



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

**LATENCIA FÍSICA, MORFOANATOMÍA Y COMPOSICIÓN DE LA
SEMILLA DE *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb**

TESIS:

**Que como requisito parcial
para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

Presenta:

SONIA HERNÁNDEZ EPIGMENIO

Bajo la supervisión de: DR. DANTE ARTURO RODRÍGUEZ TREJO



Chapingo, Estado de México, junio 2021



APROBADA



LATENCIA FÍSICA, MORFOANATOMÍA Y COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA
DE *Enterolobium cyclocarpum* (JACQ.) GRISEB

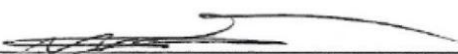
Tesis realizada por **SONIA HERNÁNDEZ EPIGMENIO** bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR:


DR. DANTE ARTURO RODRÍGUEZ TREJO

ASESOR:


DR. DIODORO GRANADOS SÁNCHEZ

ASESOR:


DR. JOSÉ ARTEMIO CADENA MENESES

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
DEDICATORIA.....	XI
AGRADECIMIENTOS	XII
DATOS BIOGRÁFICOS	XIII
RESUMEN GENERAL	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	16
1.2 Antecedentes	17
1.3 Planteamiento del problema	19
1.4 Objetivos	20
1.4.1 General	20
1.4.2 Particulares	20
1.5 Hipótesis.....	20
1.6 Literatura citada	21
2. CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA	22
2.1 Taxonomía de especies.....	22
2.2 Semilla.....	24
2.2.1 Semilla ortodoxa.....	25
2.2.2 Semilla recalcitrante.....	25
2.3 Partes de la semilla.....	25
2.4 Testa	27
2.5 Latencia	29
2.6 Escarificación	30
2.7 Estructura de la cubierta seminal	31
2.8 Literatura citada	32
3. CAPÍTULO 3: CAPAS ESTRUCTURALES DE LA TESTA EN 15 ESPECIES CON LATENCIA FISICA (FABACEAE Y SAPINDACEAE)	34

3.1	Introducción	34
3.2	Materiales y métodos	36
3.2.1	Anatomía microscópica de semillas	36
3.2.2	Adquisición y obtención de muestras.....	37
3.2.3	Fijación de muestra.....	39
3.2.4	Recubrimiento	40
3.2.5	Observación	42
3.2.6	Análisis proximal de <i>Enterolobium cyclocarpum</i>	44
3.3	Experimento de germinación de <i>Enterolobium cyclocarpum</i>	45
3.3.1	Preparación de cajas de germinación.....	45
3.3.2	Métodos de escarificación	47
3.3.3	Germinación	51
3.3.4	Diseño experimental	51
3.3.5	Análisis estadístico.....	52
3.4	Resultados	53
3.4.1	Partes de la semilla de <i>Enterolobium cyclocarpum</i>	53
3.5	Análisis de imágenes de microscopia.....	54
3.5.1	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq.) Griseb, (2016).....	54
3.5.2	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq.) Griseb, (1984).....	58
3.5.3	<i>Ebenopsis ebano</i> (Berl.) Britton y Rose.....	62
3.5.4	<i>Prosopis glandulosa</i> Torr.	65
3.5.5	<i>Prosopis laevigata</i> (Humb. y Bonpl. ex Willd.) M.C.Johnst.	69
3.5.6	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.....	72
3.4.7	<i>Vachellia farnesiana</i> (L.) Willd. y Arn.	75
3.4.8	<i>Vachellia schaffneri</i> (S. Watson) Seigler y Ebinger.	78
3.4.9	<i>Vachellia pennatula</i> (Schltdl. y Cham.) Benth.	81
3.4.10	<i>Erythrina coralloides</i> DC. 1825	84
3.4.11	<i>Mucuna</i> sp.....	87
3.4.12	<i>Lupinus montanus</i> Kunth.	89
3.4.13	<i>Lupinus</i> sp.	92

3.4.14	<i>Delonix regia</i> (Bojer ex Hook.) Raf.	94
3.4.15	<i>Sapindus</i> sp.	98
3.5	Comparación de capas celulares entre especies	100
3.6	Análisis proximal de <i>Enterolobium cyclocarpum</i>	102
3.6.1	Lignina	103
3.7	Germinación de <i>Enterolobium cyclocarpum</i>	103
3.7.1	Capacidad germinativa	103
3.7.2	Energía germinativa	105
3.8	Discusión	106
3.9	Conclusiones	110
3.10	Recomendaciones	111
3.11	Literatura citada	111
4.	CAPITULO 4. ARTÍCULO CIENTÍFICO	113
	Latencia física, morfoanatomía y análisis proximal de la semilla de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq.) Griseb	113

