco tratamientos de impermeabilización con barniz en las semillas de *Quercus crassipes* durante 43 días de almacenamiento.

Cuando Finch-Savage (1992), encontró una relación entre la presencia de los cotiledones con la pérdida de la viabilidad concluyó que la tolerancia a la desecación estuvo sujeta al contenido crítico de humedad de estos, por esto se esperaba que los tratamientos en donde las semillas fueron impermeabilizadas en

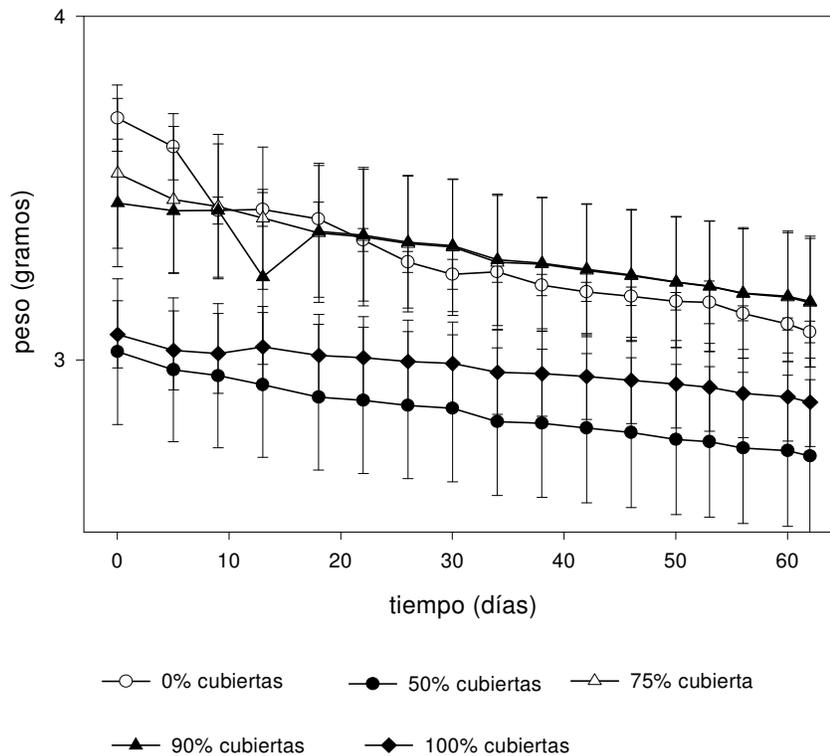
mayor proporción evitarían más la pérdida de humedad, sin embargo los resultados no corresponden con esto, principalmente por que es en el tratamiento donde no fueron cubiertas las semillas donde se presentó la menor pérdida de agua, aunque no fue una gran diferencia, pero otorga validez a la idea de que el barniz no pudo evitar la pérdida de agua.



Gráfica 4. Relación exponencial de decaimiento entre la velocidad de pérdida de agua con los diferentes tratamientos de impermeabilización con barniz, durante el tiempo de almacenamiento en semillas de *Quercus crassipes*.

Sin embargo para la especie *Quercus rugosa* cubierta con cera se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento donde no se cubrieron las semillas (0% cubiertas) con los demás (**gráfica 5**), la velocidad de pérdida de agua a 62 días de almacenamiento fue mayor en las semillas que no se cubrieron y la menor

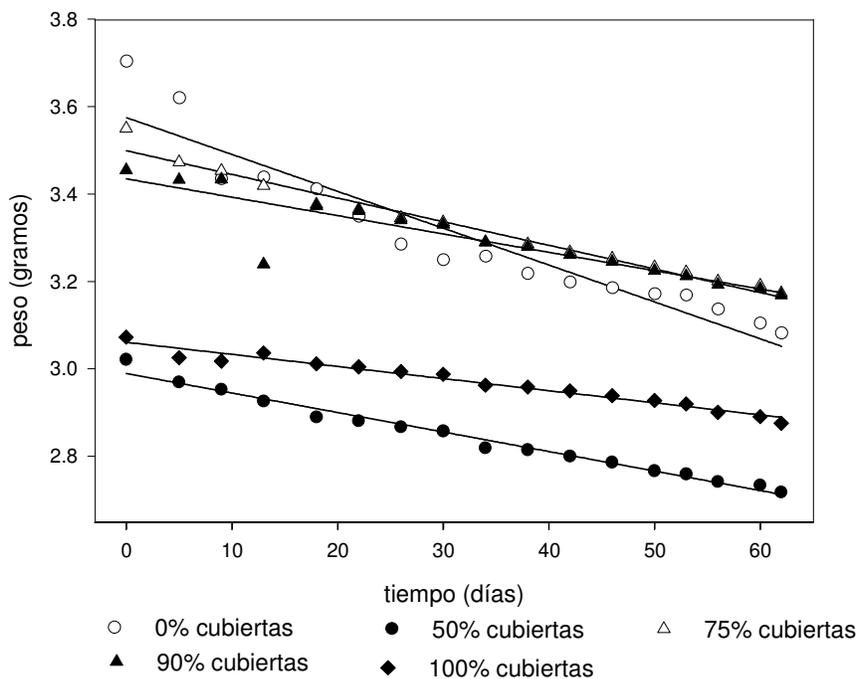
pérdida de agua, aunque sin diferencias significativas, se presentó en las semillas cubiertas en un 100% (**gráfica 6**), por lo que en este caso si se puede considerar que la cera funciona como impermeabilizante, sin embargo es conveniente repetir el experimento, a fin de corroborar los resultados obtenidos en este trabajo.



Gráfica 5. Comparación de la pérdida de agua de los diferentes tratamientos de impermeabilización con cera para la especie *Quercus rugosa*, durante 63 días de almacenamiento.

