



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MORFOLOGÍA Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE
Opuntia tomentosa Salm-Dyck (CACTACEAE), SOMETIDAS A
ENTERRAMIENTO EN DOS SITIOS CONTRASTANTES DEL
PEDREGAL DE SAN ÁNGEL, D.F.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

JEANETTE ROSAS MORENO

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. MARÍA ESTHER SÁNCHEZ CORONADO

2011





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.

1. Datos del alumno
Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma
de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de Cuenta
2. Datos del tutor
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito
Título

Número de páginas
Año

1. Datos del alumno
Rosas
Moreno
Jeanette
56560948
Universidad Nacional Autónoma
de México
Facultad de Ciencias
Biología
302067459
2. Datos del tutor
M. en C.
María Esther
Sánchez
Coronado

3. Datos del sinodal 1
Dra.
Guadalupe Judith
Márquez
Guzmán

4. Datos del sinodal 2
M. en C.
Irene
Pisanty
Baruch

5. Datos del sinodal 3
Dra.
Alma Delfina Lucía
Orozco
Segovia

6. Datos del sinodal 4
Dra.
Silvia
Espinosa
Matías

7. Datos del trabajo escrito
Morfología y germinación de las semillas de
Opuntia tomentosa Salm-Dyck (Cactaceae),
sometidas a enterramiento en dos sitios
contrastantes del Pedregal de San Ángel, D.F.
51 p.
2011

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO.....	3
HIPÓTESIS.....	4
ANTECEDENTES.....	4
Germinación.....	4
Latencia.....	7
Papel de las cubiertas seminales en la germinación.....	9
El ambiente del suelo.....	12
Efecto de la temperatura.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
La especie.....	15
Área de recolecta de las semillas	16
Recolecta de semillas.....	18
Enterramiento de las semillas en la REPSA.....	18
Pruebas de germinación.....	20
Análisis estadístico.....	22

OBSERVACIONES EN EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB).....	22
RESULTADOS	24
Germinación.....	24
Observaciones en el Microscopio Electrónico de Barrido.....	28
DISCUSIÓN.....	35
Observaciones en el MEB.....	38
CONCLUSIONES.....	41
AGRADECIMIENTOS.....	43

RESUMEN

La cubierta funicular dura de las semillas de *Opuntia tomentosa* Salm-Dck es un factor limitante para su imbibición y junto con la presencia de una latencia fisiológica, impiden que el embrión inmaduro pueda germinar. En el presente estudio, se investigó el efecto del enterramiento sobre la respuesta germinativa de las semillas de *O. tomentosa* en un sitio con presencia de dosel vegetal (sombreado) y en un sitio carente de él (expuesto) ubicados en la Reserva del Pedregal de San Ángel, D. F.; así como su efecto sobre la morfología de la cubierta funicular, para lo cual, se obtuvieron fotomicrografías en el microscopio electrónico de barrido de las semillas enterradas y de aquellas que fueron almacenadas en condiciones de laboratorio. Se encontró que sólo las semillas que fueron enterradas germinaron en porcentajes elevados. Las semillas exhumadas mostraron la presencia de hongos cuyas hifas penetraron, fracturaron y erosionaron la cubierta funicular, favoreciendo la germinación.

INTRODUCCIÓN

La cubierta seminal es la defensa primaria de las semillas contra un ambiente adverso, ya que provee al embrión de una barrera física y química que los protege de las variaciones ambientales tales como cambios de temperatura y humedad así como de la invasión por microorganismos (Mohamed-Yasseen, *et al.*, 1994). La cubierta seminal también puede jugar un papel importante en la dispersión de las semillas al presentar estructuras especializadas como alas, tricomas etc (Werker, 1997). Una de sus funciones más importantes es la regulación de la captura de

agua. En el caso de semillas impermeables, evita la absorción de agua y/o el intercambio gaseoso, lo que extiende su longevidad; por el contrario, en semillas permeables, regula la penetración de agua al embrión, ya que si sucede de manera abrupta, podría causar pérdida de sustancias intracelulares durante la imbibición y daño celular.

Las cubiertas seminales duras pueden ser impermeables o permeables al agua y al oxígeno, en el primer caso establecen una latencia física, mientras que en el segundo, crean una resistencia al crecimiento del embrión inmaduro (latencia fisiológica) (Baskin y Baskin, 1998).

En particular, las semillas de *Opuntia tomentosa* presentan latencia fisiológica y una envoltura funicular dura pero permeable, con una baja tasa de captura de agua y que constituye una barrera física para que el embrión inmaduro se expanda; además, requieren de la formación de una valva en la parte cercana al micrópilo y un canal que permita la entrada de agua a la semilla para germinar (Flores-Rentería, 2002; Orozco-Segovia *et al.*, 2007). La valva es una región localizada en los flancos funiculares, cerca del micrópilo; este es el sitio por donde la radícula protruye y puede ser removida de manera artificial para mejorar la germinación (Fig. 2) (Orozco-Segovia *et al.*, 2007). En *O. tomentosa*, las semillas recién liberadas presentan embriones con un bajo potencial de crecimiento. Una vez que la semillas se encuentran en el suelo, el embrión completa su desarrollo y la cubierta funicular se debilita debido a la acción de las fluctuaciones de humedad, temperatura así como de los microorganismos (Olvera-Carrillo *et al.*,

2009). Delgado-Sánchez *et al.* (2011) encontraron que la interacción de tres especies de hongos con semillas de *Opuntia streptacantha*, las cuales presentan latencia fisiológica, tiene un efecto positivo sobre la germinación debido a que ocurre la erosión de la cubierta seminal, su debilitamiento y en consecuencia se reduce la resistencia mecánica, lo que facilita la emergencia del embrión.

El objetivo de la presente investigación fue conocer el efecto del enterramiento de las semillas de *Opuntia tomentosa* en su cubierta funicular y respuesta germinativa, en comparación con las semillas almacenadas en el laboratorio. El enterramiento de semillas de especies como las de la subfamilia Opuntioideae, las cuales presentan baja germinación, puede tener efectos positivos sobre la germinación y el establecimiento de las plántulas, por lo que puede ser utilizado con fines de restauración ecológica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer el efecto del enterramiento en la cubierta funicular y la respuesta germinativa de semillas de *Opuntia tomentosa* Salm-Dyck (Cactaceae).

Objetivos particulares

Conocer el efecto del enterramiento sobre la cubierta funicular de las semillas de *O. tomentosa*.

Determinar el efecto de la remoción de la valva sobre la germinación máxima, la tasa de germinación y el tiempo de inicio de la germinación en las semillas de *O. tomentosa*.

Determinar el efecto del enterramiento en diferentes sitios, en la germinación máxima, la tasa de germinación y el tiempo de inicio de la germinación en las semillas de *O. tomentosa*.

Determinar el efecto de la temperatura sobre la germinación máxima, la tasa de germinación y tiempo de inicio de la germinación en las semillas de *O. tomentosa*.

HIPÓTESIS

Las temperaturas alternantes, la remoción manual de la valva y el enterramiento de las semillas de *O. tomentosa* tendrán un efecto positivo sobre su respuesta germinativa.

El enterramiento de las semillas de *O. tomentosa* provocará cambios sobre su cubierta funicular debido a factores físicos y biológicos tales como fluctuaciones de temperatura y humedad; así como a la acción de microorganismos del suelo.

ANTECEDENTES

Germinación

Las semillas son el producto de la reproducción sexual en las plantas y la unidad de dispersión de la especie en el tiempo y espacio (Vázquez-Yanes *et al.* 1997).

La germinación de las semillas depende, por un lado, de factores externos como la disponibilidad de agua, la presencia de oxígeno, la temperatura, la luz y la presencia o no de sustancias químicas inhibitorias; así como de factores inherentes a la semilla los cuales pueden inhibir o promover la germinación (Bewley y Black, 1994).

Cuando una semilla viable se hidrata, se inicia una cadena de eventos metabólicos que resulta en la emergencia de la radícula, lo que significa que la germinación se ha completado. Durante la imbibición, el metabolismo se reactiva rápidamente. La respiración, la actividad enzimática y de organelos así como la síntesis de RNA y DNA son actividades celulares fundamentales implicadas en la germinación y en el crecimiento subsecuente de la plántula (Bewley y Black, 1994). En general, la absorción del agua en semillas con cubierta permeable se lleva a cabo en tres fases (Fig. 1) (Bewley y Black, 1994, Bradford, 1995):

Fase I o de imbibición: Se caracteriza por la imbibición rápida de la semilla, debida al gradiente de potencial hídrico que existe entre el suelo y la semilla. La toma de agua ocurre independientemente de que la semilla sea o no viable y se encuentre o no latente, siempre que la cubierta de la semilla sea permeable. En esta fase la captura de agua es pequeña y no excede dos o tres veces el peso seco de la semilla. En esta fase se inicia la reparación del material genético, de las mitocondrias y la síntesis de proteínas (Bewley y Black, 1994, Sánchez *et al.* 2001).

Fase II o de activación: Es la fase estacionaria, en términos de captura de agua debido a que al incrementarse el potencial hídrico de la semilla se establece un equilibrio entre el potencial hídrico de la semilla y el potencial hídrico del ambiente. Cuando la humedad alcanza un 70% se activa la bomba de protones que acidifica las paredes celulares e incrementa su elasticidad lo que permite el incremento del contenido de agua, la vacuolización y el crecimiento celular (crecimiento ácido) (Sánchez *et al.* 2001). Durante esta fase se llevan a cabo los principales eventos metabólicos, tales como el inicio de la actividad enzimática y el metabolismo respiratorio, el aumento en el número de mitocondrias, reparación del DNA, aumento en la cantidad de ATP, la traslocación y asimilación de reservas en las regiones de crecimiento del embrión; así como la reparación de las membranas, lo que interviene en la preparación del embrión para la emergencia de la radícula en semillas no latentes; las semillas latentes en esta fase también son metabólicamente activas (Bewley y Black, 1994, Vázquez-Yanes *et al.* 1997, Orozco-Segovia y Sánchez-Coronado, 2009).

Fase III: Se asocia con la emergencia de la radícula. En esta fase se inicia la movilización de sustancias de reserva de los cotiledones lo que favorecerá el establecimiento de la plántula. Se incrementa la captura de agua debido a que hay crecimiento y división celular en la radícula, lo que indica que la germinación se ha completado (Bewley y Black, 1994).

La duración de cada una de estas fases y la activación de los procesos metabólicos que ocurren en ellas dependen de las características intrínsecas de

las semillas y de las condiciones ambientales, principalmente de la disponibilidad de agua (Bewley y Black, 1994).

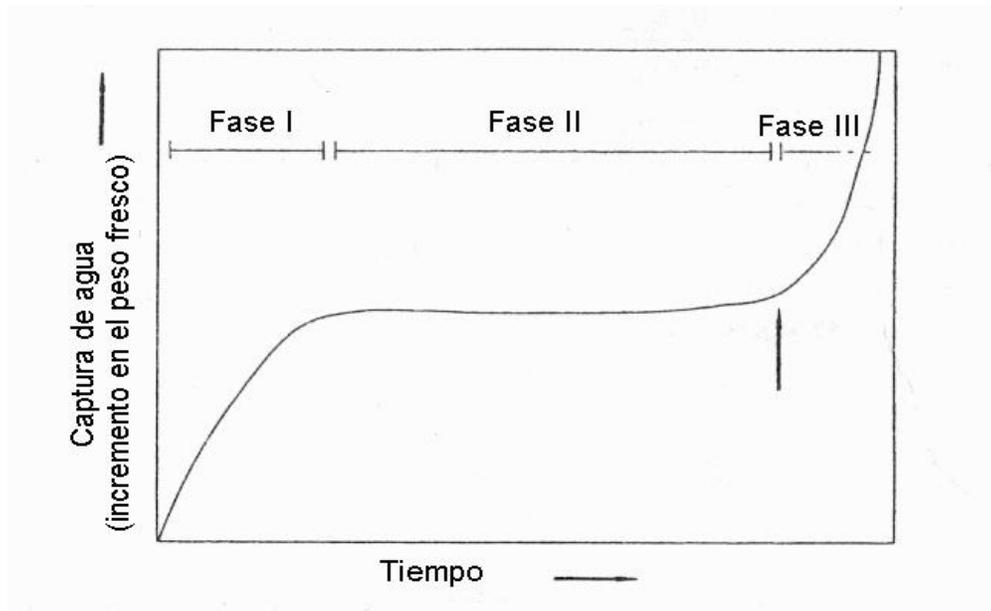


Figura 1. Patrón trifásico de captura de agua en la germinación. Tomado de Bewley y Black, (1994).