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de la tribu Ingeae.	22
Cuadro 2. Taxonomía de tribu Mimoseae.	22
Cuadro 3. Taxonomía de tribu Acacieae.	23
Cuadro 4. Taxonomía de tribu Phaseoleae.	23
Cuadro 5. Taxonomía de tribu Genisteae.	23
Cuadro 6. Taxonomía de tribu Caesalpinieae.	24
Cuadro 7. Taxonomía de genero Sapindus.	24
Cuadro 8. Partes que conforman la semilla.	28
Cuadro 9. Especies observadas en el laboratorio.	37
Cuadro 10. Modo de adquisición de la muestra.	38
Cuadro 11. Tratamientos de escarificación para <i>Enterolobium cyclocarpum</i> ...	47
Cuadro 12. Diseño experimental de bloques completamente al azar.	52
Cuadro 13. Tejidos vegetales presentes en la testa de las especies analizadas.	101
Cuadro 14. Análisis proximal de cotiledones y testa de <i>E. cyclocarpum</i>	102
Cuadro 15. Análisis de varianza de germinación acumulada de <i>E. cyclocarpum</i>	104
Cuadro 16. Comparación de medias (Prueba Tukey) de la capacidad germinativa.	105
Cuadro 17. Análisis de varianza de energía germinativa de <i>E. cyclocarpum</i>	105
Cuadro 18. Comparación de medias (Tukey) de energía germinativa de <i>Enterolobium cyclocarpum</i>	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de una semilla de gramínea (A) y leguminosa (B). A: tejido aleuronar; C: coleóptilo; Cu: cubierta seminal; Em: embrión; En: endospermo; P: plúmula; R: radícula; S: escutelo. Fuente: (Matilla, 2013).....	26
Figura 2. Partes de la cubierta seminal de <i>Lupinus montanus</i> Kunth; Cutícula (Cu), macroesclerénquima en empalizada (Ma), osteoesclerénquima (Os), parénquima compacto (Pa), cavidad seminal (Ca), embrión (Fuente: (Hernández-Epímenio, 2018)).....	28
Figura 3. Muestras de testa para observación en MEB.	38
Figura 4. Stubs sucios (izquierda) y limpios(derecha) para fijar la muestra.	39
Figura 5. Fijación de muestras en los stubs.....	40
Figura 6. Colocación de muestras en el Sputter.	40
Figura 7. Sputter realizando recubrimiento en muestras.....	41
Figura 8. Muestras recubiertas con oro-paladio.	41
Figura 9. Preparación y colocación de platina en el MEB.	42
Figura 10. MEB y equipo para observación.	43
Figura 11. Técnico de MEB realizando la observación.	43
Figura 12. Imágenes observadas en MEB.	44
Figura 13. Semilla de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> destinada a el análisis proximal.	45
Figura 14. Muestras de semilla requeridas para análisis proximal cotiledones (izquierda) y testa (derecha).	45
Figura 15. Caja germinadora con tapa hermética.	46
Figura 16. Caja germinadora preparada.	46
Figura 17. Semilla lijada.	48
Figura 18. Semilla de tratamientos 3-7 desinfectada.	49
Figura 19. Preparación del hidróxido de sodio (NaOH).....	50
Figura 20. Semillas reposando en hidróxido de sodio (NaOH).	50
Figura 21. Bloque con tratamientos distribuidos al azar.....	51
Figura 22. Partes de la semilla de <i>Enterolobiun cyclocarpum</i>	53
Figura 23. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> . .	54
Figura 24. Cutícula de testa de <i>E. cyclocarpum</i>	55
Figura 25. Macroesclereidas de testa de <i>E. cyclocarpum</i>	55
Figura 26. Osteoesclereidas de testa de <i>E. cyclocarpum</i>	56
Figura 27. Parénquima esponjoso de testa de <i>E. cyclocarpum</i>	56
Figura 28. Parénquima en empalizada de testa de <i>E. cyclocarpum</i>	57
Figura 29. Parénquima en empalizada compacta de testa de <i>E. cyclocarpum</i> .57	

Figura 30. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (1983).	58
Figura 31. Cubierta seminal de <i>E. cyclocarpum</i> (1983).	58
Figura 32. Macroesclereidas de testa de <i>E. cyclocarpum</i> (1983).....	59
Figura 33. Osteoesclereidas de testa de <i>E. cyclocarpum</i> (1983).....	59
Figura 34. Parénquima esponjoso de testa de <i>E. cyclocarpum</i> (1983).....	60
Figura 35. Parénquima reservante de testa de <i>E. cyclocarpum</i> (1983).	60
Figura 36. Osteoesclereidas de testa de <i>E. cyclocarpum</i> (1983).....	61
Figura 37. Parénquima compacto de testa de <i>E. cyclocarpum</i> (1983).....	61
Figura 38. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Ebenopsis ebano</i>	62
Figura 39. Cutícula de la testa de <i>E. ebano</i>	62
Figura 40. Macroesclereidas de la testa de <i>E. ebano</i>	63
Figura 41. Osteoesclereidas de la testa de <i>E. ebano</i>	63
Figura 42. Parénquima esponjoso de la testa de <i>E. ebano</i>	64
Figura 43. Parénquima en empalizada de la testa de <i>E. ebano</i>	64
Figura 44. Parénquima en empalizada compacta de la testa de <i>E. ebano</i>	65
Figura 45. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Prosopis glandulosa</i>	65
Figura 46. Cutícula de la testa de <i>P. glandulosa</i>	66
Figura 47. Macroesclereidas de la testa de <i>P. glandulosa</i>	66
Figura 48. Osteoesclereidas de la testa de <i>P. glandulosa</i>	67
Figura 49. Parénquima esponjoso de la testa de <i>P. glandulosa</i>	67
Figura 50. Osteoesclereidas de la testa de <i>P. glandulosa</i>	68
Figura 51. Parénquima reservante de la testa de <i>P. glandulosa</i>	68
Figura 52. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Prosopis laevigata</i>	69
Figura 53. Cutícula de la testa de <i>P. laevigata</i>	69
Figura 54. Macroesclereidas de la testa de <i>P. laevigata</i>	70
Figura 55. Osteoesclereidas de la testa de <i>P. laevigata</i>	70
Figura 56. Parénquima esponjoso de la testa de <i>P. laevigata</i>	71
Figura 57. Osteoesclereidas de la testa de <i>P. laevigata</i>	71
Figura 58. Parénquima reservante de la testa de <i>P. laevigata</i>	72
Figura 59. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	72
Figura 60. Cutícula de la testa de <i>M. caesalpiniiifolia</i>	73
Figura 61. Macroesclereidas de la testa de <i>M. caesalpiniiifolia</i>	73
Figura 62. Osteoesclereidas de la testa de <i>M. caesalpiniiifolia</i>	74
Figura 63. Parénquima reservante de la testa de <i>M. caesalpiniiifolia</i>	74
Figura 64. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Vachellia farnesiana</i>	75
Figura 65. Cutícula de la testa de <i>V. farnesiana</i>	75
Figura 66. Macroesclereidas de la testa de <i>V. farnesiana</i>	76