Al comparar el funcionamiento del barniz como impermeabilizante en las especies *Quercus rugosa* y *Quercus crassipes*, no se observaron diferencias significativas y si hubo diferencias debidas propiamente a las especies (**gráficas 2 y 4**), la correlación de pérdida de agua durante determinado tiempo es del tipo polinomial negativa para la primera especie mientras para la segunda se observa del tipo exponencial de decaimiento lo que confirma que cada especie es diferente en sus requerimientos fisiológicos, como lo afirma Zavala (1996), quien expuso que

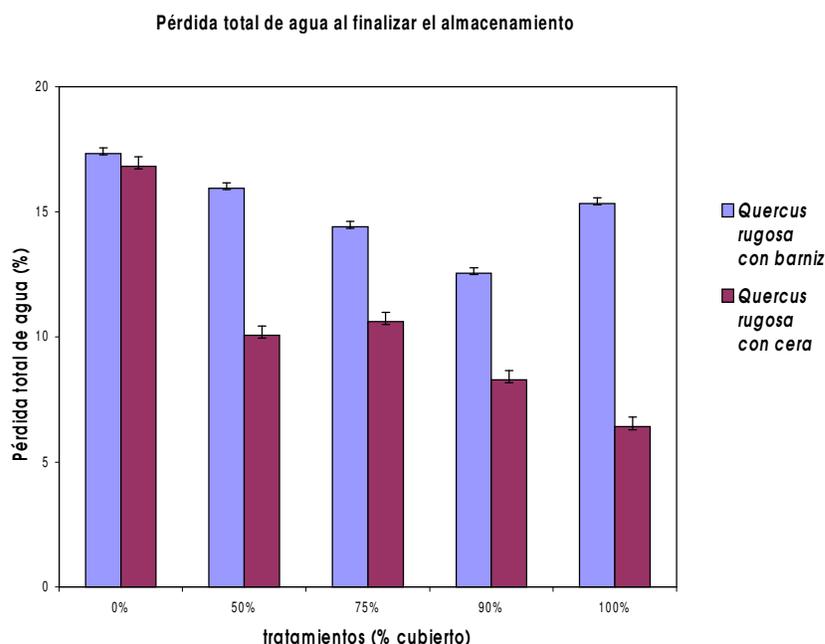
mientras que hay especies que no exceden más de unos cuantos meses de vida existen otras que se han logrado almacenar hasta un año y medio con una temperatura y cantidad de humedad controladas.



Gráfica 6. Relación polinomial-lineal existente entre la pérdida de agua con los diferentes tratamientos de impermeabilización con cera en las semillas de *Quercus rugosa* durante el tiempo de almacenamiento.

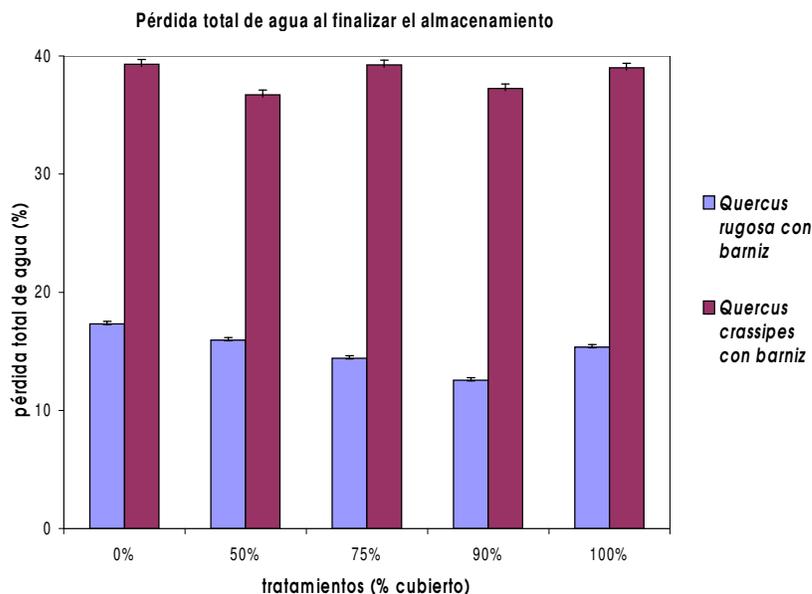
Y finalmente al comparar los tratamientos con barniz y con cera aplicados a *Quercus rugosa*, si se encontraron diferencias debidas al tipo de material utilizado (gráficas 2 y 6), aunque la correlación existente entre la pérdida de agua en determinado tiempo con ambos materiales es del tipo polinomial negativa, pero como ninguno de estos dos materiales ha sido utilizado anteriormente como impermeabilizante para evitar la pérdida de agua durante el almacenamiento, es necesario repetir el experimento con estos materiales, principalmente con la cera o con una diferente cuyas características le permitan adherirse más fuertemente al pericarpio del fruto.

En la especie de *Quercus rugosa* impermeabilizada con barniz, la pérdida total de agua fue de 12.54% para las semillas cubiertas en un 90% mientras la mayor pérdida se presentó en el tratamiento sin cubrir las semillas con una pérdida de 17.33% del peso fresco de las semillas. En el caso de la misma especie pero impermeabilizada con cera la pérdida total de agua fue de 16.82% para las semillas sin cubrir, siendo estas las de mayor pérdida y si hubo diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos principalmente con el tratamiento donde se cubrieron las semillas en un 100% las cuales reportaron un 6.41% de pérdida total de agua (**gráfica 7**). Sin embargo, en ambos materiales la pérdida total de agua no excedió el porcentaje que influye directamente en el deterioro y pérdida de viabilidad de las semillas que tienen reportado Probert y Longley (1989) para *Zizania palustris* con 45% lo que la coloca entre las semillas recalcitrantes, al ser intolerantes a la desecación pierden su viabilidad cuando el contenido de humedad desciende por debajo del rango de 40% para algunas especies y del 50% para otras de su peso fresco (Black y Derek, 2000).