Latencia

En muchas especies, existen mecanismos que impiden la germinación de las semillas después de caer al suelo aún cuando las condiciones ambientales son buenas. Cuando la germinación no ocurre en semillas no latentes debido a la falta de condiciones ambientales adecuadas, como humedad, oxigenación, luz y temperatura, se dice que la semilla se encuentra quiescente, es decir, en un estado de reposo metabólico que se rompe con la disponibilidad adecuada de estos factores (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997; Baskin y Baskin, 1998). La latencia es un proceso en el cual la actividad fisiológica de la semilla es reducida, incluso cuando las condiciones ambientales son adecuadas para la germinación.

Las semillas pueden presentar diferentes tipos de latencia en diferentes etapas de su vida. Baskin y Baskin (1998), señalan la existencia de varios tipos de latencia. Una de ellas es la latencia primaria, la cual se presenta cuando la semilla aún se encuentra en la planta madre y continúa hasta que el impedimento endógeno cesa (Vázquez-Yanes *et al.* 1997). Dicho impedimento puede deberse a la inmadurez del embrión y a la presencia de inhibidores químicos para la germinación presentes en la cubierta seminal o en el embrión. La latencia secundaria ocurre cuando las semillas están en condiciones fisiológicas para germinar, pero se encuentran condiciones ambientales desfavorables para la germinación por ejemplo, los bajos niveles de oxígeno y la alta concentración de CO₂ (> 40%) y no germinarán bajo ninguna condición, por lo que se dice que se encuentran en un estado de reposo profundo (Vázquez-Yanes *et al.* 1997; Baskin y Baskin, 1998). Este tipo de latencia puede aunarse o sustituir a la latencia primaria y puede darse en más de una ocasión durante la vida de la semilla (Fenner, 2000).

Por otro lado, hay tres tipos fundamentales de latencia primaria que ocurren cuando la semilla ya no se encuentra en la planta madre: morfológica, física y fisiológica. En la latencia morfológica, la germinación no ocurre debido a características morfológicas del embrión. Se requiere que éste atraviese por un periodo de crecimiento y/o diferenciación antes de que pueda ocurrir la germinación. Las semillas con latencia física tienen testas impermeables; por lo que el embrión se encuentra seco hasta que la cubierta seminal se rompe y el agua puede entrar, mientras que la latencia fisiológica se debe a un desbalance hormonal en la semilla, principalmente determinado por la cantidades relativas de

ácido abscísico y ácido giberélico (ABA:AG₃) y/o a cambios en la sensibilidad de la semilla a alguna de estas hormonas. Los distintos tipos de latencia pueden estar combinados en la misma semilla, una combinación de latencia morfológica y fisiológica (morfofisiológica) es muy común, pero latencia física y fisiológica combinadas es muy raro y una combinación de latencia física y morfológica es poco probable (Baskin y Baskin, 1998).

La latencia morfofisiológica es frecuente en ambientes con climas estacionales. Para romperla se requiere del crecimiento o diferenciación del embrión así como de la ausencia de mecanismos fisiológicos que estén inhibiendo la germinación. La latencia física es común en hábitats con una marcada temporada seca como sabanas, desiertos, estepas y matorrales. Por otro lado, la latencia fisiológica está ampliamente distribuida, mientras que las especies que no presentan latencia se encuentran en su mayoría en bosques tropicales (Fenner y Thompson, 2005).

La pseudolatencia ocurre en semillas que se encuentran en el suelo y que están aptas para germinar en el hábitat que ocupan, pero que no germinan debido a la falta de requerimientos especiales de luz, de temperatura, o de otro factor ambiental, por lo que la germinación está controlada por las condiciones físicas del ambiente que rodea a las semillas (Vázquez-Yanes *et al.* 1997).

Papel de las cubiertas seminales en la germinación

En las semillas de varias especies de cactáceas y en especial las de algunas especies del género *Opuntia* se han utilizado diferentes métodos para eliminar la latencia y mejorar su germinación. Estos métodos han consistido en la

escarificación mecánica, inmersión en ácido giberélico, inmersión en agua a cerca de 100°C, inmersión en ácido sulfúrico (Dubrovsky, *et al.*, 1996; Godínez-Álvarez *et al.*, 1998; Olvera-Carrillo *et al.*, 2003; Rosas-López *et al.*, 2004; Reyes-Agüero *et al.*, 2006). En particular, las semillas de *O. tomentosa* tienen un bajo porcentaje de germinación, aún después de cinco años de almacenamiento en laboratorio (Olvera-Carrillo, 2003), esto se debe a que al ser liberadas de la planta madre presentan latencia fisiológica, además de una cubierta funicular que, aunque es permeable al agua, su dureza e integridad limitan la entrada de agua, además de que constituye una barrera mecánica para la protrusión del embrión inmaduro (Orozco-Segovia *et al.* 2007).

Desde el punto de vista embriológico, el funículo se desarrolla a partir de la placenta, durante la maduración del óvulo. Su principal función es la transferencia de nutrientes y agua desde la planta madre, hacia el óvulo en desarrollo; y después de la fertilización, hacia la semilla en desarrollo. En la mayoría de los casos, la función del funículo termina cuando la semilla madura se deshidrata, pero en otros puede permanecer unido a la semilla y al fruto (Werker, 1997). En las semillas de *O. tomentosa* la cubierta funicular se desarrolla rápidamente durante los primeros estadios de la desarrollo del óvulo. El funículo se va curvando en la región dorsal y posteriormente se empieza a extender por ambas caras del óvulo cubriéndolo en su totalidad y dejando un orificio o micrópilo por donde penetra el tubo polínico durante la fecundación. Así, el funículo no sólo es circundante sino también envolvente (Flores-Rentería, 2002). Una característica presente en las células de la cubierta funicular son los depósitos de oxalato de

calcio en forma de drusas; así como células con depósitos de taninos. Las células de la cubierta funicular, después de la fecundación, comienzan a engrosar sus paredes y se forman esclereidas con paredes muy gruesas y lúmenes muy reducidos (Flores-Rentería, 2002). En la parte externa de la cubierta funicular se encuentran las células epidérmicas que se diferencian en tricomas unicelulares que se hidratan al contacto con agua, mientras que en la semilla seca se pegan a la cubierta funicular (Flores-Rentería, 2002). Cuando las semillas se encuentran en el suelo, la latencia fisiológica debe romperse y la cubierta funicular debe debilitarse para que ocurra la germinación (Olvera-Carrillo *et al.*, 2009a).

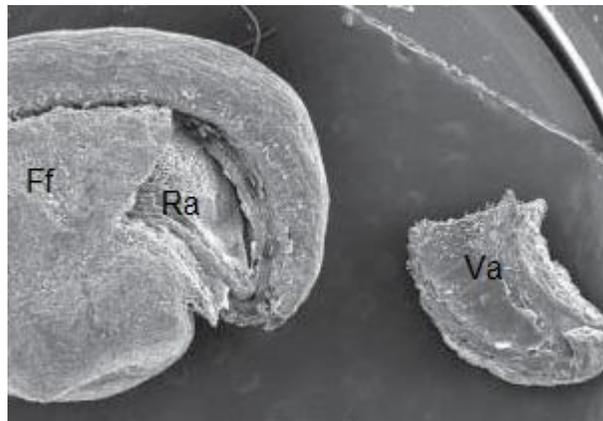


Figura 2. Morfología externa de la semilla de *O. tomentosa*. Ff, Flanco funicular; Ra, Radícula; Va, Valva. Tomado de Orozco-Segovia *et al.* (2007).

El ambiente del suelo

Los microorganismos del suelo

En el ambiente heterogéneo y cambiante del suelo, las semillas están expuestas a la presencia de hongos y bacterias y a la abrasión por las partículas del suelo (Baskin y Baskin, 2000). Las bacterias más abundantes en el suelo son cocobacilos (Baskin y Baskin, 1998). Otros microorganismos importantes del suelo incluyen a los actinomicetes, que ayudan a descomponer residuos de plantas y animales atacando la celulosa, polisacáridos y hemicelulosa, así como otros compuestos. Entre los hongos se incluyen Phycomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes y hongos imperfectos que utilizan una amplia variedad de materiales orgánicos como fuente de alimento (Baskin y Baskin, 1998). Garret (1951) describe una sucesión de hongos en el proceso de colonización de los tejidos vegetales en el suelo, que se inicia con hongos que utilizan azúcares, después hongos que degradan la celulosa y finalmente aquellos que degradan la lignina. A pesar de que los hongos y bacterias del suelo parecen causar la muerte de algunas semillas enterradas (Schafer y Kotanen, 2003); también se ha visto que, en tales condiciones, la mortalidad de las semillas se debe a otros factores diferentes a la infección por hongos, como en *Oryzopsis hymenoides* (Poaceae) y *Purshia tridentata* (Rosaceae) cuyas semillas son depredadas por granívoros, en este caso, se encontró que aquellas semillas infectadas por hongos no eran consumidas por su depredador (Crist y Friese, 1993). Se ha observado que incluso la presencia de hongos puede ser esencial para que ocurra la germinación

como en *Rosa corymbifera* "Laxa" (Morphet y Hall, 2000). Pfeiffer (1934) señaló el efecto de los hongos en la descomposición de las fibras de la cubierta de semillas de *Symphoricarpos racemosus*. Delgado-Sánchez *et al.* (2011) identificaron erosión de la testa de *O. streptacantha*, debida a la presencia de *Penicillium chrysogenum* y *Phoma sp*, lo que redujo su resistencia y en consecuencia, favoreció la germinación; sin embargo, al parecer la estructura que en realidad fue erosionada fue la cubierta funicular, ya que es la estructura que se encuentra expuesta directamente a factores externos.

Efecto de la temperatura

La temperatura se encuentra estrechamente relacionada con los procesos metabólicos que ocurren durante la germinación (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997), así como con la inducción y rompimiento de la latencia (Fenner y Thompson, 2005). La germinación de cada especie ocurre en un intervalo de temperaturas relacionado con el hábitat que ocupan, por lo que es un factor determinante en la distribución de las plantas (Orozco-Segovia y Sánchez-Coronado, 2009)

Las temperaturas constantes en ambientes áridos podrían actuar como señal ambiental, indicando que se han establecido las lluvias y por lo tanto las fluctuaciones de temperatura se amortiguan, mientras que en los ambientes húmedos es una señal de la existencia de una cubierta vegetal o una cierta profundidad del suelo (2-3 mm) (Orozco-Segovia y Sánchez-Coronado, 2009). Por otro lado, existen especies en las que la germinación se reduce, o no ocurre a temperaturas constantes, como es el caso de *Paspalum guenoarum* (Otegui *et al.*,

2005) y *Sorghum bicolor* (Benech *et al.*, 1995). Por el contrario, la germinación se incrementa por el número y la amplitud de las alternancias de temperatura y el calor seco, los cuales juegan un papel importante en la ruptura de la cubierta en especies con semillas duras como las pertenecientes a la familia Fabaceae (Fenner, 2000; Guenni *et al.*, 1999).

La temperatura regula el rompimiento de las cubiertas duras principalmente en dos formas:

1. Climática, a través del efecto de calentamiento de las capas superficiales de los suelos secos (insolación), junto con el enfriamiento nocturno, resultando en una combinación de exposición a altas temperaturas y amplias fluctuaciones de temperatura (Fenner, 2000), lo que ocurre en algunas leguminosas como *Stylosanthes hamata* y otras pertenecientes a los géneros *Lupinus* y *Trifolium* (Guenni *et al.*, 1999).

2. Relacionadas con el fuego, a través del breve pero intenso calentamiento de las capas superficiales del suelo, causado por incendios (Fenner, 2000).

En condiciones de laboratorio, las semillas necesitan ser incubadas en temperaturas alternantes simulando las condiciones que prevalecen en su ambiente natural (Baskin y Baskin, 1998). En el aspecto bioquímico, hay estudios que señalan el efecto positivo de la alternancia de temperatura sobre la germinación al disminuir la sensibilidad de las semillas al ABA (Benech-Arnold, *et al.*, 1995). Por otro lado, Pressman *et al.*, (1977) encontraron que el efecto de la

fluctuación de temperatura puede sustituir al requerimiento de luz para la germinación de semillas de *Apium graveolens*.

La temperatura fluctuante tiene un papel importante en la ruptura de la latencia fisiológica en *Opuntia puberula* como señalan Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet (1998), En esta especie observaron que la alternancia de temperaturas tuvo un efecto favorable al aumentar el porcentaje de germinación de *Opuntia puberula*; aunque éste siguió siendo bajo, menos de 20%; mientras que en otras especies de cactáceas como *Coryphanta pallida*, *Ferocactus flavovirens*, *Myrtillocactus geometrizans* y *Pachycereus hollianus* la alternancia de temperatura no tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de germinación, por lo que sugieren que dichas especies no presentan latencia fisiológica y que la falta de germinación se debe principalmente a factores ambientales como la deficiencia de agua y la radiación solar directa.