Figura 67. Parénquima esponjoso de la testa de <i>V. farnesiana</i>	76
Figura 68. Parénquima en empalizada de la testa de <i>V. farnesiana</i>	77
Figura 69. Parénquima compacto de la testa de <i>V. farnesiana</i>	77
Figura 70. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Vachellia schaffneri</i>	78
Figura 71. Cutícula de la testa de <i>V. schaffneri</i>	78
Figura 72. Macroesclereidas de la testa de <i>V. schaffneri</i>	79
Figura 73. Parénquima esponjoso de la testa de <i>V. schaffneri</i>	79
Figura 74. Parénquima en empalizada de la testa de <i>V. schaffneri</i>	80
Figura 75. Parénquima compacto de la testa de <i>V. schaffneri</i>	80
Figura 76. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Vachellia pennatula</i>	81
Figura 77. Cutícula de la testa de <i>V. pennatula</i>	82
Figura 78. Macroesclereidas de la testa de <i>V. pennatula</i>	82
Figura 79. Parénquima esponjoso de la testa de <i>V. pennatula</i>	83
Figura 80. Parénquima en empalizada de la testa de <i>V. pennatula</i>	83
Figura 81. Parénquima compacto de la testa de <i>V. pennatula</i>	84
Figura 82. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Erythrina coralloides</i>	84
Figura 83. Cutícula de la testa de <i>E. coralloides</i>	85
Figura 84. Macroesclereidas de la testa de <i>E. coralloides</i>	85
Figura 85. Parénquima esponjoso de la testa de <i>E. coralloides</i>	86
Figura 86. Parénquima compacto de la testa de <i>E. coralloides</i>	86
Figura 87. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Mucuna</i> sp.....	87
Figura 88. Cutícula de la testa de <i>Mucuna</i> sp.....	87
Figura 89. Macroesclereidas de la testa de <i>Mucuna</i> sp.....	88
Figura 90. Osteoesclereidas de la testa de <i>Mucuna</i> sp.....	88
Figura 91. Parénquima reservante de la testa de <i>Mucuna</i> sp.....	89
Figura 92. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Lupinus montanus</i>	89
Figura 93. Cutícula de la testa de <i>L. montanus</i>	90
Figura 94. Macroesclereidas de la testa de <i>L. montanus</i>	90
Figura 95. Osteoesclereidas de la testa de <i>L. montanus</i>	91
Figura 96. Parénquima esponjoso de la testa de <i>L. montanus</i>	91
Figura 97. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Lupinus</i> sp.....	92
Figura 98. Cutícula de la testa de <i>Lupinus</i> sp.....	92
Figura 99. Macroesclereidas de la testa de <i>Lupinus</i> sp.....	93
Figura 100. Osteoesclereidas de la testa de <i>Lupinus</i> sp.....	93
Figura 101. Parénquima reservante de la testa de <i>Lupinus</i> sp.....	94
Figura 102. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Delonix regia</i>	94
Figura 103. Cutícula de la testa de <i>D. regia</i>	95
Figura 104. Macroesclereidas de la testa de <i>D. regia</i>	95

Figura 105. Osteoesclereidas de la testa de <i>D. regia</i> .	96
Figura 106. Parénquima esponjoso de la testa de <i>D. regia</i> .	96
Figura 107. Osteoesclereidas de la testa de <i>D. regia</i> .	97
Figura 108. Parénquima reservante de la testa de <i>D. regia</i> .	97
Figura 109. Estructuras de la cubierta seminal de <i>Sapindus</i> sp.	98
Figura 110. Cutícula de la testa de <i>Sapindus</i> sp.	98
Figura 111. Macroesclereidas de la testa de <i>Sapindus</i> sp.	99
Figura 112. Parénquima reservante de la testa de <i>Sapindus</i> sp.	99
Figura 113. Parénquima esponjoso de la testa de <i>Sapindus</i> sp.	100
Figura 114. Germinación acumulada de los tratamientos: Control (T) semilla desinfectada; Lijado (L) lijado a un lado del micrópilo; Inmersión en agua hirviendo (93°C) hasta dejar enfriar por 24 horas (A93); Inmersión en agua a 80 °C hasta dejar enfriar por 24 hora (A80); Inmersión en agua a 70 °C hasta dejar enfriar por 24 horas (A70); Inmersión en agua a 60 °C hasta dejar enfriar por 24 horas (A60); Inmersión en agua a 50 °C hasta dejar enfriar por 24 horas (A50); Inmersión en NaOH por 12 horas (I12); Inmersión en NaOH por 18 horas (I18); Inmersión en NaOH por 24 horas (I24).	104

DEDICATORIA

Al pueblo mexicano que con sus contribuciones fiscales hacen posible la asignación de becas para estudios de posgrado.

Con todo mi amor para:

Fernando Cazarez Domínguez

e

Itzel Cazarez Hernández

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por las becas otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A la Dirección General de Investigación y Posgrado (DGIP) por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad Autónoma Chapingo por toda la educación brindada, a nivel maestría como en licenciatura.

A la Coordinación de Posgrado de la Maestría en Ciencia en Ciencias Forestales por todo el apoyo brindado durante todo el proyecto.

Infinitamente agradecida con el Dr. Dante Arturo Rodríguez Trejo, como mi director de tesis, como por todo el apoyo, comprensión, conocimiento y amistad otorgados durante la elaboración de este proyecto.

A los miembros del comité asesor Dr. José Artemio Cadena Meneses y Dr. Diódoro Granados Sánchez, gracias por su asesoría, enseñanzas y apoyo otorgados.

Al alumno Jesús Enrique González Chirinos por la donación de la semilla de *Enterolobium cyclocarpum*.

A mis padres, por todo su cariño, y apoyo otorgado durante mi formación académica y personal.

A la familia Jiménez Hernández, que siempre me apoyaron durante mi formación de licenciatura y posgrado, infinitamente agradecida.

Al Biol. Leopoldo Rosas García, con su apoyo, tiempo otorgado durante la realización de este proyecto.

Al Biol. Simón Morales Rodríguez por la asistencia técnica otorgada durante la obtención de imágenes en el Microscopio Electrónico de Barrido.

A todo el personal académico y administrativo que me fue asignado durante mi formación, por brindarme su tiempo, conocimientos y consejos.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre: Sonia Hernández Epigmenio

Fecha de nacimiento: 8 de julio de 1993

Lugar de nacimiento: San Pedro del Rosal Atlacomulco Edo. Méx.