Gráfica 7. Pérdida total de agua en la especie *Quercus rugosa* impermeabilizadas con barniz y con cera.

En las semillas de *Quercus crassipes* no se observaron diferencias entre tratamientos al finalizar el almacenamiento y la pérdida total de agua estuvo entre 36.72% para las semillas cubiertas en un 50% y 39.31% para las que no se cubrieron (**gráfica 8**), como se observa en la gráfica las semillas de *Quercus crassipes* perdieron el doble de humedad que las semillas de *Quercus rugosa*, y entre 20 y 40% de pérdida de agua para *Quercus rubra* según Pritchard (1991), por lo que las semillas de esta especie pueden perder su capacidad germinativa en una mayor proporción que las semillas de *Quercus rugosa*.



Gráfica 8. Comparación del porcentaje de pérdida total de agua entre semillas de *Quercus rugosa* y de *Quercus crassipes*.

Lo anterior se comprueba al observar los resultados sobre capacidad germinativa. Mientras en el caso de *Quercus rugosa* si presentó germinación en todos los tratamientos al finalizar el almacenamiento, el registro de germinación para *Quercus crassipes* fue de cero en todos los casos (**tabla 1**).

Esto se puede explicar porque las semillas de *Quercus crassipes* han perdido casi la totalidad del contenido de agua presente en sus tejidos y han llegado al llamado punto crítico de humedad interna del embrión interrumpiendo todas sus actividades fisiológicas y bioquímicas determinando el daño causado a los embriones (Macintyre, 1987; Kermode, 1990; Osborne, 1994; en Farnsworth, 2000).

Tratamiento	% de germinación de semillas tratadas con barniz.	% de germinación de semillas tratadas con cera.	Capacidad germinativa de la semilla
0%	59%	59%	82%
50%	54%	33%	
75%	94%	29%	
90%	86%	53%	
100%	35%	58%	

Tabla 1. Comparación del porcentaje de germinación entre tratamientos con barniz y con cera para la especie *Quercus rugosa*.

En cuanto a las semillas de *Quercus rugosa* cubiertas con barniz el mayor porcentaje de germinación lo presentó el tratamiento donde las semillas se cubrieron en un 75% con casi la totalidad germinadas, mientras que las que se cubrieron en un 100% presentaron el menor porcentaje con menos de la mitad germinadas; aparentemente los requerimientos de oxígeno no corresponden con lo descrito por Nwankwo y Krikorian (1982) para *Elaeis guineensis* (psifera), quien expuso que los requerimientos de oxígeno para esta especie durante el almacenamiento fueron relativamente bajos y esto no afectó la capacidad germinativa de las semillas.

Las semillas de *Quercus rugosa* cubiertas con cera que presentaron el mayor porcentaje de germinación fueron las que no se cubrieron, y las que presentaron el menor porcentaje fueron las que se cubrieron en un 75%, aunque en ninguno de los casos sobrepasó más del 60% de semillas germinadas, la importancia de la respiración en un buen almacenamiento se observa diferente para las semillas de *Quercus* que para otras especies; mientras en la mayoría de los casos almacenar

en condiciones herméticas, sin oxígeno libre e intercambio gaseoso, es lo más recomendable (Desai et al., 1997) en los *Quercus* el intercambio gaseoso parece tener una gran importancia.

En todos los casos, exceptuando los tratamientos cubiertos al 100%, puede observarse que el porcentaje de germinación es mayor en los tratamientos cubiertos con barniz que en los cubiertos con cera, esto en parte se debe a la aparición de hongos durante el almacenamiento en las semillas cubiertas con cera, la aparición de microorganismos pudo haber cambiado la atmósfera de almacenamiento de las semillas y con esto modificar su respiración (Roberts y Abdulla, 1968; en Desai, 1997). Galín (1999), consideró como semillas no viables a aquellas que presentaron tejidos lechosos, enmohecidos, podridos de olor rancio y semillas sin embrión, estas características las presentaban algunas semillas que fueron cubiertas con cera (**figura 6**).



Figura 6. Aparición de hongos en los tratamientos con cera en semillas de *Quercus rugosa*.

Al parecer a pesar de que las semillas cubiertas con cera, en general, presentaron una pérdida de agua más lenta y una menor pérdida de agua total, su capacidad germinativa fue menor en comparación con las cubiertas con barniz; la proporción de agua presente puede estar implicada en la aparición de hongos y en el cambio de la actividad respiratoria de las semillas lo que provocó el daño en la viabilidad de estas; esto quiere decir que necesariamente debe presentarse la pérdida de

cierta cantidad de agua, de tal modo que no llegue al punto crítico de desecación y que pierda la necesaria para que no modifique la actividad bioquímica, fisiológica y de microorganismos en las semillas.

7.2 ESTRUCTURA DEL PERICARPIO.

Las semillas de *Quercus* carecen de endospermo, pero existe sin embargo una cubierta, el pericarpio que no se encuentra adherido a la semilla este sólo se une por la cicatriz a esta y según Zavala (1996) este es la cubierta del fruto en nuez y no de la semilla propiamente; sin embargo esta cubierta sirve para evitar la salida del agua. El pericarpio de *Quercus rugosa* presenta tres capas (figura 7; a y b).