MATERIALES Y MÉTODOS

La especie

Opuntia tomentosa Salm-Dyck (Cactaceae, subfamilia Opuntioideae) es una cactácea arborescente, de tres a seis metros de altura, con copa irregular y abierta que se distribuye en las zonas áridas de la Meseta Central de México (Bravo-Hollis, 1978). En el valle de México, esta especie se distribuye en la zona volcánica conocida como Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) (Rzedowski, 1994). Los cladodios adultos son más o menos tres veces más largos que anchos, miden de 24 a 26 cm de largo y de 8.5 a 10 cm de ancho; son

pubescentes, de color verde oscuro a verde grisáceo oscuro. La epidermis presenta tricomas muy abundantes. Las espinas presentan lana de color gris negruzco y glóquidas de color amarillo oscuro. Tiene flores tubulosas de color rojo, las anteras tienen el filamento de color rosa rojizo; el grano de polen es poliporado; el estilo es púrpura. Los frutos son elipsoides, con el pericarpelo de paredes delgadas de color rojo purpúreo, posee glóquidas abundantes de color castaño con espinas setosas (Scheinvar, 1982).

Área de recolecta de las semillas

La recolecta de las semillas se realizó en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) que se localiza al sur del Valle de México, entre las coordenadas 19°18'31" – 19°19'17"N y 99°10'20" – 99°11'52"O, a una altitud de 2,292 – 2,365 m snm. Presenta un sustrato de lava con poco suelo donde se establecen condiciones de sequía edáfica y una vegetación de matorral xerófilo. Durante la época de lluvias la vegetación llega a ser muy cerrada, sobre todo en algunos microambientes específicos (Castillo-Agüero *et al.*, 2004). La precipitación anual promedio es de 803 mm y la temperatura media anual es de 15.5°C (Rzedowski, 1994).

El clima presente en la zona es templado subhúmedo con régimen de lluvias en verano [Cb(w₁)w]. La lluvia se distribuye de manera diferencial en el año, lo que permite distinguir dos épocas, la de lluvias que va de junio a octubre, y la seca que abarca de noviembre a mayo (Castillo-Agüero *et al.*, 2004).

El Pedregal de San Ángel presenta extensiones cubiertas por fragmentos de roca volcánica en diferentes fases de formación de suelo, las cuales revisten un

importante valor en términos de biodiversidad debido a que la superficie rocosa con sus grietas y oquedades ofrece una gran variedad de microambientes en donde se pueden desarrollar diversas especies. La heterogeneidad espacial es evidente en este ambiente, de manera general se reconocen dos fisionomías contrastantes, la de sitios abiertos y sitios cerrados (Cano-Santana y Meave, 1996). En la REPSA se observa una amplia variedad de formas de crecimiento. Con 279 especies, las hierbas son la forma dominante, de las cuales la mayoría son hierbas erectas (229 especies) mientras que las hierbas arrosetadas, trepadoras, rastreras y suculentas, así como las epífitas, son relativamente poco frecuentes. Se encuentran también 48 especies de arbustos y diez especies de árboles: *Buddleia parviflora*, *B. cordata*, *Bursera cuneata*, *Esyenhardtia polystachya*, *Fraxinus uhdei*, *Quercus deserticota*, *Schinus molle*, *Tecoma stans*, *Eucalyptus resinifera* y *E. globulus* (Castillo-Agüero *et al.* 2007).

En la REPSA, la disponibilidad de agua es restringida debido a la alta infiltración causada por la estructura rocosa y la baja retención de agua en la superficie del suelo; así como por la amplia fluctuación de temperatura diaria (hasta 34°C). La distribución de las lluvias, la altitud y la distribución de la roca y el suelo hacen del área en donde se distribuye *O. tomentosa* un ambiente árido discontinuo y heterogéneo (Olvera-Carrillo *et al.* 2003).

Recolecta de semillas

Las recolectas de las semillas se realizaron al finalizar la temporada de lluvias, en el mes de diciembre del año 2006 y en el mes de noviembre del año 2009. Los frutos se tomaron de plantas adultas, directamente de los cladodios, únicamente se recolectaron los frutos maduros; caracterizados por una coloración rojiza y que no estuvieran dañados por parásitos o depredadores. Se transportaron en bolsas de papel al laboratorio, donde se removieron las semillas de la pulpa de forma manual, se colocaron en un tamiz y se enjuagaron vigorosamente con agua corriente, se mezclaron las semillas de todos los frutos colectados de diferentes individuos y se dejaron secar en un sitio oscuro; posteriormente se almacenaron en frascos de vidrio transparentes en el laboratorio de Ecología Fisiológica del Instituto de Ecología, UNAM (21.63 ± 1.78 °C y H.R. = $38.69 \pm 6.31\%$).

Enterramiento de las semillas en la REPSA

Se usaron tres bolsas de organza, para cada uno de los dos sitios de enterramiento, en cada bolsa se colocaron 20 g de semillas. Éstas a su vez se colocaron dentro de otra bolsa de malla plástica de mosquitero. Las bolsas de malla plástica con semillas se enterraron, del mes de enero al mes de mayo de 2007, en dos lugares distintos dentro de la REPSA, una bajo la sombra de un árbol (*Buddleia cordata*) (sitio sombreado) y la otra en un sitio con vegetación herbácea (sitio expuesto). El enterramiento se realizó a 5 cm de profundidad; las semillas que funcionaron como grupo se mantuvieron almacenadas en el laboratorio.

El enterramiento de las semillas recolectadas en el 2009 se realizó durante 6 meses, de noviembre del 2009 a abril del 2010, en los mismos sitios y condiciones que las semillas de la cosecha del 2007. Transcurridos los seis meses, se desenterraron cubriéndolas con papel aluminio para evitar su exposición a la luz y se dejaron secar en un cuarto oscuro fuera de la bolsa. Una vez secas, las semillas se almacenaron en frascos de vidrio transparente en el laboratorio.

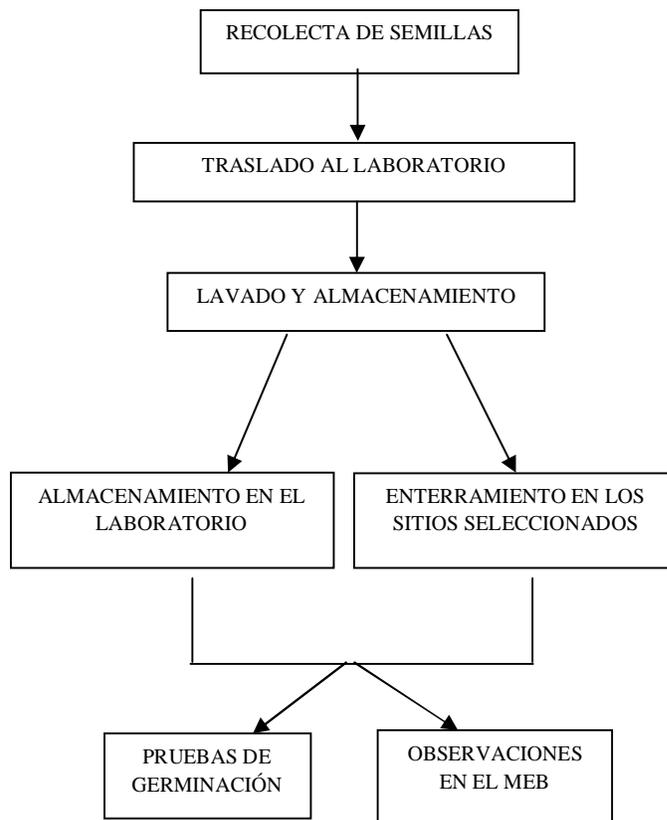


Fig. 3. Diagrama de flujo de la metodología empleada para el tratamiento de las semillas de *Opuntia tomentosa*.

Pruebas de germinación

Las semillas recolectadas en 2006 fueron desinfectadas antes de la siembra con una solución fungicida 0.2% (Captan 50[cis-N-[(triclorometil)tio]-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida], (AGM,México). La remoción de la valva se realizó de manera manual con un alfiler en el caso de las semillas desenterradas y, en el caso de las semillas control la valva se removió con un rectificador (DREMEL, Multipro 3956-02, México) equipado con una broca de joyería (0.8 mm de diámetro). Las semillas se colocaron en cajas de petri con sustrato de agar-agua (1%) y se incubaron en cámaras de germinación (Lab-Line Instruments, Inc., 822, IL, USA) equipadas con lámparas de luz blanca (25W) a temperatura constante (25°C) y a temperatura alternante (25-35°C), ambas con un fotoperiodo de luz/oscuridad 18/6 h.

En el diseño experimental se consideraron tres réplicas con 30 semillas cada una y la germinación fue registrada diariamente durante 30 días. La germinación se consideró cuando se observó la emergencia de la radícula.

Las pruebas de germinación se realizaron tanto en semillas desenterradas como en semillas control.

Las semillas utilizadas en las pruebas de germinación fueron de la cosecha del año de 2006 y la prueba de germinación se realizó en el año de 2008. Para conocer el efecto de la remoción de la valva las pruebas de germinación se realizaron en semillas con valva y sin valva. El diseño experimental fue el siguiente: 3 condiciones de enterramiento (control, expuesto y sombreado) × 2 condiciones de presencia de valva (si y no) × 2 condiciones de temperatura (constante y alternante).

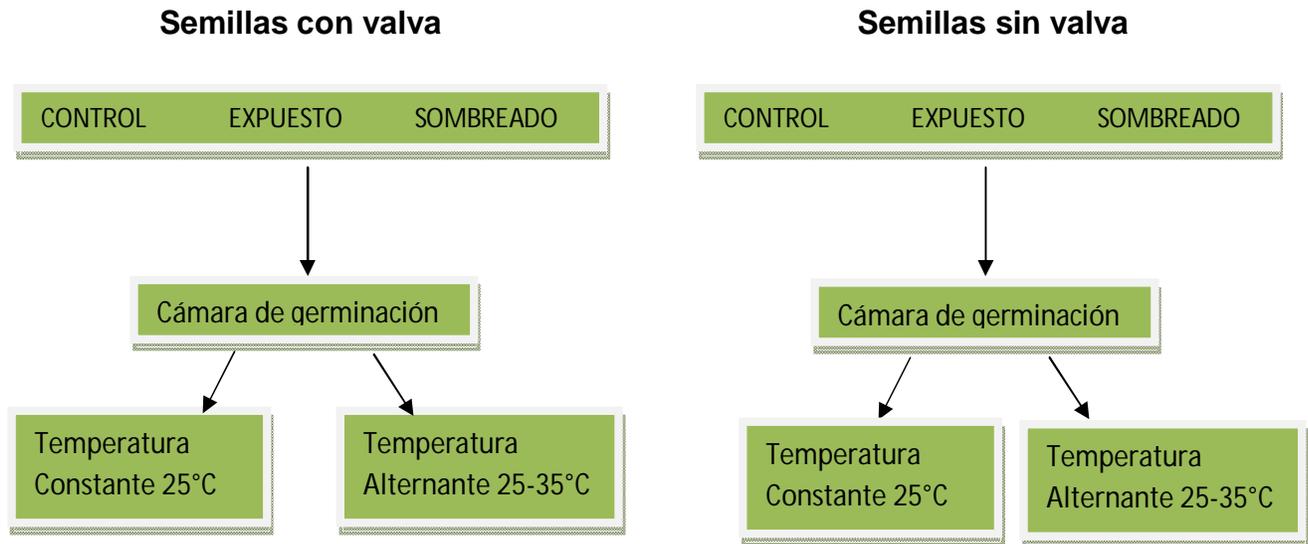


Fig. 4 Diseño experimental para las pruebas de germinación de semillas de *Opuntia tomentosa* recolectadas en 2006. C V= con valva, S V= sin valva.

Las variables evaluadas fueron:

Capacidad germinativa (Porcentaje de germinación máximo para cada tratamiento)

Tasa de germinación (Velocidad de germinación)

Lag time (Tiempo de inicio de la germinación)

Análisis estadístico

Se realizó la transformación arcoseno (Zar, 1974) de los porcentajes de germinación acumulados para cada réplica para cumplir con los supuestos de los análisis paramétricos y posteriormente se ajustaron a una función sigmoide de la forma: $y = (\exp(-a/x) \times b / (1 + c) \times (\exp(d \times (e - x))))$ (desarrollada por Susana Orozco-Segovia, comunicación personal). A partir de esta curva se obtuvo la tasa de germinación máxima (primera derivada máxima) y el lag time o tiempo de inicio de la germinación. Para lo anterior se utilizó el programa Table Curve 2D, ver. 3.0, 2000 (AISN Software, Inc., Chicago, IL, USA).