CURP: HEES930708MMCRPN08

Profesión: Ingeniero en Restauración Forestal

Cédula profesional: 11918964

Desarrollo académico

Bachillerato: Preparatoria Agrícola, UACH

Licenciatura: Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

LATENCIA FÍSICA, MORFOANATOMÍA Y COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA DE *Enterolobium cyclocarpum* (JACQ.) GRISEB

Muchas investigaciones sobre latencia física son enfocadas a métodos de escarificación física y química generalmente buscando romper esta latencia para obtener una germinación exitosa. Es por ello que en la presente investigación fue dirigida a la cubierta seminal de leguminosas con latencia física. El objetivo fue comparar la estructura de la cubierta seminal de *Enterolobium cyclocarpum* con la de trece especies de leguminosas, mediante el análisis de imágenes obtenidas de un Microscopio Electrónico de Barrido, y compararlas. Las capas de estructuras que se encontraron fueron: cutícula, macroesclereidas, osteoesclereidas, parénquima (esponjoso, en empalizada, reservante, compacto). *Enterolobium cyclocarpum* (almacenada durante 37 años) y *Delonix regia* presentaron ocho capas distintas y tres de ellas son osteoesclereidas; *Enterolobium cyclocarpum* (almacenada por dos años), *Ebenopsis ebano*, *Prosopis glandulosa*, *Prosopis laevigata* presentaron siete capas; *Vachellia farnesiana* y *Vachellia pennatula* presentaron seis capas; *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Vachellia schaffneri* y *Lupinus* sp., mostraron cinco capas; *Erythrina coralloides*, *Mucuna* sp., y *Lupinus montanus*, cuatro capas. Las cubiertas seminales de las especies observadas presentan estructuras similares entre sí, como lo son las macroesclereidas, osteoesclereidas y parénquima que en mayor medida es por lo que está formada la cubierta. Todos estos tejidos contribuyen de diferente forma a la latencia física que presentan las leguminosas.

Palabras clave: cubierta seminal, latencia física, macroesclereidas, osteoesclereidas, parénquima.

ABSTRACT

PHYSICAL DORMANCY, MORPHOANATOMY AND SEED COMPOSITION OF *Enterolobium cyclocarpum* (JACQ.) GRISEB

Much research on physical dormancy is focused on physical and chemical scarification methods, generally seeking to break this dormancy in order to obtain a successful germination. That is why this investigation was directed to the seed coat of legumes with physical dormancy. The objective was to compare the structure of the *Enterolobium cyclocarpum* seed coat. with thirteen species of legumes, by analyzing images obtained from a Scanning Electron Microscope, and obtaining similarities and differences between them. The layers of structures found were: cuticle, macrosclereids, osteosclereids, parenchyma (spongy, palisade, reservoir, compact). *Enterolobium cyclocarpum* (stored along 37 years) and *Delonix regia* presented eight different layers and three of them are osteosclereids; *Enterolobium cyclocarpum* (stored along two years), *Ebenopsis ebano*, *Prosopis glandulosa*, *Prosopis laevigata* presented seven layers; *Vachellia farnesiana* and *Vachellia pennatula* showed six layers; *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Vachellia schaffneri* and *Lupinus* sp., had five layers; *Erythrina coralloides*, *Mucuna* sp., and *Lupinus montanus*, presented four layers. The coats of the observed species present structures similar to each other, such as macrosclereids, osteosclereids and parenchyma, which to a greater extent is how the seed coat is formed. These tissues contribute in different ways to the physical dormancy of the seeds.

Keywords: seed coat, physical dormancy, macrosclereids, osteosclereids, parenchyma.

1. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Introducción

Las leguminosas pertenecen a la familia vegetal Fabaceae (leguminosas), es el tercer grupo de plantas más numeroso del planeta, con más de 20.000 especies y supera los 700 géneros, han acompañado al ser humano en su desarrollo agropecuario desde la prehistoria y se cuentan entre las primeras plantas domesticadas (FAO, 2016).

Latencia, dormancia o letargo es definido como la incapacidad de una semilla intacta y viable, de germinar bajo condiciones de temperatura, humedad y concentración de gases que serían adecuadas para la germinación (Varela y Arana, 2011). La latencia física es predominantemente impuesta por la testa, se establece durante la formación de la semilla, se considera que es una adaptación que contribuye a la supervivencia del individuo, ya que restringe la germinación cuando los factores ambientales son desfavorables (Varela y Arana, 2011; Vozzo, 2010).

La testa impermeable de la mayoría de las leguminosas tiene la propiedad de proporcionar restricción mecánica al embrión, mediante la combinación de propiedades estructurales y/o químicas. Regularmente se ve a la testa como impedimento para una germinación rápida y uniforme, pero se debe recordar que la testa cumple las funciones críticas de regular la absorción de agua, proporciona una barrera contra la invasión de hongos y reducir el escape del embrión durante la imbibición (Vozzo, 2010),

La escarificación es cualquier proceso que rompa, raye, altere mecánicamente o ablande las cubiertas. Un gran número de especies no germinan debido a que la testa o cubierta seminal es dura e impide la entrada de agua (latencia física), y la semilla no germina al menos que esta sea escarificada (Varela y Arana, 2011). Varios tratamientos efectivos se han desarrollado para romper esta latencia. Cortar, remojar en agua caliente, escarificación física o con ácido se han utilizado con buenos resultados en semillas de especies leguminosas (Vozzo, 2010).

1.2 Antecedentes

La realización de estudios y análisis específicamente en la cubierta seminal es restringida, regularmente son enfocados en la ruptura de esta cubierta esperando mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo, sin embargo, la explicación del porqué esta latencia en la semilla es limitada. Aunque recientemente está incrementando el interés en el estudio de las estructuras que contribuyen con la latencia física.

La semilla de *Stylosanthes hamata* (L.) Taub., cultivadas en condiciones de invernadero en Maracay, Venezuela se caracteriza por presentar un alto grado de latencia asociada a una restricción a la absorción de humedad (semilla dura), por lo que se realizó una caracterización morfo-anatómica de la cubierta seminal a través del uso del microscopio óptico y de barrido. Los resultados obtenidos señalaron que la dureza seminal estuvo relacionada con la presencia de un micropilo y un hilo totalmente cerrados, una epidermis compuesta por macroesclereidas en empalizada y a una alta concentración de compuestos hidrofóbicos en todos los tejidos que conforman la cubierta seminal (Castillo y Guenni, 2001).