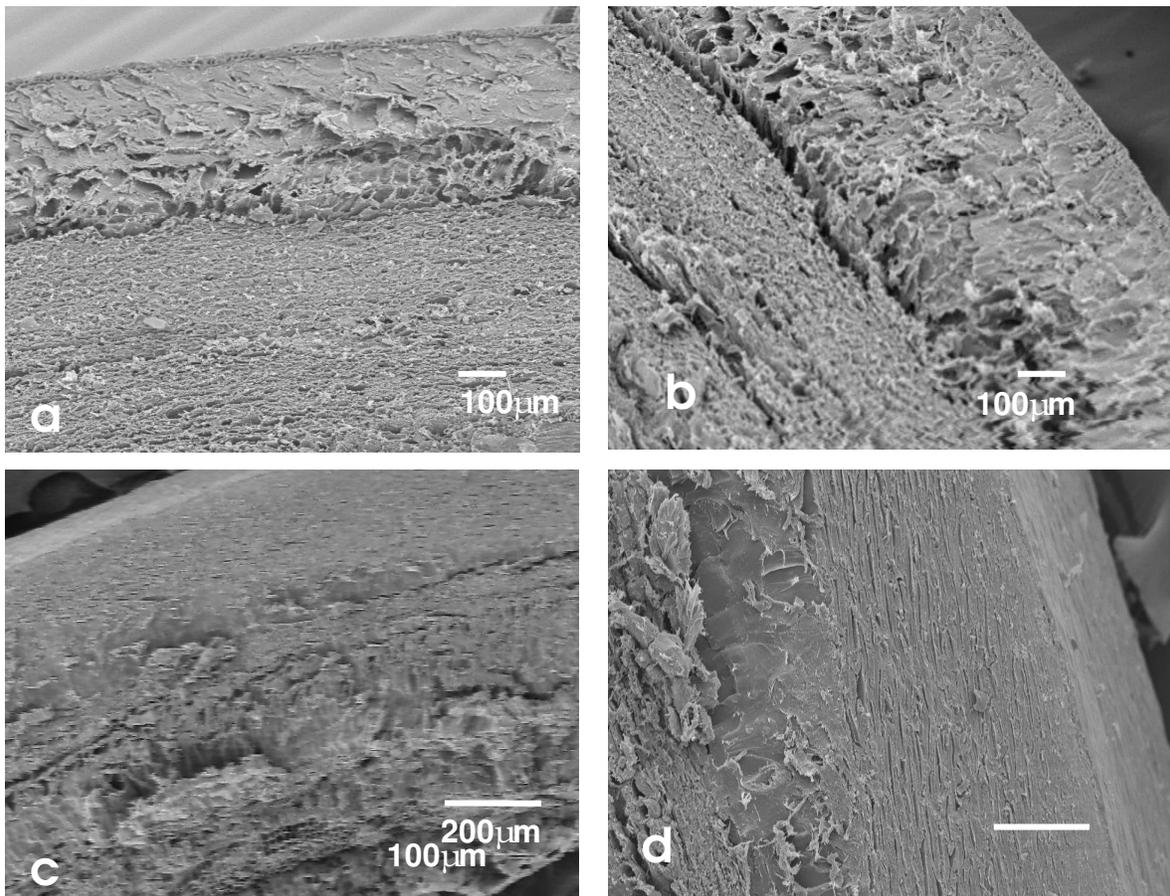


Figura 7. Micrografías electrónicas de barrido de las tres capas que conforman el pericarpio de

las especies estudiadas; a (x100) y b (x100) presentan las capas que conforman la

cubierta de *Quercus rugosa* y en c (x80) y d (x150); se observan las capas que conforman a *Quercus crassipes*

La primera capa es delgada y midió 29 μm de ancho, presenta orificios alineados los cuales se observan a 500 aumentos (**figura 8; a**). Esta capa es la que se encuentra expuesta al ambiente.

La segunda capa midió 257 μm de ancho, presenta un tejido con poros muy grandes existen aproximadamente 18 poros en un área de $10,000 \mu\text{m}^2$, cada poro llega a medir de 14 a 43 μm de \varnothing , la forma de la capa asemeja al tejido de una esponja de mar, la cual presenta un tejido muy abierto y reticulado.

La tercera capa midió 329 μm , en esta el tejido es mucho más cerrado y el tamaño de los poros es mucho más pequeño que los de la segunda capa. Esta capa se encuentra en contacto directo con los cotiledones (**figura 7; a y b**).

Quercus crassipes también presentó tres capas en su pericarpio (**figura 7; c y d**).

La primera midió 91 μm de ancho y es una capa tres veces más gruesa que la correspondiente de *Quercus rugosa*, sin embargo a 80 y 150 aumentos no se observaron poros con claridad, este tejido es muy cerrado. Esta capa se encuentra en contacto con el ambiente (**figura 8; b**).

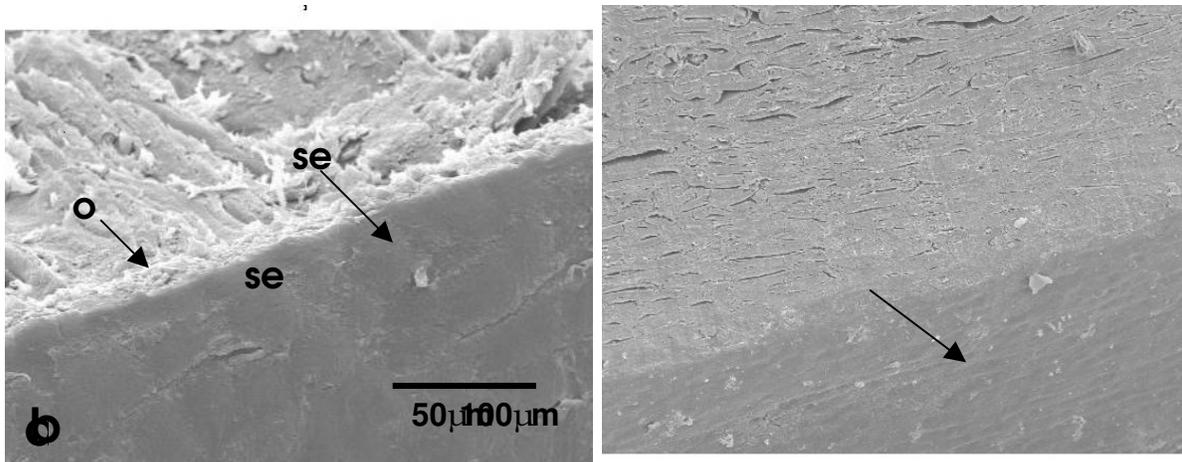


Figura8. Micrografías electrónicas de barrido de la zona externa del pericarpio: a) Primera capa con orificios alineados **o** y superficie externa **se** de *Quercus rugosa*, a x500 aumentos b) Primera capa y superficie externa **se** de *Quercus crassipes* a x100 aumentos.