Para conocer el efecto de los diferentes tratamientos sobre las semillas, se analizaron la capacidad germinativa, tasa de germinación y lag time con Análisis de Varianza (ANOVA) de tres vías utilizando el programa Statgraphics, ver. 5.0, (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, USA). Las diferencias entre medias se analizaron con la prueba de Tuckey. En aquellos casos en los que no se cumplió con los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas los datos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones se hicieron visualmente con diagramas de caja y bigotes.

OBSERVACIONES EN EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB)

Se comparó la morfología externa de las semillas enterradas y control de las recolectas 2006 y 2009 (Fig. 5). Para ello se fijaron en FAA (formaldehído-ácido acético-etanol al 96%) y posteriormente, para su observación en el microscopio

electrónico de barrido (MEB), se les deshidrató en una serie gradual de etanoles (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%) (López *et al.*, 1998). Se desecaron con CO₂ líquido en un desecador de punto crítico (CPD 030 Balt Tec). Las muestras se montaron en portamuestras de aluminio utilizando cinta conductiva de carbón de doble cara y se cubrieron con aproximadamente 200 nm de oro con una ionizadora Desk II (Denton Vacuum Inc., Norristown, NJ, USA). Las observaciones y registro fotográfico se realizaron con un microscopio electrónico de barrido marca JEOL; modelo JSM-5310LV.

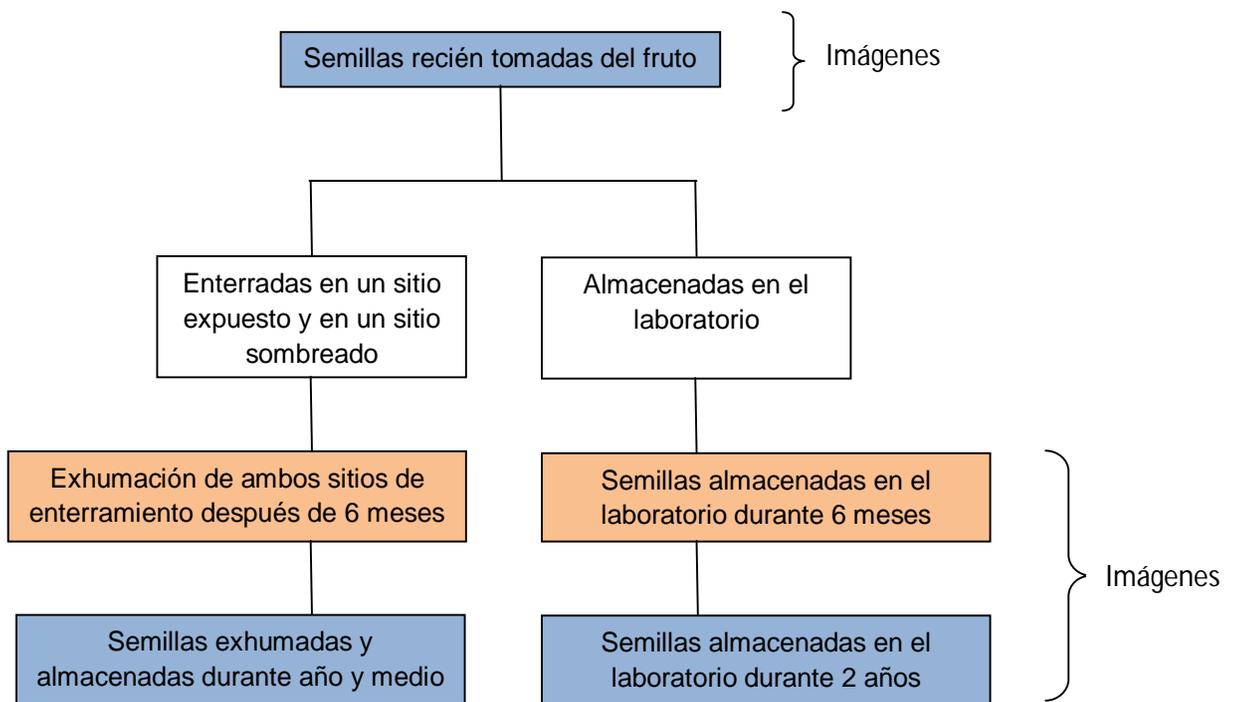


Fig. 5 Diagrama de las etapas en las que se obtuvieron semillas para ser observadas en el MEB. Los cuadros en color azul indican que las semillas observadas pertenecen a la recolecta del año 2006, mientras que los cuadros en color anaranjado indican semillas de la recolecta del año 2009. En el momento representado por los cuadros color blanco no se obtuvieron imágenes.

Para confirmar la presencia de hifas en la cubierta de las semillas que fueron enterradas, se realizó una tinción con azul de algodón. Se colocaron unas gotas de colorante en la semilla y se observaron en el microscopio estereoscópico (Carl Zeiss modelo Stemi DV4). Con una navaja se tomó una muestra de la superficie que se tiñó de azul, se colocó y extendió en un portaobjetos. Se observó con el microscopio óptico (Olympus Provis AX-70;Olympus, Tokyo, Japan) con un aumento de 40X.

RESULTADOS

Germinación

El enterramiento, tanto en sitio expuesto como en sitio sombreado, y la remoción de la valva incrementaron significativamente los porcentajes de germinación ($F_{2,35} = 14.50$, $P = 0.0001$, $F_{1,35} = 75.48$, $P = 0.0001$ respectivamente). La interacción entre el enterramiento en ambos sitios, la remoción de la valva y la temperatura fue significativa ($F_{2,35} = 8.17$, $P = 0.002$). En semillas sin valva almacenadas en el laboratorio durante 2 años, los porcentajes de germinación fueron mayores que aquellos de semillas con valva, tanto a temperatura fluctuante como constante (Figura 6). Las semillas sin valva almacenadas en el laboratorio e incubadas a 25°C, mostraron porcentajes de germinación similares a aquellos de las semillas enterradas mientras que las semillas sin valva almacenadas en el laboratorio e incubadas a temperaturas alternantes mostraron una germinación menor que las semillas sin valva de otros tratamientos.

La germinación de las semillas con valva almacenadas en el laboratorio fue la menor, independientemente de la temperatura de germinación. La temperatura de germinación no afectó el porcentaje de germinación de las semillas con valva enterradas. Por otro lado, se observó un efecto equivalente en las semillas con y sin valva previamente enterradas en el sitio expuesto e incubadas a 25°C.

La tasa de germinación no fue afectada de manera significativa por ningún tratamiento ($H = 11.42$, $P = 0.408$), quizá debido a la alta heterogeneidad en la respuesta de las semillas.

La temperatura, por sí misma, no afectó el lag time ($F_{1,35} = 0.49$, $p = 0.490$). El enterramiento y la remoción de la valva redujeron significativamente el lag time ($F_{2,35} = 31.43$, $P = 0.001$; $F_{1,35} = 51$, $P = 0.0001$ respectivamente). La interacción de la temperatura, el enterramiento y la remoción de la valva sí fue significativa ($F_{2,35} = 5.08$, $P = 0.014$). Los intervalos más largos se observaron en semillas almacenadas en el laboratorio con valva y fueron significativamente más largos en temperatura alternante que en temperatura constante. En semillas enterradas no hubo diferencias significativas sin importar la presencia o la ausencia de la valva.

Temperatura

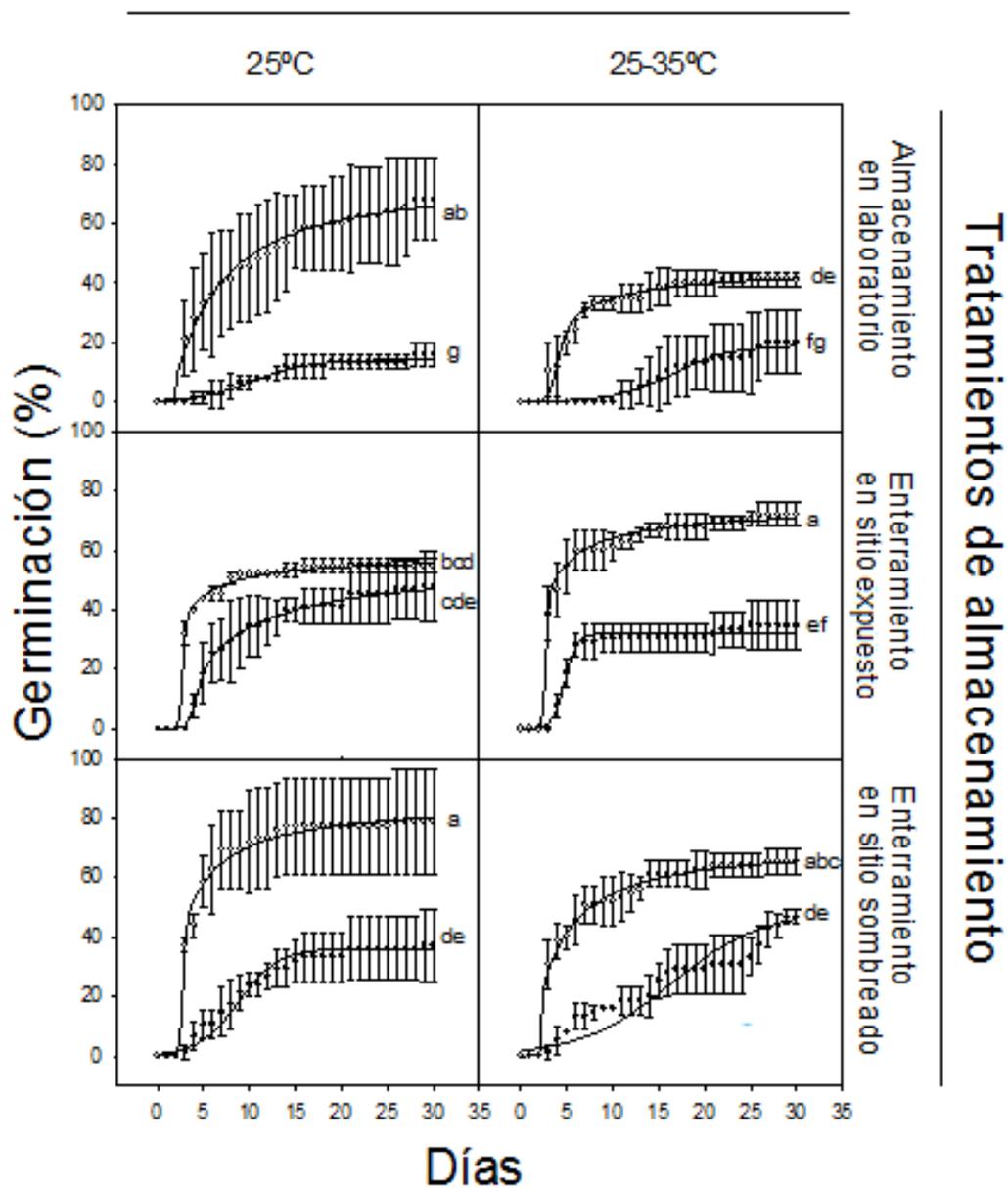
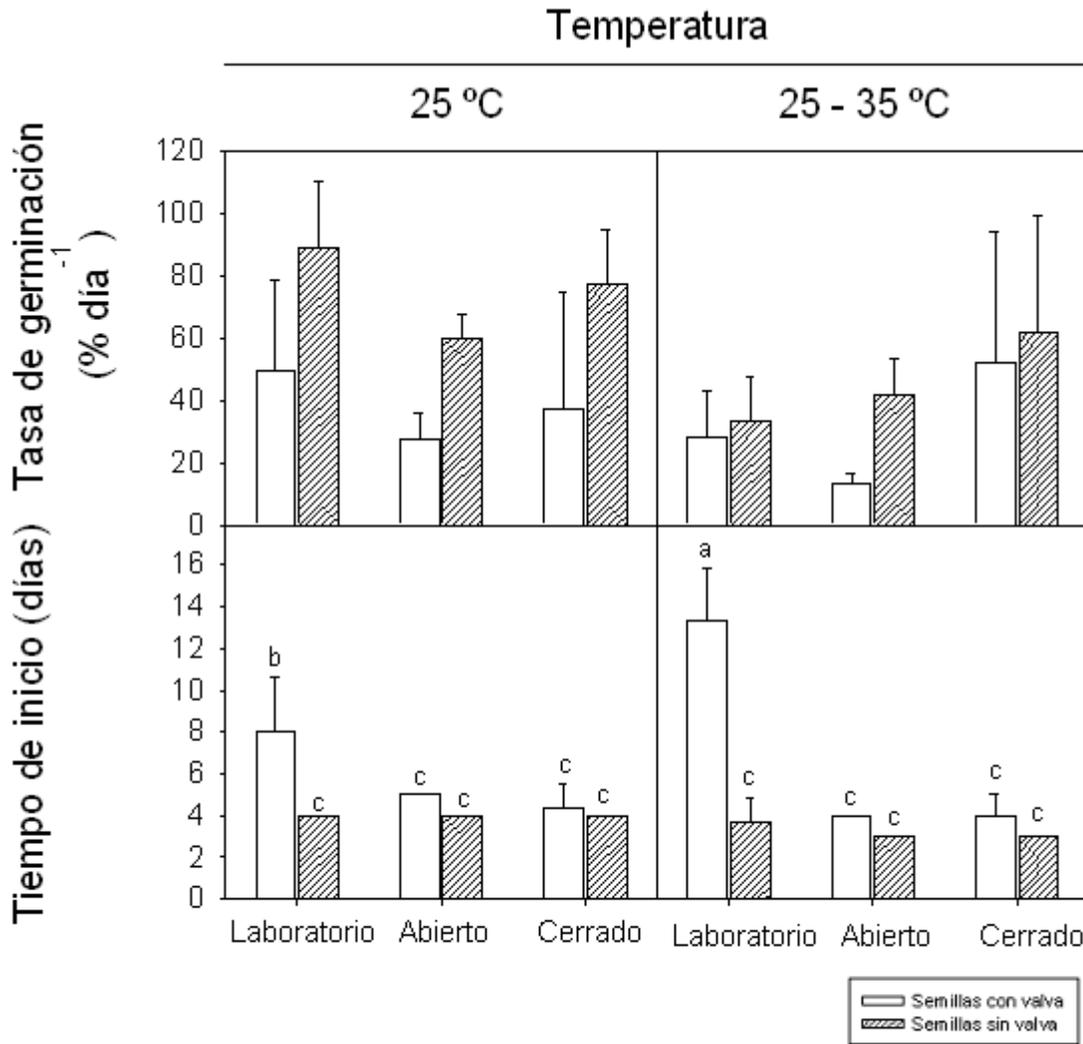