En un estudio anatómico de la cubierta seminal realizado a ocho especies del género *Passiflora*, obtenidas del Herbario de la Universidad Central de Venezuela, se encontraron de una a ocho capas de células con diferentes patrones anatómicos se consideraron características como: grosor, tipo de capa y tipo de alargamiento radial de las células. De las capas de células presentes en las especies estudiadas, se destacó la presencia de una capa de macroesclereidas con patrón de alargamiento radial sinuoso y una capa de células obliteradas en todas las especies estudiadas, éstas siempre están ubicadas como las dos capas más internas de la cubierta seminal, excepto en *Passiflora edulis*. Cabe destacar que el patrón morfoanatómico de la cubierta seminal en el género *Passiflora* es característico de cada especie. (Pérez-Cortéz et al., 2005).

Se estudio la morfología de las semillas y la anatomía de la cubierta seminal en cinco especies venezolanas del género *Calliandra*, con la finalidad de establecer similitudes y diferencias entre estos taxa, para su utilización como criterio taxonómico. La anatomía de la cubierta seminal es las especies estudiadas se caracterizó por la presencia de la capa de Malpighi (macroesclereidas), hipodermis formada por osteoesclereidas y parénquima colapsado, sin embargo se presentaron variaciones cuantitativas en el espesor de estas regiones permitiendo distinguir a cada especie (Leython y Jáuregui, 2008).

Anatómicamente, en semillas de *Medicago sativa* L., el incremento del grosor de la testa se asocia con el nivel de permeabilidad al agua, se le atribuye a la variación del grosor de la cutícula, longitud de las macroesclereidas, grosor de la pared celular, presencia y/o desarrollo de osteoesclereidas. Desde el punto de vista fisiológico y químico, el mecanismo de dormición física por la testa, se explica por la mayor cantidad de componentes con características que repelen el agua y son cementantes, tales como polifenoles, ligninas, taninos condensados y sustancias pécticas y menor proporción de celulosa y hemicelulosa (Galussi *et al.*, 2015).

Las semillas de *Sophora tomentosa* L., y *Eythrina speciosa* Andr., fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido (MEB) para observar la morfología de la cubierta de la semilla, para ambas especies la estructura la estructura es similar y consiste en la región extrahiliar con una capa de células en empalizada columnar, una capa de osteoesclereidas, tejido esponjoso y células trituradas. Las células en empalizada están cubiertas por una gruesa cutícula. Un análisis histoquímico realizado a las especies demostró que en la región hiliar de ambas especies está presente la lignina se encuentra principalmente en la parte superior de estas células (Delgado *et al.*, 2015).

La testa de la semilla de *Ormosia paraensis* Ducke usualmente utilizada en la fabricación de biojoyas, está formada por una cutícula (sustancias hidrofóbicas), epidermis (macroesclereidas de la capa de empalizada), hipodermis (osteoesclereidas) y células del parénquima. Como la semilla de esta especie

presenta latencia física, se realizó escarificación mecánica (ruptura) y química (remojo en H_2SO_4), y se determinó que el remojo en ácido sulfúrico (H_2SO_4 p.a. 98.08%) durante 60 o 120 minutos o la escarificación mecánica son adecuadas para superar la latencia física asociada con impermeabilidad del tegumento de semilla de *O. paraensis* (Marques *et al.*, 2018).

De acuerdo a algunas investigaciones realizadas en semillas de especies con latencia física, se logra apreciar que existen diferentes estructuras que conforman la cubierta seminal que ayudan a que la testa sea más fuerte de manera que se necesiten de métodos de escarificación física o química para poder lograr la germinación exitosa.

1.3 Planteamiento del problema

Existen métodos de escarificación física y química enfocados generalmente a romper la latencia física, con el interés en tener una germinación exitosa en cualquier especie que presente este tipo de latencia. Sin embargo, no hay mucho interés en buscar una explicación del papel que juegan las estructuras que conforman la cubierta seminal en este tipo de latencia, incluso determinar la composición química de la testa aporta una posible explicación de la dureza de esta como lo demuestran algunas investigaciones ya realizadas. La falta de interés probablemente se deba a que no es la solución inmediata a un problema que se remunera o de interés para productores de todo tipo de semillas con latencia física. Sin embargo, debe considerarse la importancia de poder lograr explicar los mecanismos que la cubierta seminal tiene para poder sobrevivir a condiciones adversas cuando presenta latencia física, probablemente logrando establecer la explicación de los mecanismos de protección, puedan replicarse en muchas otras áreas que quizá sean de mayor interés y beneficio para la comunidad científica y la sociedad en general.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Analizar la anatomía y composición de la semilla de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb., mediante resultados de un análisis proximal e imágenes obtenidas en un microscopio electrónico de barrido, para poder aportar al conocimiento teórico de los mecanismos de latencia física que presenta la especie.

1.4.2 Particulares

Identificar, mediante imágenes tomadas con un microscopio electrónico de barrido las partes que conforman la cubierta seminal de la semilla de *E. cyclocarpum*.

Describir la función que tiene la composición de la cubierta seminal de la semilla de *E. cyclocarpum*, mediante la obtención de resultados de un análisis proximal.

Comparar la estructura de la cubierta seminal de *E. cyclocarpum* con la de trece especies de leguminosas, mediante el apoyo de imágenes obtenidas a través de microscopía electrónica, para establecer semejanzas de las estructuras de cubiertas seminales en semillas con latencia física.

1.5 Hipótesis

La cubierta seminal de *Enterolobium cyclocarpum*, está conformada distintas capas celulares y cada una de ellas conformada por diferente estructura y composición las cuales permiten a la semilla de esta especie sobrevivir a condiciones ambientales adversas.