La segunda capa midió 564 μm , su tejido tiene forma de esponja y es más parecida a la tercera capa de *Quercus rugosa* debido a que los poros son muy cerrados, se presentaron 18 de éstos en un área de 10,000 μm^2 , la forma de estos poros es alargada longitudinalmente y llegan a medir de 35 a 90 μm de largo, aunque como es muy cerrado sólo a 500 aumentos se observó su forma y cantidad.

La tercera capa es de un tejido reticulado muy abierto que midió 836 μm de ancho, parecida a la segunda capa de *Quercus rugosa*, con poros más pequeños de menos de 18 μm de \emptyset y también se observarán otros poros más abiertos de 36 a 45 μm de \emptyset y alineados entre sí los cuales están rodeados de tejido esponjoso.

En semillas de melón, la estructura del perispermo o cubierta de la semilla a diferencia de las semillas de *Quercus*, está formado de una sola capa de células que forma el endospermo y tres o cuatro que conforman al perispermo (Welbaum et.al. 1998): sin embargo en estas semillas se ha observado además que este perispermo esta formado de una sola capa de células envueltas por un grueso deposito de callos y una delgada capa cerosa que contiene suberina (Yim y Bradford, 1997).

Zavala (1996), hace referencia a las diferencias morfológicas existentes entre semillas de diferentes especies de encinos, y entre las características peculiares que ayudan a identificar a los distintos encinos se encuentra el carácter liso o rugoso de la superficie externa del pericarpio y lo tomentoso o no de la superficie interna del mismo.

En este caso la superficie externa de *Quercus rugosa* presenta algunas zonas con grietas muy marcadas las cuales se encuentran de 3 a 4 μm separadas entre sí,

presentan además algunas manchas blancas que parecen estar taponeando algunos orificios (**figura 9; a**).

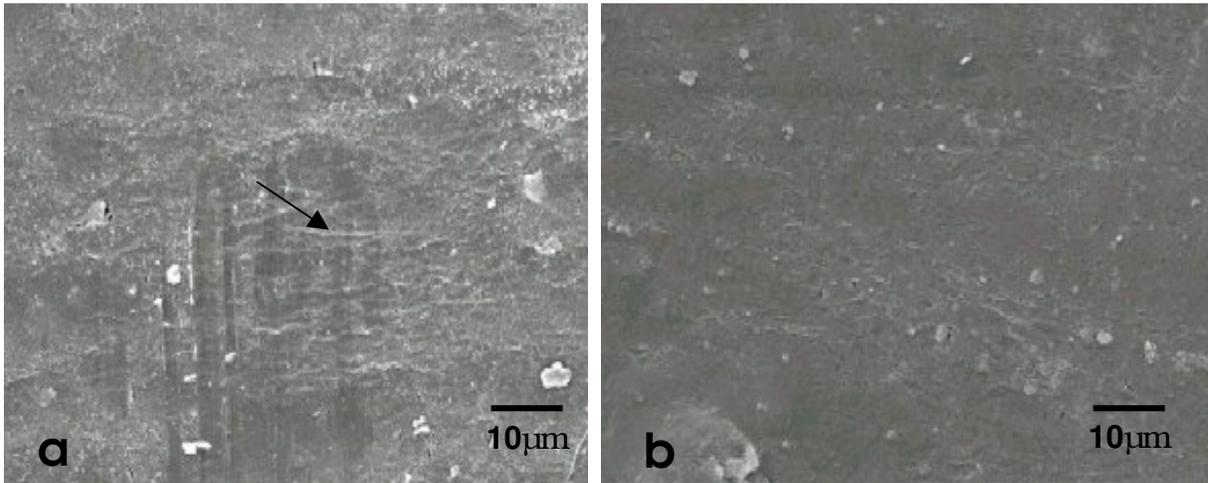


Figura 9. Micrografías electrónicas de barrido de la superficie externa del pericarpio: a) *Quercus rugosa*, muestra grietas y manchas blancas insertadas, x1500 aumentos, b) *Quercus crassipes*, también presenta grietas pero menos pronunciadas, con cuerpos blancos insertados, x1500 aumentos.

La capa externa del pericarpio de *Quercus crassipes*, presentó en su superficie externa grietas que fueron observadas a 1500 aumentos, estas no fueron tan marcadas como en el caso de *Quercus rugosa*, también presentaron manchas blancas que parecieron taponar algunos orificios (**figura 9; b**).

Welbaum et al., (1995) observaron en las semillas de melón, que la superficie interna del perispermo se presentó lisa, a diferencia de estas, en las semillas de *Quercus rugosa* se presentó esta superficie tomentosa con grandes orificios, de la misma manera en *Quercus crassipes* esta superficie interna se observó mucho más tomentosa y en ambas especies la porosidad se observó igual (**figura. 10**).

Cabe resaltar que el acomodo de las capas en las dos especies estudiadas se presentó de manera inversa, mientras que para *Quercus rugosa* la capa de tejido más cerrado es la que se encontró, adjunta a los cotiledones de la semilla, en *Quercus crassipes* es la capa de tejido más abierto la que se encontró pegada al embrión y los cotiledones (**figura 7**).