Figura 6. Efecto del enterramiento, remoción de la valva y de la temperatura en el porcentaje de germinación acumulada de semillas de *O. tomentosa* recolectadas en el 2006. Las semillas fueron incubadas a temperatura constante (25°C) y alternante (25-35°C). Se muestran las medias \pm DS. Las letras al final de la curva indican la comparación estadística entre tratamientos.



Tratamientos de almacenamiento

Figura 7. Efecto del enterramiento, remoción de la valva y de la temperatura sobre la tasa máxima y el tiempo de inicio (*lag time*) de germinación de semillas de *O. tomentosa* recolectadas en el 2006. Se muestran las medias \pm DS. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas dentro de cada tratamiento.

Observaciones en el Microscopio Electrónico de Barrido

El almacenamiento durante 2 años y el enterramiento produjeron cambios en la cubierta funicular de las semillas de *O. tomentosa*. En las figuras 8a, b y c se observa la semilla recién tomada del fruto antes de ser lavada. En las figuras 8d y e se observa la semilla después de ser lavada y almacenada durante 6 meses en el laboratorio. En la figura 8f se observa un acercamiento a la cubierta funicular, donde se observan las fibras de lignina.

En las semillas almacenadas en el laboratorio durante 2 años, se observa una marcada separación de la cubierta funicular (Figura 9a); así como una ligera separación en la región hilo-micropilo (Figura 9b), en esta misma región se observan también fracturas y la exposición de los haces vasculares (Figura 9c). En los flancos funiculares no se encontraron fracturas; sin embargo, hubo una ligera degradación de la cutícula (Figura 9d).

En las semillas enterradas en un sitio expuesto y un sitio sombreado (Figuras 10a y d) se observó una ligera separación de la cubierta funicular. En la región hilo-micropilo y en los flancos funiculares hubo una pronunciada degradación (Figuras 10b, c, e y f).

En las semillas enterradas en un sitio expuesto y uno sombreado durante 6 meses y posteriormente almacenadas durante año y medio en el laboratorio, se observó una pronunciada degradación de los flancos funiculares (Figuras 11a y d) y de la región hilo-micropilo (Figuras 11b y e). La degradación del funículo dejó expuestos a los haces vasculares (Figuras 1c y f).

En las semillas enterradas, tanto en un sitio expuesto como en uno sombreado, se observó una alta densidad de estructuras filamentosas de forma homogénea sobre la cubierta funicular (Figuras 12a y b). Dichas estructuras fueron consideradas como hifas. Además, se observaron estructuras acompañantes con apariencia de conidióforos (12d y f) y esporas (12c y e).

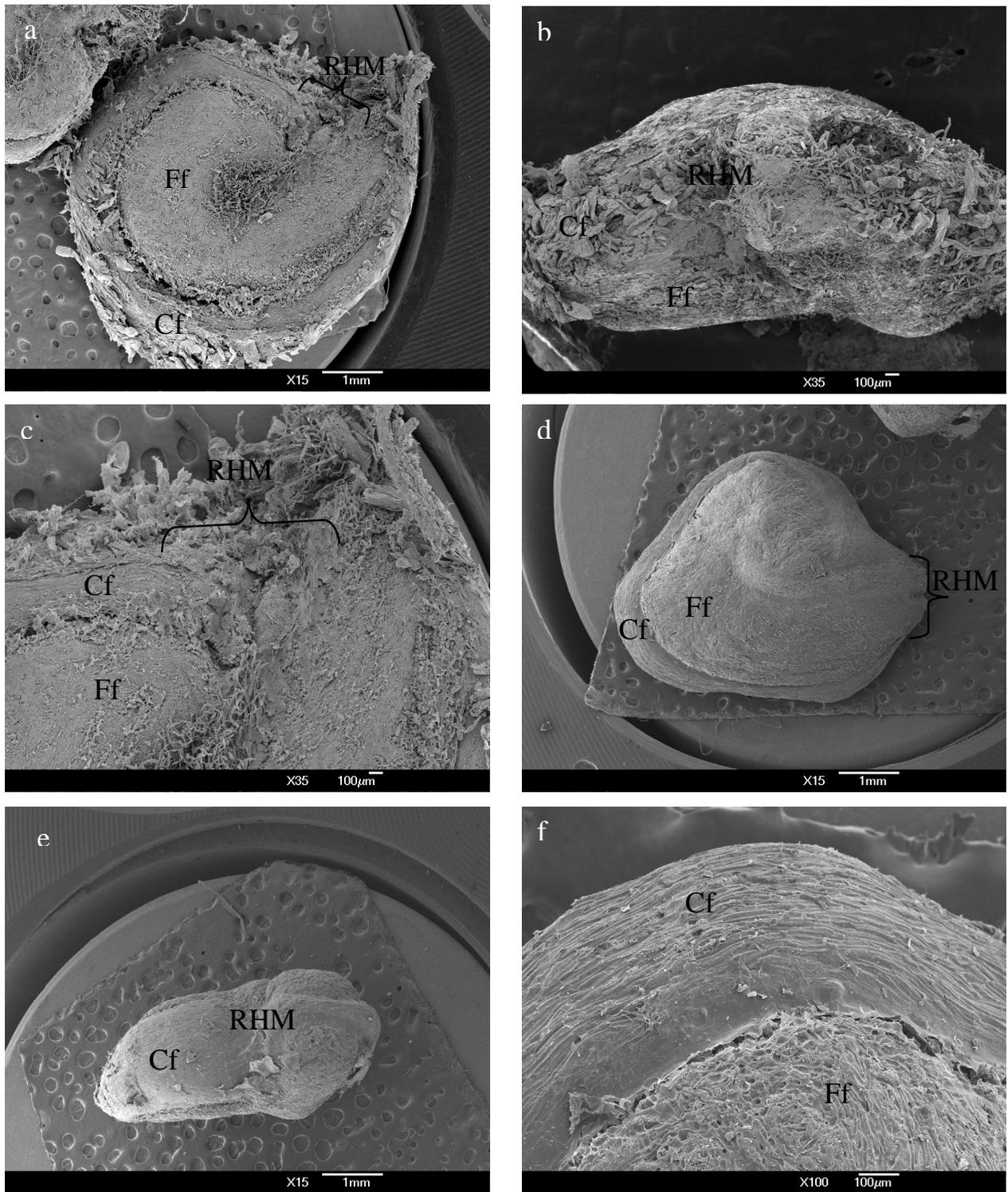


Fig. 8. Semillas de *Opuntia tomentosa* (2006) tomadas directamente del fruto (a, b y c) Semillas de *Opuntia tomentosa* (2006) lavadas y almacenadas durante 6 meses en el laboratorio (d, e y f). a) Vista lateral; b) Vista frontal de la región hilo-micrópilo; c) Acercamiento de la región hilo-micrópilo; d) Vista lateral; e) Vista frontal de la región hilo-micrópilo y f) Acercamiento a la cubierta funicular. (Ff) Flanco funicular, (Cf) Cubierta funicular, (RHM) Región hilo-micrópilo.

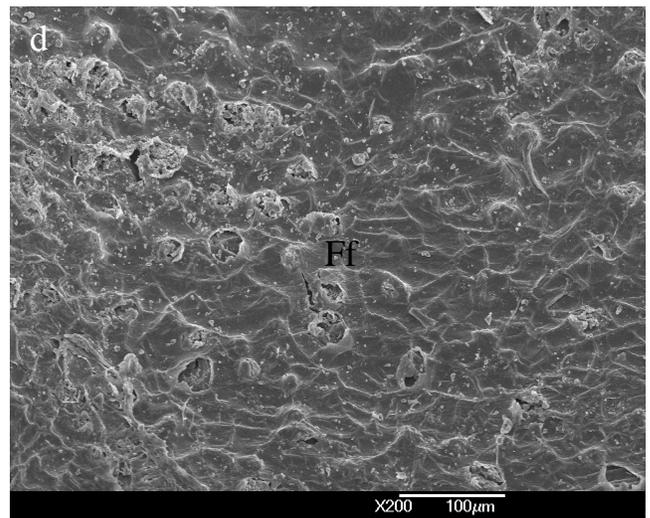
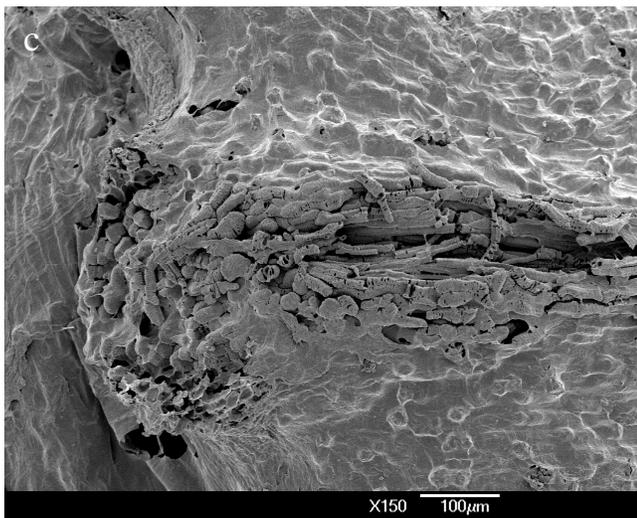
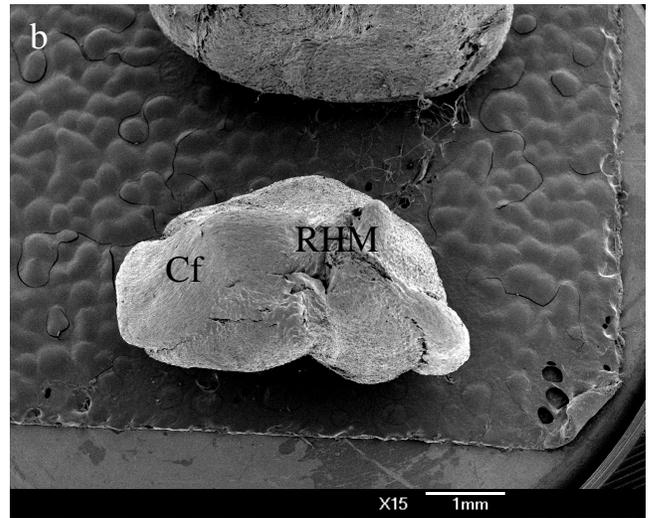
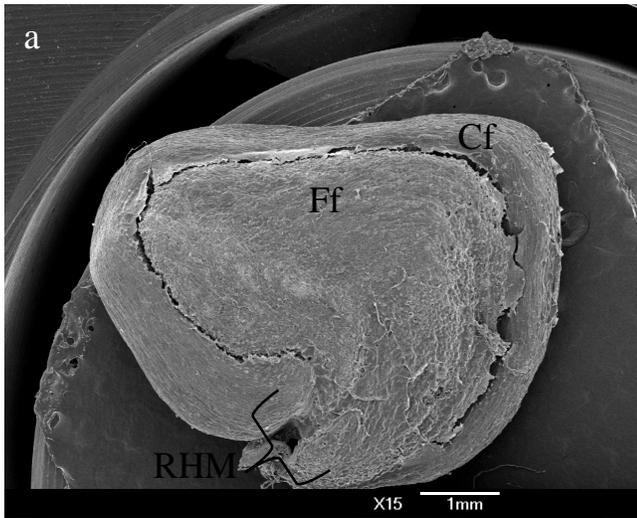


Fig. 9. Semillas control de *O. tomentosa* (2006) lavadas y secadas naturalmente y posteriormente almacenadas en condiciones de laboratorio durante 2 años. a) Vista lateral, b) Vista frontal de la región hilo-micrópilo y c y d) acercamiento al funículo. (Ff) Flanco funicular, (Cf) Cubierta funicular, (RHM) Región hilo-micrópilo.