1.6 Literatura citada

- Castillo, R., y Guenni, O. (2001). Latencia en semillas de *Stylosanthes hamata* (Leguminosae) y su relación con la morfología de la cubierta seminal. *Revista de Biología Tropical*, 49(1), 287–299.
- Delgado, C. M. L., de Paula, A. S., Santos, M., y Paulilo, M. T. S. (2015). Dormancy-breaking requirements of *Sophora tomentosa* and *Erythrina speciosa* (Fabaceae) seeds. *Revista de Biología Tropical*, 63(1), 285–294. <https://doi.org/10.15517/rbt.v63i1.13903>
- FAO. (2016). Legumbres: Semillas Nutritivas para un Futuro Sostenible.
- Galussi, A. A., Argüello, J. A., Cerana, M. M., Maximino, M., y Moya, M. E. (2015). Características anatómicas y químicas del tegumento seminal de *Medicago sativa* L. (alfalfa) cv. Baralfa 85 y su asociación con la dormición. *Phyton*, 84(1), 163–175.
- Leython, S., y Jáuregui, D. (2008). Morfología de la semilla y anatomía de la cubierta seminal de cinco especies de *Calliandra* (Leguminosae-Mimosoideae) de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 56(3), 1075–1086.
- Marques, B., Oliveira, C. De, Moro, F. V., Vieira, R. D., Ducke, O., Sementes, P., y De, C. (2018). Seed anatomy and water uptake and their relation to seed dormancy of *Ormosia paraensis* Ducke. *Journal of Seed Science*, 40(3): 237–245.
- Pérez-Cortéz, S., Escala, M., y Tillett, S. (2005). Anatomía de la cubierta seminal de ocho especies de *Passiflora* L., subgénero *Passiflora*. *Acta Botánica Venezuelica*, 28(2), 337–348.
- Varela, S., y Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- Vozzo, J. A. (2010). Manual de semillas de árboles tropicales. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos Servicio Forestal. 894 p.

2. CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Taxonomía de especies

En los Cuadros del 1 al 7 se presenta la taxonomía de las 15 especies, estudiadas de la familia Fabaceae clasificadas subfamilias y tribus. Se trata de la subfamilia Mimosoideae (Tribu Ingeae, Mimoseae y Acacieae), Faboideae (Tribus Phaseoleae, Genisteae) y Caesalpinioideae (Subfamilia Caesalpinieae).

Cuadro 1. Especies de la tribu Ingeae.

Especies: <i>Enterolobium cyclocarpum</i> y <i>Ebenopsis ebano</i>	
Reino:	Plantae
Filo:	Tracheophyta
Subfilo:	Angiospermae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae (Leguminosae)
Subfamilia:	Mimosoideae
Tribu:	Ingeae
Géneros:	<i>Enterolobium</i> y <i>Ebenopsis</i>

Fuente: Naturalista, 2021.

Cuadro 2. Taxonomía de tribu Mimoseae.

Especies: <i>Prosopis glandulosa</i> , <i>P. laevigata</i> y <i>Mimosa caesalpinifolia</i>	
Reino:	Plantae
Filo:	Tracheophyta
Subfilo:	Angiospermae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae (Leguminosae)
Subfamilia:	Mimosoideae
Tribu:	Mimoseae
Géneros:	<i>Prosopis</i> y <i>Mimosa</i>

Fuente: Naturalista, 2021.

Cuadro 3. Taxonomía de tribu Acacieae.

<u>Especie: <i>Vachellia farnesiana</i>, <i>V. schaffneri</i> y <i>V. pennatula</i></u>	
Reino:	Plantae
Filo:	Tracheophyta
Subfilo:	Angiospermae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae (Leguminosae)
Subfamilia:	Mimosoideae
Tribu:	Acacieae
Género:	<i>Vachellia</i>

Fuente: Naturalista, 2021.

Cuadro 4. Taxonomía de tribu Phaseoleae.

<u>Especies: <i>Erythrina coralloides</i> y <i>Mucuna sp.</i></u>	
Reino:	Plantae
Filo:	Tracheophyta
Subfilo:	Angiospermae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae (Leguminosae)
Subfamilia:	Faboideae
Tribu:	Phaseoleae
Género:	<i>Erythrina</i> y <i>Mucuna</i>

Fuente: Naturalista, 2021.

Cuadro 5. Taxonomía de tribu Genisteae.

<u>Especies: <i>Lupinus sp.</i></u>	
Reino:	Plantae
Filo:	Tracheophyta
Subfilo:	Angiospermae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae (Leguminosae)
Subfamilia:	Faboideae
Tribu:	Genisteae
Género:	<i>Lupinus</i>

Fuente: Naturalista, 2021.

Cuadro 6. Taxonomía de tribu Caesalpinieae.

Especies: <i>Delonix regia</i>	
Reino:	Plantae
Filo:	Tracheophyta
Subfilo:	Angiospermae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae (Leguminosae)
Subfamilia:	Caesalpinioideae
Tribu:	Caesalpinieae
Género:	<i>Delonix</i>

Fuente: Naturalista, 2021

Cuadro 7. Taxonomía de género *Sapindus*.

Especies: <i>Sapindus sp.</i>	
Reino:	Plantae
Filo:	Tracheophyta
Subfilo:	Angiospermae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Sapindales
Familia:	Sapindaceae
Subfamilia:	Sapindoideae
Tribu:	-
Género:	<i>Sapindus sp.</i>

Fuente: Naturalista, 2021.

2.2 Semilla

La maduración del fruto y la semilla constituye la última fase del proceso de reproducción sexual y se caracteriza por la presencia de profundos cambios físicos y químicos en ambas estructuras, hacia aspectos, formas y tamaños diferentes los cuales son utilizados como criterios para su identificación. El *fruto* es definido como todo órgano vegetal, debidamente transformado, que encierra en sí la semilla hasta que están maduras, para luego diseminarlas o para desprenderlas de la planta junto con ellos (Navarro-Cerrillo, 2003).

La *semilla* se define como, el embrión que se desarrolla a partir de la ovocélula fecundada que contiene una reserva de alimento en el endospermo, en muchos

casos el o los cotiledones, dependiendo si son dicotiledónea o monocotiledónea, cumple la función de reserva alimenticia (Fortúrbel *et al.*, 2007).

2.2.1 Semilla ortodoxa

Las *semillas ortodoxas* adquieren tolerancia a la deshidratación durante su desarrollo y pueden almacenarse en estado seco, por periodos predecibles y bajo condiciones específicas. A no ser que estén debilitadas por hongos con tolerancia cero en almacenamiento, las semillas ortodoxas deben mantener un alto vigor y viabilidad, por lo menos desde la cosecha hasta la siguiente temporada de cultivo, o por varias décadas a una temperatura de -18°C (Vozzo, 2010).