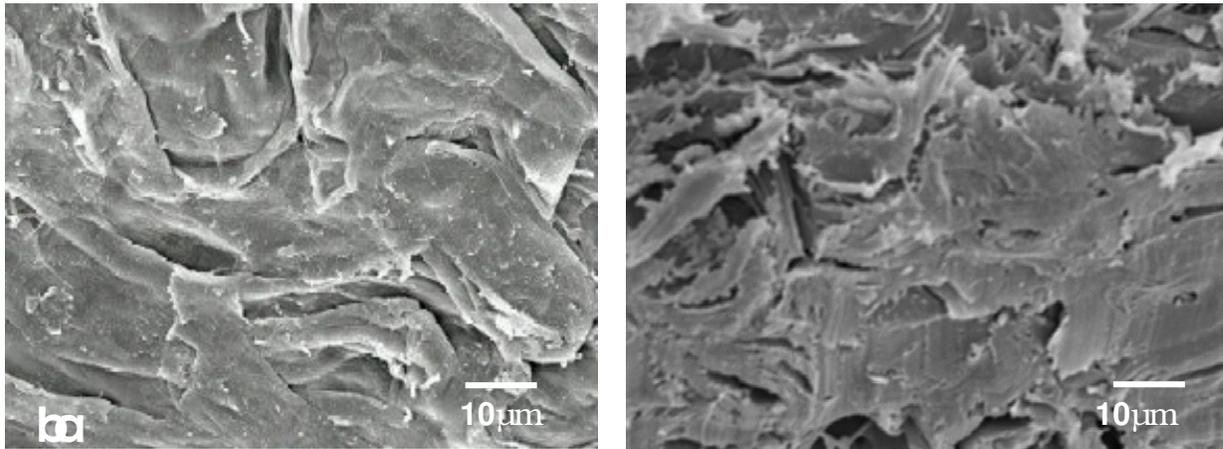


Figura 10. Micrografía electrónica de barrido de la superficie interna del pericarpio: a) *Quercus rugosa*, presenta una superficie interna tomentosa con presencia de poros a x1500 aumentos, b) *Quercus crassipes*, también presenta su superficie tomentosa con poros más pronunciados.

Las tres capas fueron más anchas en *Quercus crassipes* en comparación con *Quercus rugosa*.

A pesar de las características anteriores, no se puede relacionar el ancho del pericarpio con la pérdida de agua en las semillas, porque es precisamente la especie *Quercus crassipes*, quien presentó el pericarpio más ancho (1491 µm de ancho) y fue esta especie la que perdió más rápidamente el contenido de agua y *Quercus rugosa* de pericarpio más angosto (615 µm) quien retuvo el agua por más tiempo.

Sin embargo el orden de las capas si puede estar implicado en la pérdida de agua, puesto que observando las imágenes (**figura 7**), *Quercus rugosa* presentó la capa de tejido más cerrado junto a los cotiledones y por el contrario *Quercus crassipes* presentó la de tejido más abierto junto a estos.

Posiblemente el grosor de la capa porosa también esté involucrado en esta pérdida, esta capa es tres veces más ancha en *Quercus crassipes* en comparación con *Quercus rugosa*.

7.3 CONTENIDO DE PROTEÍNAS, CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS TOTALES.

Con respecto a las proporciones de proteínas, lípidos y carbohidratos presentes en las especies estudiadas, *Quercus rugosa* presentó una mayor proporción de lípidos seguidos por las proteínas y por último los carbohidratos, en tanto que *Quercus crassipes* presentó una mayor cantidad de proteínas, después en menor proporción los lípidos y por último los carbohidratos (**tabla 2**).

Estas proporciones difieren con las reportadas para *Quercus suber* (Fonseca et al. 1997) y para *Quercus robur* (Salisbury y Ross, 1991) (**tabla 2**).

	<i>Q. rugosa</i>	<i>Q. crassipes</i>	<i>Q. suber</i> *	<i>Q. robur</i> **
Proteínas	9.66 ± 1.5	7.78 ± 2.02	5.03	3
Lípidos	20.57 ± 1.4	4.08 ± 0.59	----	3
Carbohidratos	2.24 ± 0.02	1.97 ± 0.19	5.34	47
Agua	40.57 ± 0.30	48.46 ± 0.15	40.86	----

Tabla 2. Comparación de las proporciones de proteínas, lípidos y carbohidratos de las dos especies estudiadas con *Q. suber* y *Q. robur* como referencia. Las cantidades están dadas en porcentaje basado en el peso fresco de las semillas teniendo un máximo de $n=7$.

*Fuente: Fonseca et al. 1997. en Seed Proteins from *Q. suber*.

** Fuente: Salisbury y Ross, 1991. The Chemical Composition of Some Seeds of Economic Importance.

La importancia de conocer las cantidades de moléculas que componen a las semillas de *Quercus*, esta relacionada tanto con las reservas energéticas de esta, como con las propiedades de tolerancia a la desecación que confieren determinadas moléculas. Los carbohidratos presentes, por ejemplo, incrementan su concentración en semillas de algunas especies, cuando comienza la desecación, mientras que en otras especies decrecen estas concentraciones cuando la tolerancia a la desecación es menor. Koster y Leopold (1988), encontraron que en las semillas de maíz, chícharos y trigo, los azúcares solubles estuvieron presentes durante el estado de tolerancia a la desecación, además esta tolerancia disminuyó cuando los oligosacáridos desaparecieron.

Finch-Savage et al (1993) trabajaron específicamente con proteínas LEA, una proteína asociada con la capacidad de tolerancia a la desecación, en el presente estudio sólo se cuantificó el total de proteínas presentes en las semillas, esta proporción de proteínas fue mayor en *Quercus rugosa* y *crassipes*, que las reportadas para *Quercus suber* (Fonseca, 1997), y para *Quercus robur* (Salisbury y Ross, 1991). Sin embargo los datos obtenidos en el presente trabajo no proporcionan información acerca de cuales proteínas están presentes y cuales en mayor proporción, por esta razón hasta el momento no se pueden asociar la presencia de estas proteínas con la tolerancia a la desecación o con una función como reserva alimenticia.