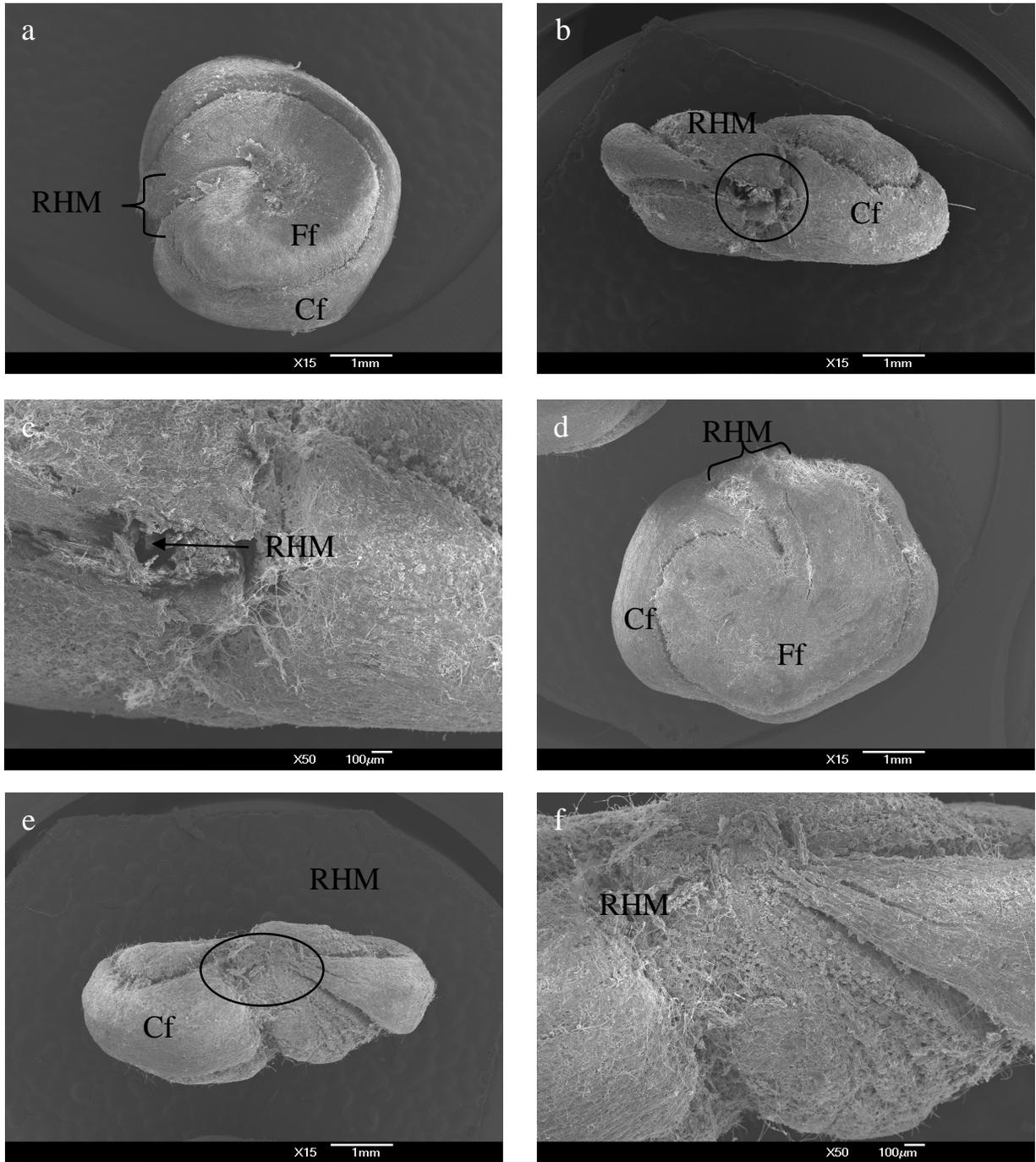


Fig. 10. Semillas de *O. tomentosa* enterradas durante 6 meses en un sitio expuesto (2009) (a,b,c) y en un sitio sombreado (2009) (d,e,f). a) Vista lateral; b) Vista frontal de la región hilo-micropilo; c) Acercamiento frontal de la región hilo-micropilo d) Vista lateral; e) Vista frontal de la región hilo-micropilo f) Acercamiento frontal a la región hilo-micropilo. (Ff) Flanco funicular, (Cf) Cubierta funicular, (RHM) Región hilo-micropilo.

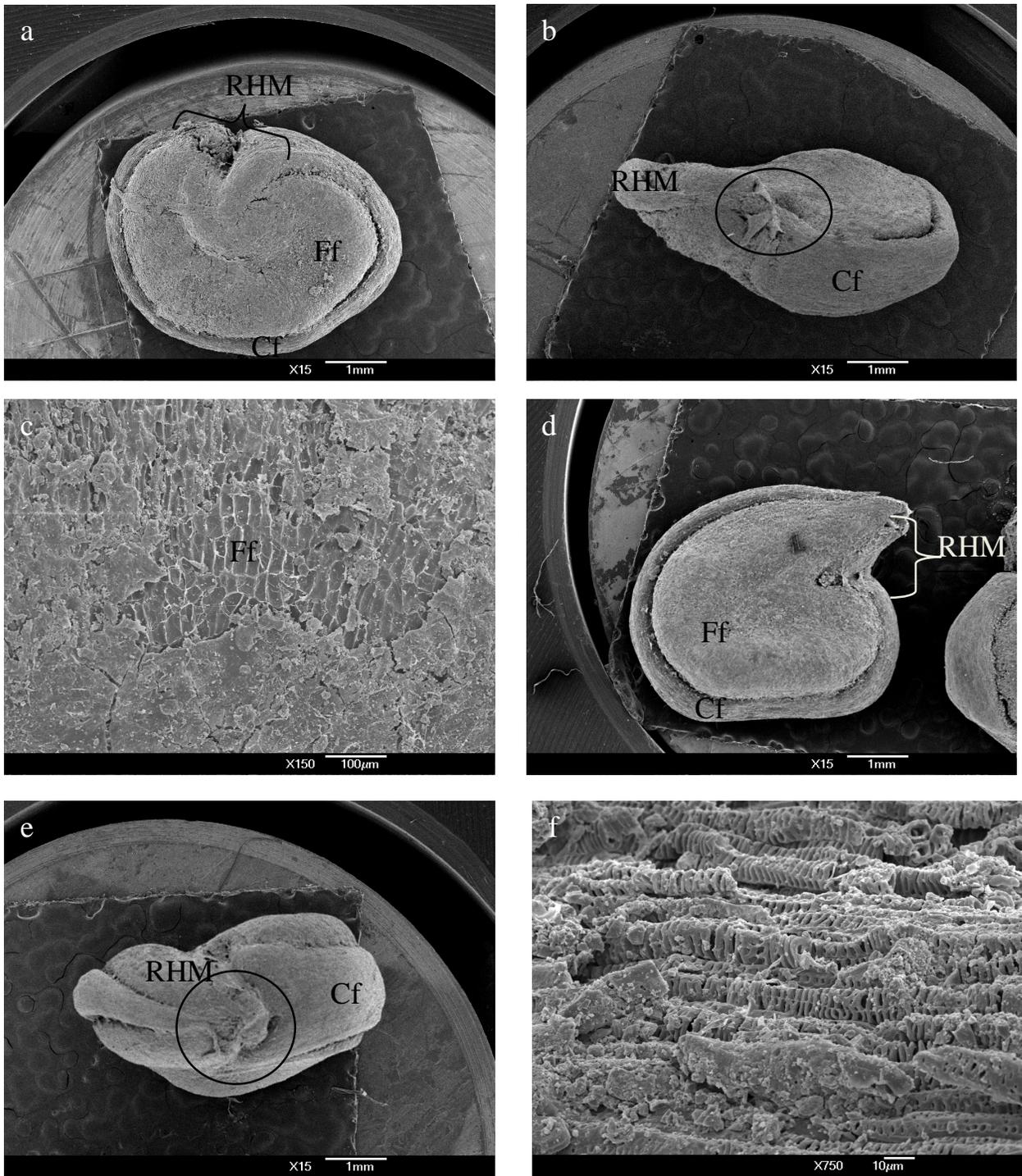


Fig. 11. Semillas de *O. tomentosa* (2006) enterradas en sitio expuesto (a, b, c) y en sitio sombreado (d, e y f) durante 5 meses y almacenadas durante 2 años en condiciones de laboratorio. a) Vista lateral; b) vista frontal de la región hilo-micrópilo; c) Acercamiento al flanco funicular; d) Vista lateral; e) Vista frontal de la región hilo-micrópilo; f) Acercamiento al flanco funicular, haces vasculares expuestos; (Ff) Flanco funicular; (Cf) Cinturón funicular, (RHM) Región hilo-micrópilo.

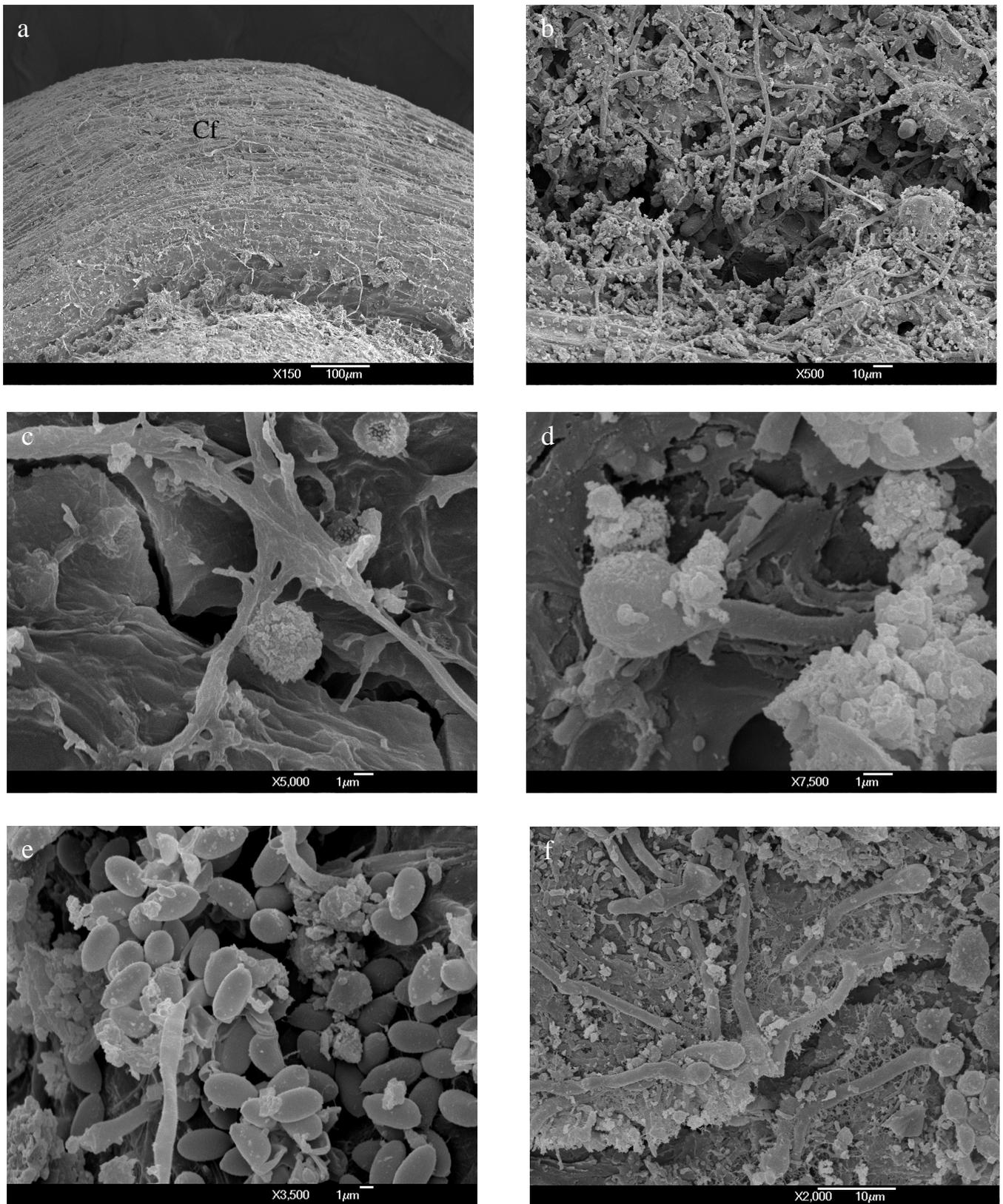


Fig. 12. Presencia de microorganismos en la superficie de las semillas enterradas durante 6 meses. a) Funículo con alta densidad de hifas; b) Acercamiento a la cubierta funicular c) Acercamiento a hifas y esporas d) Se muestra un conidióforo e) Esporas e hifas f) Conidióforos (Cf) Cubierta funicular.