2.2.2 Semilla recalcitrante

Las *semillas recalcitrantes* son aquéllas que pasan por un corto o ningún secado de maduración y permanecen sensibles a la deshidratación, tanto en su desarrollo como después de su desprendimiento (Vozzo, 2010).

2.3 Partes de la semilla

La semilla presenta las siguientes partes básicas (Navarro-Cerrillo, 2003), para angiospermas:

- *Embrión*: elemento esencial de la semilla, ya que es el germen de la nueva planta. En él se diferencia un primordio de la raíz (radícula), el meristemo apical del vástago (plúmula o epicótilo) y los cotiledones, fijados en el eje embrionario (hipócotilo).

El embrión es una planta en miniatura que se origina de la fusión de uno de los núcleos espermáticos, procedentes del grano de polen, con la oosfera del saco embrionario. En la mayor parte de las especies, la diferenciación del embrión se completa en el momento de la madurez del fruto o semilla.

- *Endospermo*: tejido de almacenamiento de sustancias nutritivas.

Tejido de almacenamiento de sustancias nutritivas que se origina a partir de la fusión de uno de los núcleos espermáticos contenidos en el grano de polen con

uno, dos o más núcleos polares del saco embrionario, lo que da origen a un tejido diploide, triploide o poliploide.

- *Perispermo*: tejido diploide procedente de la nucela que se presenta en diversas cantidades en las semillas de algunas especies.

Tejido de reserva de sustancias ergásticas genéticamente diploide que tiene su origen en la nucela del óvulo. En la madurez la mayor parte de las semillas de los árboles y arbustos no presentan el perispermo debido a que la nucela es consumida en su totalidad por el embrión, el endospermo y el o los tegumentos durante su crecimiento y desarrollo.

- *Cubierta seminal*: proporciona protección mecánica al embrión haciendo posible su dispersión y almacenamiento. Estas cubiertas, en algunos casos contienen sustancias reguladoras del proceso de germinación.

En la **Figura 1**, se presentan las partes de la semilla según Matilla, 2013, y en la **Figura 2**, se presentan las partes de la cubierta seminal de una leguminosa (*L. montanus*).

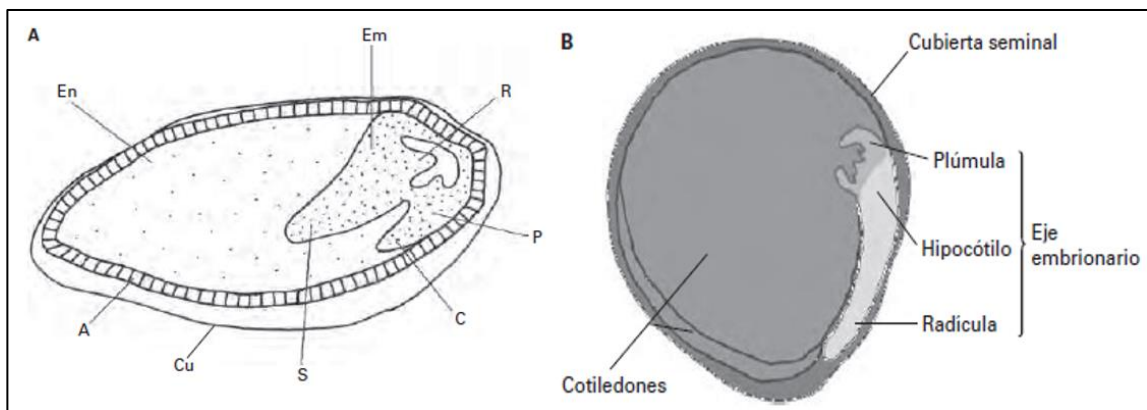


Figura 1. Estructura de una semilla de gramínea (A) y leguminosa (B). A: tejido aleuronar; C: coleóptilo; Cu: cubierta seminal; Em: embrión; En: endospermo; P: plúmula; R: radícula; S: escutelo. Fuente: (Matilla, 2013).

2.4 Testa

La testa o también denominada cubierta seminal, se forma a partir de los tegumentos del óvulo y tiene como función la protección del embrión (Fortúrbel *et al.*, 2007).

La aparente simplicidad estructural de la cubierta seminal encubre una gran complejidad, tanto en su proceso de formación. La mayor parte de las cubiertas seminales están formadas por una cubierta externa denominada testa, y una capa interior generalmente fina y membranosa llamada tegmen. Muchas especies desarrollan tejidos modificados en sus cubiertas seminales que desempeñan funciones durante la diseminación de las semillas (Navarro-Cerrillo, 2003).

Características externas de la cubierta seminal (Navarro-Cerrillo, 2003):

- *Tipo de superficie*: la cubierta seminal de las semillas en especies forestales presenta superficies variadas, las texturas más frecuentes son; lisa, tuberculada, estriada, aerolada, faveoloda, corrugada, escabrosa, acanalada, glandulosa, vesiculada, reticulada, ampollosa, escrobiculada, verrigosa, escamosa, vesiculada.
- *Color*: es una de las características más definitorias de una semilla, por su fácil interpretación como por la estabilidad en cada especie.

La cubierta seminal de la semilla de algunas especies se caracteriza por presentar un sobrecrecimiento que surge del hilo, rafe o antirrafe a partir del cual se origina una dilatación laminar conocida por ala (Navarro-Cerrillo, 2003). En el **Cuadro 8**, se presentan los partes que conforman la cubierta con una breve descripción de acuerdo al autor.

Cuadro 8. Partes que conforman la semilla.

Estructura	Definición
Hilo	Cicatriz de tamaño y forma variada que queda en la semilla cuando ésta se desprende del funículo.
Micrópilo	Perforación a manera de canal que comunica a la semilla con el exterior.
Rafe	Región del ovulo o de la semilla que se ubica en el plano mediano, en la periferia, del lado que no incluye al micrópilo, entre la calaza y el hilo.
Antirrafe	Región del póculo o de la semilla que se ubica en el plano mediano, en la periferia, del lado que no incluye el hilo, entre la calaza y el micrópilo.
Funículo	Cordón formado principalmente por tejido vascular que conecta al óvulo en la placenta. En la semilla madura el funículo generalmente se desprende dejando e hilo descubierto, pero algunas veces permanece adherido.
Arilo	Estructura dura o carnosas que se desarrolla a partir del folículo.
Estrófilo	Excrecencia que se sitúa junto al hilo y que tiene su origen en el rafe o en el funículo.