Las proteínas, lípidos y carbohidratos, también están presentes como reservas energéticas en las semillas para llevar a cabo la germinación. Al respecto Gifford y Tolley (1989) realizaron un estudio identificando las proteínas que siguieron después de la germinación en semillas de *Picea glauca* y Fonseca (1993) hace lo propio con semillas de *Quercus suber* cuantificando y además identificando el tipo de proteínas presentes. En el presente estudio obtuve a las proteínas y a los lípidos como la mayor reserva energética para ambas especies estudiadas.

8. CONCLUSIONES

El barniz no funcionó como impermeabilizante para evitar la pérdida de agua en ninguna de las dos especies estudiadas. Los resultados indican que la cera en cambio, si puede funcionar como impermeabilizante

Se observaron diferencias en la pérdida de agua entre las dos especies, en *Quercus crassipes* la pérdida fue de 36 a 39% de tipo exponencial y todas las semillas perdieron su viabilidad o capacidad germinativa. *Quercus rugosa* en cambio tuvo una pérdida de 6 a 17% de tipo polynominal.

El porcentaje de germinación en esta última especie fue de 35 a 94% en las semillas de *Quercus rugosa* cubiertas con barniz y de 29 a 59% las semillas cubiertas con cera. Lo anterior se pudo deber a que se presentaron factores no controlados, como la aparición de hongos y la germinación prematura.

El pericarpio de ambas especies presentó tres capas, el pericarpio de *Quercus crassipes* fue tres veces más ancho que el de *Quercus rugosa*. La disposición de las capas estuvo invertida en ambas especies, la capa de poros abiertos se encontró junto a la semilla en *Quercus crassipes* y la capa de poros más cerrados se encontró junto a la semillas en *Quercus rugosa*

Quercus crassipes presento grandes poros en la superficie interna y pequeñas grietas en su superficie externa mientras que *Quercus rugosa* presento poros menos pronunciados en la superficie interna y grietas más grandes en su superficie externa. Por lo que la disposición y el grosor de la capa porosa, pueden estar implicados en la pérdida de humedad por la semilla.

Quercus crassipes y *Quercus rugosa* presentaron una mayor cantidad de lípidos como reserva energética, y ambas especies presentaron en menor cantidad a los carbohidratos.

SUGERENCIAS.

El trabajo puede culminarse y enriquecerse si se realizan varios experimentos complementarios tales como:

- Repetir las pruebas de almacenamiento utilizando los materiales para impermeabilizar con el fin de corroborar los resultados aquí obtenidos
- Además de pruebas bromatológicas como las del presente trabajo, también se debe hacer identificación del tipo de moléculas presentes, con el fin de identificar a los sustratos que le sirven a la semilla como reserva energética.
- Realizar la identificación de la naturaleza del pericarpio, con el fin de saber su intervención en la pérdida de agua.
- Proponer un modelo que sirva para saber si la posición de las capas interviene en la pérdida de agua de la semilla.
- Medir la respiración en los diferentes tratamientos para almacenamiento con el propósito de saber si la impermeabilización afecta la actividad fisiológica de la semilla.

Apéndice 1: Abreviaturas.

Ø	Diámetro
µm	Micras o micrometros
X	Número de aumentos.
H.R.	Humedad relativa
Q.	<i>Quercus</i>

Apéndice 2

Composición del barniz utilizado para impermeabilizar.

Esmalte,	base extraendurecedora con fibras,
silicón y lecitina,	acetato de etilo,
butil acetato,	alcohol isopropilico,
alcohol 40-BSD,	nitrocelulosa,
dibutilftalato,	acetato isobuturato de sacarosa,
acetato de amilo,	alcanfor,
2-metil butil acetato,	hectorita de esterealconio,
diacetona alcohol,	3-metil butil acetato,
acetona,	ácido cítrico,
trimetilsiloxisilicato	ácido fosfórico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bello, M.A. y Labat, J.N. 1987. Los Encinos (*Quercus*) del estado de Michoacán, México. SARH y CEMCA. México. pp 36-38, 77-79.
- Black M. y Derek B.J. 2000. Seed Technology and its Biological Basis. CRC Press. England. pp 32-34, 377-378, 388-390.
- Bonfil, C. 1993. Del herbario, la riqueza de los encinos. *Ciencias*. México. No. 29: 13-15.
- Bonner, F.T. et al. 1990. storage of seed: potential and limitations for germplasm conservation. *Forest Ecology and Management*. 35:35-43.
- Bozzola J.J. y Russell C.D. 1998. Electronic Microscopy Principles and Techniques for Biologists. Editorial Jones and Bartlett. pp 51-55.
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO); Instituto de Biología, UNAM, Agrupación Sierra Madre, S.C. México D.F. pp 847.
- Chaitanya K.S.K. y Naithani S.C. 1994. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn. F. *The New Phytologist*. 126: 623-627.
- Chino, V. y Jacques P. 1986. Contribución al conocimiento de la flora medicinal de Quimixtlán, Puebla. Tesis de licenciatura, UNAM, México.
- De la Paz O., C. 1976. Características Anatómicas de Cinco Encinos de México.
- Dubois, M.K.A. et al. 1985. Colorimetric method for determination of sugar related substances. *Anal. of Chemistry*. 28: (3) 350-356.
- Farnsworth, E, 2000. The Ecology and Physiology of Viviparous and Recalcitrant Seeds. *Annual Review of Ecology*. 31:107-38
- Farrant, J.M. et al. 1986. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. *Physiology Plant*. 67: 291-298.
- Farrant, J.M. et al. 1988. Recalcitrance : a current assessment. *Seed Science and Technology*. 16:155-166
- Finch-Savage W.E. 1992. Embryo Water Status and Development of the Recalcitrant Species. *Q. robur* L. Evidence for a Critical Moisture Content. *Journal of Experimental Botany*, Vol 43. 250:663-669