DISCUSIÓN

Los bajos porcentajes de germinación observados en las semillas a las que no se les eliminó la valva sugieren que dos años de almacenamiento en el laboratorio no fueron suficientes para completar la maduración del embrión de las semillas de *O. tomentosa*. La alternancia de temperaturas no fue suficiente para remover la latencia en las semillas de *O. tomentosa* independientemente del sitio de enterramiento; esto concuerda con lo que encontraron Olvera-Carrillo *et al.* (2009 a), para esta misma especie, y es contrario a lo que ocurre con *Opuntia puberula* (Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet, 1998), en la cual la alternancia de temperaturas (20-25°C) sí tuvo un efecto positivo sobre la germinación en comparación con la temperatura constante (17°C). El efecto favorable de la alternancia de temperatura se ha encontrado en especies de otras familias como *Nicotiana longiflora* (Solanaceae) (10-20°C), *Oenothera indecora* (Onagraceae); la cual germinó en un amplio rango de temperaturas alternantes entre 10°C y 35°C, y *Paspalum guenoarum* (25-35°C) (Otegui, M *et. al.*, 2005; Faccini y Puricelli, 2006).

Para *Stylosanthes hamata*, una leguminosa que presenta una cubierta dura e impermeable al agua, Guenni *et al.* (1999) encontraron que las fluctuaciones de temperatura (25-63°C), así como una temperatura constante, pero alta (63°C), contribuyen al debilitamiento significativo de su cubierta seminal. Estas fluctuaciones ocurren de manera natural en el suelo por lo que pueden ser un indicador ambiental clave durante la época seca, para que ocurra el incremento de la germinación durante la temporada de lluvias. Sin embargo, en especies de

cactáceas (*Obregonia denegrii* y *Turbincarpus valdezianus*), Rojas-Aréchiga *et al.* (2008) encontraron que el porcentaje de germinación es mayor bajo temperatura constante. En el caso de *O. tomentosa*, la formación de la valva es determinante para que ocurra la germinación, lo que se observó en los resultados, ya que el efecto de la temperatura no fue significativo en las pruebas de germinación realizadas.

A pesar de que la alternancia de temperaturas no removi6 la latencia en las semillas control y no tuvo un efecto significativo en la germinaci6n de las semillas enterradas, s3 produjo una respuesta m3s homog3nea que en temperatura constante y redujo el tiempo de inicio de la germinaci6n en las semillas no enterradas. Los resultados obtenidos en las pruebas de germinaci6n de este lote de semillas pudieron haber variado con respecto a estudios anteriores para esta especie debido a que los factores a los que la planta madre est3 expuesta durante el desarrollo y maduraci6n de la semilla, tales como la temperatura, la luz, la humedad y la disponibilidad de nutrientes pueden variar de una temporada a otra. (Fenner, 2000); adem3s de las diferencias en los sitios de enterramiento, ya que en Olvera-Carrillo *et. al.* (2009a), se menciona que 3ste ocurri6 en un sitio cerrado, mientras que en el presente estudio, el enterramiento se realiz6 bajo la sombra de un 3rbol por lo que se consider6 como un sitio sombreado.

Las variaciones ambientales entre los sitios de enterramiento no produjeron cambios en los patrones de germinaci6n lo cual difiere con lo reportado por Olvera-Carrillo *et al.* (2009 b) quienes encontraron que las semillas exhumadas de

un sitio cerrado tuvieron una germinación significativamente mayor que las desenterradas de un sitio expuesto. En el presente estudio, el enterramiento en un ambiente cerrado, en combinación con temperatura alternante produjo una germinación más rápida; sin embargo, las diferencias en la tasa de germinación no fueron significativas lo cual pudo deberse a la heterogeneidad de la respuesta y puede sugerir la formación de un banco de semillas permanente, como lo sugiere Olvera-Carrillo *et. al.* (2009b) al observar que la germinación de una población de semillas de *O. tomentosa* ocurre en diferentes años.

Tanto en las semillas enterradas como en las no enterradas, la remoción de la valva tuvo un efecto positivo al aumentar el porcentaje de germinación y reducir el tiempo de inicio de la germinación (*lag time*). En las semillas que fueron enterradas, la remoción se llevó a cabo con facilidad, lo que confirma que durante su estancia en el suelo, la cubierta funicular se debilita y se forma la valva.

En las semillas sin valva, no enterradas, incubadas a temperatura constante el porcentaje de germinación fue mayor que en aquellas semillas no enterradas con valva y coincide con el dato obtenido por Olvera-Carrillo *et al.* (2003) para las semillas de esta misma especie sometidas a escarificación ácida durante 5 minutos. A pesar de que con la escarificación ácida o la remoción de la valva se pueden obtener porcentajes de germinación semejantes a aquellos obtenidos con el enterramiento, existe un efecto positivo de éste último sobre el establecimiento y vigor de las plántulas (observación personal).

Observaciones en el MEB

Hay pocos estudios que se enfoquen a los cambios causados por factores ambientales en la morfología de la semilla durante su estancia en el suelo, como la temperatura, la humedad y la interacción con microorganismos. Delgado-Sánchez *et al.* (2011) realizaron un estudio sobre el efecto de los hongos sobre la cubierta seminal en semillas de *Opuntia streptacantha* y encontraron diferencias entre las semillas almacenadas en el laboratorio y aquellas inoculadas con especies de hongos encontradas en su cubierta seminal, en éstas últimas observaron la erosión del funículo debido a la acción de los hongos. En otro estudio realizado con semillas de *Opuntia leucotricha* (Delgado-Sánchez *et al.*, 2010) obtuvieron resultados similares en relación con la capacidad germinativa, la cual fue mayor en semillas inoculadas (15 a 40% dependiendo la especie con la cual se inoculó la semilla) que en semillas desinfectadas (0%); sin embargo, dichos estudios fueron dirigidos específicamente al efecto de estos microorganismos sin tomar en cuenta otros factores ambientales tales como las fluctuaciones de luz, temperatura y humedad a las que están sometidas las semillas durante su estancia en el suelo y que también afectan tanto a la dureza de la cubierta seminal (Guenni *et al.*, 1999) como el estado de latencia del embrión. En el caso de las semillas de *Opuntia tomentosa*, Olvera-Carrillo *et al.* (2009a) señalan que, en las semillas que fueron enterradas, la germinación mejoró después de dos meses de almacenamiento, probablemente porque se eliminó la latencia fisiológica y las cubiertas funiculares terminaron de debilitarse durante el almacenamiento.

Las semillas almacenadas en el laboratorio y observadas al MEB, después de dos años presentaron fracturas más marcadas que aquellas que fueron enterradas durante 6 meses, desenterradas y almacenadas durante un año y medio; sin embargo, al realizar las pruebas de germinación su respuesta germinativa no fue mejor. Los cambios ocurridos durante el almacenamiento en el laboratorio, en la cubierta funicular de la semilla fueron también reportados por Olvera-Carrillo *et al.* (2009a) para las semillas exhumadas y almacenadas; sin embargo, en su estudio, las semillas que no recibieron ningún tratamiento y fueron almacenadas durante 8 meses permanecieron con su cubierta funicular intacta, lo que podría deberse a un menor tiempo de almacenamiento.

Por otro lado, en las semillas que fueron enterradas se observaron cambios en la región hilo-micropilar y fracturas en la cubierta funicular. La separación observada en la región hilo-micropilar puede deberse a las fluctuaciones de humedad y temperatura a las que estuvieron sometidas las semillas durante el enterramiento; ya que ambos factores tienen una intervención importante en la ruptura de las cubiertas seminales duras (Orozco-Segovia *et al.*, 2007), así como a la acción de microorganismos presentes en el suelo durante el enterramiento que actúan erosionando el funículo como ya lo señalaron Olvera-Carrillo *et al.* (2009a) para semillas de *O. tomentosa* y Delgado-Sánchez *et al.* (2011) para semillas de *Opuntia streptacantha*. La marcada degradación de la cubierta funicular que se observó en las semillas de *O. tomentosa* que fueron enterradas, no se encontró en las semillas que fueron almacenadas en el laboratorio. En las semillas enterradas, después de un año y medio de almacenamiento en el laboratorio, se

encontró la separación en la región hilo-micrópilo de una manera más pronunciada, lo que sugiere que dichos cambios continúan en condiciones de laboratorio como ya lo reportaron Olvera-Carrillo *et al.* (2009a).

En las fotomicrofotografías se hizo evidente que, en las semillas que fueron enterradas, la cubierta funicular se erosionó debido a la actividad de los microorganismos. La tinción de azul de algodón permitió confirmar la presencia de hongos sobre el funículo de las semillas enterradas. Se ha propuesto que el papel de los microorganismos del suelo en la germinación es favorable (Pfeiffer, 1934; Morphet y Hall, 2000). Delgado-Sánchez *et al.*, (2011) observaron que las semillas que fueron inoculadas con los hongos de la cubierta funicular (*Penicillium chrysogenum*, *Phoma* sp., *Trichoderma harzianum* y *T. koningii*) germinaron en un 67%, mientras que las semillas esterilizadas no germinaron, lo que sugiere que los hongos están involucrados en el rompimiento de la latencia de *O. streptacantha*. Sin embargo, las semillas de *O. tomentosa*, además del debilitamiento de la cubierta seminal en el suelo, requieren de un tiempo de postmaduración, la pérdida de la latencia y la formación de la valva (Olvera-Carrillo *et al.*, 2009b). .

CONCLUSIONES

Las semillas de *Opuntia tomentosa* presentan una latencia compleja, que les permite realizar una germinación exitosa en el ambiente heterogéneo y estresante del Pedregal de San Ángel, caracterizado por una estacionalidad climática, que se expresa con marcadas alternancias de temperatura durante la época seca, aunadas a la carencia del agua suficiente para la sobrevivencia y el establecimiento de las plántulas resultantes, así como una variedad amplia variedad de microambientes que se forman en el sustrato volcánico. Por lo anterior, las semillas de *O. tomentosa* requieren de un conjunto de características morfológicas y funcionales que evite su germinación ante cualquier evento esporádico de lluvia.

En este estudio, a diferencia de la temperatura, el enterramiento tuvo un efecto positivo sobre el porcentaje de germinación de las semillas de *O. tomentosa*; por el contrario, el sitio de enterramiento (sitio expuesto y sitio sombreado) no provocó una diferencia significativa en la germinación. La remoción de la valva fue determinante para aumentar de manera significativa el porcentaje de germinación en todos los tratamientos; y, en las semillas control, disminuir el tiempo de inicio de la germinación.

Se observó la presencia de hongos en la cubierta funicular de las semillas que fueron enterradas así como fracturas tanto en los flancos funiculares como en la región hilo-micrópilo. La fácil remoción de la valva en las semillas enterradas sugiere que el enterramiento aceleró la formación de esta estructura descrita por

Orozco-Segovia *et al.* (2007); por el contrario, las semillas que permanecieron en el laboratorio, a pesar de presentar fracturas en la cubierta funicular, ésta no se encontró debilitada al tratar de remover la valva y continuaron sin germinar.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación se realizó con el apoyo económico y como parte del proyecto de CONACYT 47859-Q: Mecanismos fisiológicos inducidos por el priming (acondicionamiento) natural relacionados con la tolerancia en algunas especies de plantas de diferentes ambientes.