- Finch-Savage W.E. et al. 1994. The expression of dehydrin proteins in desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of temperate trees. *Planta*. 193:478-485.
- Fonseca P.A. et al. 1997. Seed Proteins from *Quercus suber*. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 45: 3443-3447.
- Galín L.R. 1999. Tratamientos para estimular y homogenizar la germinación en semillas de *Gmelina arborea linn*. Tesis profesional. Chapingo México. pp 17-19
- Gifford, D.J. y Tolley M.C. 1989. The seed proteins of white spruce and their mobilization following germination. *Physiologia Plantarum*. 77:254-261.
- González M.S. et al. 1999. *Biomoléculas, Manual de laboratorio*. UNAM. México. pp. 87-88
- González M.S. y Peñalosa C. I. 2000. *Biomoléculas. Métodos de análisis*. UNAM. México. Campus Iztacala. pp 22-29
- Grange R.I. y Finch-Savage W.E. 1992. Embryo Water Status and Development of the Recalcitrant. Species *Q. robur* L. Determination of Water Relations Parameters by Pressure Volume. Analysis. *Journal of Experimental Botany*. Vol 43. 250:657-662
- Hanson, J. 1984. The storage of seeds of tropical tree fruits. Williams, J.T. London, Allen and Unwin. pp 53-62
- Hartmann H.T. y Kester D.E. 1991. *Propagación de Plantas, Principios y Prácticas*. Editorial Continental. México. pp. 121-177.
- Hendry G.A.F. 1993. Oxygen free radical processes and seed longevity. *Seed Science Research*. 3:141-53
- ISTA (1993). *Internacional rules for seeds testing. Rules. Seed Science and Technology 21, supplement*.
- INEGI, Carta topográfica 1:50 000. 1998.
- Kermode. A.R.. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to Germination. *Critical Reviews of Plant Science*. 9:155-95.
- Kim, Y.W. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*. *Plant Cell Reports* 16: 869-873.
- Koster K.L. y Leopold C. 1988. Sugars and desiccation Tolerance in Seeds. *Plant Physiology*. 88:829-832.

- MacIntyre G.I. 1987. The role of water in the regulation of plant development. *Canadian Journal of Botany*. 65: 1287-98
- Natividade, J.V. 1950. Subericultura. Ministerio de Economía. Dirección General de Servicios Forestales y Agrícolas, Lisboa, Portugal.
- Nixon, K. 1993. The genus *Quercus* in México. In:Ramamoorthy, T.P.R. Bye, A. Lot y J. Fa. Biological diversity of México: origins and distribution, Oxford university Press. New York. pp. 447-458.
- Nwankwo B.A. y Krikorian, A.D. 1982. Water as a Storage Medium for *Elaeis guineensis* (psifera) Seeds under Aseptic Conditions. *Annals of Botany*. 50, 793-798.
- Oliver M.J. y Bewley J.D. 1997. Desiccation tolerance of plant tissues: a mechanistic. *Horticulturae Review*. 18:171-213
- Osborne D.J. y Boubriak I.I. 1994. DNA and desiccation tolerance. *Seed Science Research*. 4:175-85.
- Pérez-García, R y Aguinagalde I. 1995. Effect of Different Seed Storage Conditions on Germination And Isozyme Activity in Some *Brassica* Species. *Annals of Botany* 75:579:585,
- Pritchard H.W. 1991. Water Potential and Embryonic Axis Viability in Recalcitrant Seeds of *Quercus rubra*. *Annals of Botany*. 67: 43-49.
- Probert R.J. y Longley P.L. 1989. Recalcitrant Seed Storage Physiology in Three Aquatic Grasses (*Zizania palustris*, *Spartina anglica* y *Porteresia coarctata*). *Annals of Botany*. No. 63: 53-63
- Rzedowski, J. 1988. Vegetación de México. Bosque de *Quercus*. Edit. Limusa. México. pp.263-282, 432.
- Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*. 1:499-514.
- Romero et al. 2002. El género *Quercus* (Fagaceae) en el estado de México. *Annals Missouri Botany Gardner*. 89:551-593.
- Salisbury F.B. y Ross C.W. 1991. Plant Physiology. The Chemical Composition of Some Seeds of Economic Importance. Edit. Wadsworth Publishing Company. California, U.S.A. pp 310.
- Smirnoff N. 1993. The role active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *Tensley Review* 52. *The New Phytologist*. 125:27-58.

- Shewry P.R. et al. 1995. Seed Storage Proteins : Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*. Vol 7: 945-956.
- Vazquez, V. 1992. El género *Quercus* (Fagaceae) en el estado de Puebla, Tesis, UNAM, México.
- Vertucci, C. W. Et al. 1994. Theoretical Basis of Protocols for Seed Storage III. Optimum Moisture Contents for Pea Seeds Stored at Different Temperatures. *Annals of Botany* 74: 531-540.
- Welbaum G.E. et al. 1995. Weakening of muskmelon perisperm envelope tissue during germination. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 46, 285: 391-400.
- Welbaum G.E. et al. 1998. Biophysical, physiological and biochemical processes regulating seed germination. *Seed Science Research*. 8:161-172.
- Yim, K y Bradford, K.J. 1997. Relationship of callose accumulation to semipermeability of the perisperm of muskmelon seeds. *Plant physiology*. 114 (Suppl), 288, abstract no. 1506.
- Yim, K. y Bradford, K.J. 1998. Callose deposition is responsible for Apoplastic Semipermeability of the endosperm envelope of Muskmelos seed. *Plant physiology*. 118: 83-90
- Zavala, Ch. F. 1996. Frutos y semillas de encinos. Universidad Autónoma Chapingo.México. pp 51.