A la Facultad de Ciencias y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la M. en C. María Esther Sánchez Coronado gracias por su eterna paciencia, ayuda y dedicación como directora de esta tesis.

A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán gracias por ayudarnos a dar forma a este trabajo, por sus comentarios y sobre todo su buena disposición siempre.

A la Dra. Alma Orozco Segovia gracias por las correcciones hechas al manuscrito así como su disposición desde el inicio de este proyecto.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías gracias por todo el tiempo que brindó en las sesiones en Microcopía Electrónica, por su paciencia y disciplina en el trabajo. Además por todos los consejos y confianza brindada en los buenos y malos días.

A la M. en C. Irene Pisanty Baruch gracias por la corrección y comentarios hechos al manuscrito.

Así mismo, agradezco a la pasante de Bióloga Sandra Janneth Aguilar Garzón y al Biólogo Sergio Nicasio Arzeta por su valiosa ayuda en la colecta y procesamiento del material biológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Archibald, E.E.A. 1939. *The development of the ovule and seed of jointed cactus (Opuntia aurantiaca Lindley)*. South African Journal of Science. Vol. 36, pp. 195–211.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M. 1998. *Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. 1a ed. Academic Press. San Diego, CA.
- Baskin, J.M., Baskin, C.C. 2000. *Evolutionary considerations of claims for physical dormancybreak by microbial action and abrasion by soil particles*. Seed science research. Vol. 10, pp. 409-413.
- Beltrán, P.M., Aguirre, R.J.. 1981. *Aspectos de la germinación de nopales (Opuntia spp.) silvestres y cultivados*. En: Avances en la Enseñanza e Investigación. Colegio de Postgraduados, Chapingo. pp. 28–29.
- Benech-Arnold, R.L., Kristof, G., Steinbach, H.S., Sánchez, R.A., 1995. *Fluctuating temperatures have different effects on embryonic sensitivity to ABA in Sorghum varieties with contrasting pre-harvest sprouting susceptibility*. Journal of Experimental Botany. Vol.46, pp. 711-717.
- Bravo-Hollis, H. 1978. *Las Cactáceas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F., 743 pp.
- Bewley, J.D., Black, M. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*. Plenum. New York.

- Cano-Santana, Z. y Meave J.A. 1996. *Sucesión primaria en derrames volcánicos: el caso del Xitle*. Ciencias. Vol. 41, pp.58-68.
- Castillo-Agüero, S., Montes-Cartas, G., Romero-Romero, M.A., Martínez-Orea, Y., Guadarrama-Chávez, P., Sánchez-Gallén, I., Núñez-Castillo O. 2004. *Dinámica y conservación de la flora del matorral xerófilo de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (D.F., México)*. Boletín de la Sociedad Botánica de México. Vol. 74, pp51-75.
- Castillo- Agüero, S., Martínez-Orea, Y., Romero-Romero, M.A., Guadarrama Chávez, P., Nuñez-Castillo, O., Sánchez-Guillén, S. y Meave, J.A. 2007. *La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: Aspectos florísticos y ecológicos*. UNAM. 294 pp.
- Crist, T.O. y Friese, C.F. 1993. *The impact of fungi on soil seeds: implications for plants and granivores in a semiaridshrub-steppe*. Ecology. Vol.74(8), pp2231-2239.
- Delgado-Sánchez, P., Ortega-Amaro, M.A., Jiménez-Bremont, J.F., Flores, J. 2011. *Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in Opuntia streptacantha (Cactaceae)*. Plant Biology. Vol. 13, pp 154-159.
- Dubrovsky, J. 1996. *Seed hydration in sonoran desert cacti and its ecological implication*. American Journal of Botany. Vol. 83(5), pp. 624-632.
- Faccini, D., Puricelli, E. 2006. *Efecto de la temperatura y de la luz sobre la germinación de Nicotiana longiflora Cavaniles y Oenothera indecora Camb. Agriscientia*. Vol. 21(1), pp. 15-21.

Fenner, M. 2000. Seeds. *The ecology of regeneration in plant communities*. 2a edición. CABI Publishing. New York.

Fenner, M., Thompson, K. 2005. *The ecology of seeds*. Cambridge. 250p.

Flores-Rentería, LL. 2002. *Estudio morfológico de Opuntia tomentosa Salm-Dyck var. Tomentosa Salm-Dyck (Cactaceae)*. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 79pp.

Gamboa-deBuen, A., Cruz-Ortega, R., Martínez-Barajas, E., Sánchez-Coronado, M.E. y Orozco-Segovia, A. 2006. *Natural priming as an important metabolic event in the life history of Wigandia urens (Hydrophyllaceae) seeds*. *Physiologia plantarum*. Vol. 128, pp. 520-530.

Garret, S.D. 1951. *Ecological groups of soil fungi: a survey of substrate relationships*. *New Phytology*. Vol. 50 (2), pp. 149-166.

Godínez-Álvarez, H., Valiente-Banuet, A. 1998. *Germination and early seedling growth of Tehuacan Valley cacti species: the role of soils and seed ingestion by dispersers on seedling growth*. *Journal of Arid Enviroments*. Vol. 62, pp. 15-21.

González- Zertuche, L., Orozco-Segovia, A., Vázquez-Yanes, C. 2000. *El ambiente de la semilla en el suelo: su efecto en la germinación y en la sobrevivencia de la plántula*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. Vol. 65, pp. 73-81.

González-Zertuche, L., Vázquez-Yanes, C., Gamboa, A., Sánchez-Coronado, M.E., Aguilera, P y Orozco-Segovia, A. 2001. Natural priming of *Wigandia urens* seeds

during burial: effects on germination, growth and protein expression. *Seed Science Research*. Vol. 11, pp. 27-34

Guenni, O., Don, F.C., Les, A.E., Calvin, R. 1999. *Efecto de la temperatura sobre la disminución de la dureza seminal en Stylosanthes hamata (Leguminosae)*. *Ecotrópicos*. Vol. 12(2),pp. 69-82.

Heydecker, W., Higgins, J., Gulliver, R.L. 1973. *Accelerated germination by osmotic seed treatment*. *Nature (London)* 246: 42-44.

Kigel, J., Galili, G. 1995. *Seed development and germination*. Marcel Dekker, Inc. New York.

López, L., Márquez-Guzmán, J. y G. Murguía. 1998. *Técnicas para el estudio del desarrollo en Angiospermas*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Mandujano, M.C., Golubov, J., Montaña, C., 1997. *Dormancy and endozoochorous dispersal of Opuntia rastrera in the southern Chihuahuan Desert*. *Journal of Arid Environment*. Vol. 36, pp. 259–266.

Mandujano, M.C., Montaña, C., Rojas-Aréchiga, M. 2005. *Breaking seed dormancy in Opuntia rastrera from the Chihuahuan desert*. *Journal of Arid Environments*. –Vol. 62,pp. 15-21.

- Mier, T., Toriello, C., Ulloa, M. 2002. *Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio*. Universidad Autónoma Metropolitana, Instituto de Biología, UNAM.
- Mohamed-Yaseen, Y., Barringer, S.A., Splittstoesser, W.E., Costanza, S. 1994. *The role of seed coats in seed viability*. The Botanical Review. Vol. 60 (4),pp. 426-439.
- Moreno, E. 1988. *Manual para la identificación de hongos microscópicos*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Morphet, D.R. y Hall, A.M. 2000. *Microbial enhancement of seed germination in Rosa corymbifera "Laxa"*. Seed science research. Vol. 10, pp. 489-494.
- Olvera-Carrillo, Y., Márquez-Guzmán, J., Barradas, V.L., Sánchez-Coronado, M.E., y Orozco-Segovia, A. 2003. *Germination of the hard seed coated Opuntia tomentosa S.D., a cacti from the México valley*. Journal of Arid Enviroments. Vol. 55, pp. 29-42.
- a Olvera-Carrillo, Y., Márquez-Guzmán, J., Sánchez-Coronado, M.E., Barradas, V.L., Rincón, E., Orozco-Segovia, A., 2009. *Effect of burial on the germination of Opuntia tomentosa's (Cactaceae, Opuntioideae) seeds*. Journal of Arid Enviroments. Vol. 73, pp. 421-427.
- b Olvera-Carrillo, Y., Méndez, I., Sánchez-Coronado, M.E., Márquez-Guzmán, J., Barradas, V.L., Huante, P., Orozco-Segovia, A. 2009. *Effect of enviromental heterogeneity on field germination of Opuntia tomentosa (Cactaceae, Opuntioideae) seeds*. Journal of Arid Enviroments. Vol. 73, pp. 414-420.

- Orozco-Segovia, A., Márquez-Guzmán, J., Sánchez-Coronado, M.E., Gamboa deBuen, A., 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. Vol. 99, pp. 581-592.
- Orozco-Segovia, A., Sánchez-Coronado, M.E. 2009. *Functional Diversity in seeds and its implications for ecosystem functionality and restoration ecology*. Functional Diversity of Plant Reproduction. Pp. 175-216.
- Otegui, M.B., Pérez, M.A., deSouza, M. 2005. *Efecto de la temperatura y la luz en la germinación de semillas de Papalum guenoarum*. Revista Brasileira de Sementes. Vol. 27(1),pp. 190-194.
- Pfeiffer, N.E. 1934. *Morphology of the seed of Symphoricarpos racemosus and the relation of fungal invasion of the coat to germination capacity*. Contributions from Boyce Thompson Institute. Vol. 6(1), pp. 103-122.
- Pressman, E., Negbi, M., Sachs, M., Jacobsen, J.V. 1977. *Varietal differences in light requirements for germination of Celery (Apium graveolens L.) seeds and the effects of thermal and solute stress*. Australian Journal of Plant Physiology. Vol. 4, pp. 821-31.
- Reyes- Agüero, J.A., Aguirre, J.R., Valiente-Banuet, A. 2006. *Reproductive biology of Opuntia: A review*. Journal of Arid Environments. Vol. 64, pp. 549-585.

- Rojas-Arechiga, M., Orozco-Segovia, A., Vázquez-Yanes, C. 1997. *Effect of light on germination of seven species of cacti of zapotitlan Valley in Puebla, México. Journal of Arid Environments*. Vol. 36, pp.571-578.
- Rojas-Aréchiga, M y Vázquez-Yanes, C. 2000. *Cactus seed germination: a review. Journal of Arid Environments*. Vol, 44, pp. 85-104.
- Rojas-Aréchiga, M., Gulubov, J., Romero, O., Mandujano, M.C. 2008. *Efecto de la luz y la temperatura en la germinación de dos especies de cactáceas en CITES I. Cactáceas y suculentas mexicanas*. Vol. 53 (2), pp. 51-57.
- Rosas-López, U. y Collazo-Ortega M. 2004. *Conditions for the germination and the early growth of seedlings of Polaskia chichipe (Goss.) Backeberg and Echinocactus platyacanthus Link and Otto fa. grandis (Rose) Bravo-Hollis (Cactaceae)*. *Phyton. International Journal of Experimental Botany*. Pp. 213-220.
- Rzedowski, J. (1994). *Vegetación del Pedregal de San Ángel*. En: Rojo, A. (Ed.), *Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Ecología, Historia Natural y Manejo*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Sánchez, J.A., Calvo, E., Orta, R., Muñoz, B. 1997. *Tratamiento pregerminativos de hidratación – deshidratación para semillas de pepino (Cucumis sativus)*. *Acta Botánica Mexicana*. Vol. 38, pp. 13-20.
- Sánchez, J.A., Orta, R. y Muñoz, B.C. 2001. *Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola*. *Agronomía Costarricense*. Vol. 25(1), pp. 67-92.

- Schafer, M. y Kotanen, P. 2003. *The influence of soil moisture on losses of buried seeds to fungi*. Acta Ecológica. Vol. 24, pp. 255-263.
- Scheinvar, L. (1982). *La familia de las Cactáceas en el Valle de México*. Tesis doctoral. Facultad de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Vázquez-Yanes, C., Orozco-Segovia, A., Rojas, M., Sánchez-Coronado, M.E., Cervantes, V. 1997. *La reproducción de las plantas: semillas y meristemos*. Fondo de Cultura Económica. México.
- Werker, E. 1997. *Seed Anatomy*. Encyclopedia of Plant Anatomy. Gebruder Borntraeger, Berlin.
- Zhiyuan, Ch., Bradford, K.J. 1999. *Hydrothermal time analysis of tomato seed germination responses to priming treatments*. Journal of experimental Biology. Vol. 50 (330), pp. 89-99.