(Fuente: (Navarro-Cerrillo, 2003))

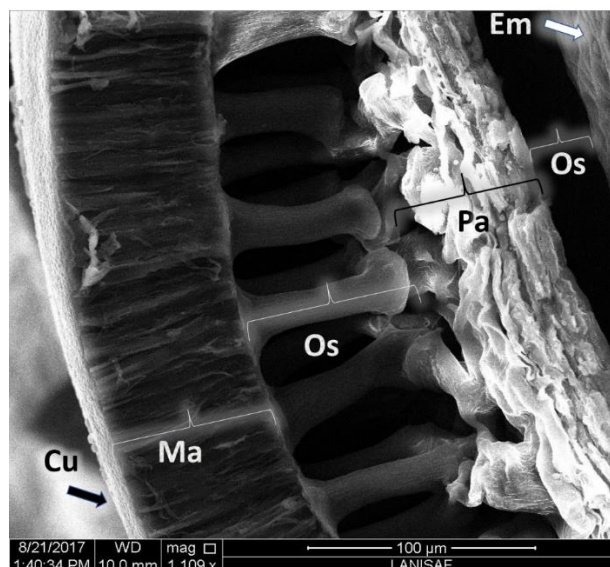


Figura 2. Partes de la cubierta seminal de *Lupinus montanus* Kunth; Cutícula (Cu), macroesclerenquima en empalizada (Ma), osteoesclerenquima (Os), parénquima compacto (Pa), cavidad seminal (Ca), embrión (Fuente: (Hernández-Epímenio, 2018)).

2.5 Latencia

La latencia o dormición se define como el bloqueo que tiene lugar en una semilla viable que le impide completar la germinación en condiciones favorables. La dormición se divide en primaria o secundaria, según que la capacidad germinativa de una semilla esté bloqueada antes o después de su dispersión, respectivamente (Matilla, 2013):

- *Latencia primaria*, puede eliminarse mediante un tratamiento de frío (estratificación), luz, gas, etileno, sustancias presentes en el humo del tabaco (p. ej., butenolida) y óxido nítrico, entre otros.
- *Latencia secundaria*, suele estar relacionada con los ciclos anuales de dormición en los bancos de semillas del suelo. Su eliminación suele producirse cuando las condiciones medioambientales en el suelo son las adecuadas para germinar

La latencia depende de características fisiológicas y de las características morfológicas de la semilla. Una de las clasificaciones disponibles, incluye cinco tipos (Matilla, 2013):

1. *Latencia fisiológica* (DF): es la más abundante en todo tipo de semillas y puede, a su vez, dividirse en no profunda y profunda, según que el tratamiento con gas sea o no efectivo, respectivamente, para eliminarla.
2. *Latencia morfológica* (DM): se debe a un defecto en el crecimiento del embrión, el cual permanece durmiente hasta que su desarrollo ha finalizado con éxito.
3. *Latencia morfofisiológica* (DMF): se debe a una anomalía en el desarrollo del embrión y a la intervención de un componente fisiológico, para eliminarla se necesita calor y estratificación en frío, aunque en algún caso puede ser efectivo solamente un tratamiento de gas.
4. *Latencia física* (Df): se debe a la impermeabilidad al agua de las células del tejido en empalizada de la cubierta seminal, responsable del control del movimiento del agua de imbibición; las cubiertas seminales duras comprimen el embrión, que no suele ser durmiente, y le impiden germinar.

Para provocar la germinación en semillas es preciso proceder a la escarificación física o química, o ambas, de la cubierta.

5. *Latencia combinatoria* (DF + Df): aparece en semillas con cubiertas duras y va acompañada de una dormición fisiológica del embrión, aunque no existen demasiadas pruebas experimentales, el tamaño del embrión parece ser determinante en la evolución de la dormición de las semillas en la escala biológica.

2.6 Escarificación

Existen diversos tratamientos (lixiviación, estratificación fría, aplicaciones de ácido giberélico, etc.) que son capaces de eliminar o contrarrestar el efecto de los inhibidores y levantar el estado de dormición embrionaria. Dentro de las posibles sustancias inhibidoras de la germinación, implicadas en la dormición embrionaria, destaca, por su presencia detectada en embriones de diversas especies, el ácido abscísico (ABA). La técnica utilizada para “romper” la latencia de una semilla dependerá del tipo de latencia que ésta presente. El problema se complica en aquellas semillas en las que actúan conjuntamente dos o más factores causantes de la latencia. Entre las técnicas y tratamientos más frecuentemente empleados para vencer la latencia de semillas podemos citar los siguientes (Pérez García y Pita Villamil, 1999):

- *Escarificación mecánica*: en algunas semillas, las cubiertas seminales se pueden eliminar total o parcialmente sin dañar al embrión. En otros casos basta con provocar pequeños daños en las cubiertas mediante incisión, punción, lijado, etc.
- *Escarificación con ácidos*: en estos tratamientos se suelen sumergir las semillas en ácido sulfúrico concentrado durante pocos minutos. Tras el tratamiento, y antes de la siembra, las semillas deben ser lavadas con agua varias veces.
- *Escarificación con calor*: se puede utilizar calor seco (estufa) y agua caliente, empleando temperaturas entre 50-100°C y diferentes tiempos según la mayor o menor dureza de las cubiertas seminales.

- *Escarificación por lixiviación*: el lavado de las semillas con agua o con otros disolventes (etanol, acetona, cloroformo, etc.) se utiliza frecuentemente cuando la semilla contiene sustancias inhibidoras de la germinación en sus cubiertas.
- *Aplicaciones exógenas de giberelinas*: para ello, antes de la siembra, se pueden sumergir las semillas en una solución de ácido giberélico (GA₃) de diferente concentración (generalmente entre 100 y 500 mg. l) durante 24 horas, o bien sustituir el agua de incubación por la correspondiente solución de GA. Este tratamiento suele dar buenos resultados cuando la latencia es determinada por la presencia, en la semilla, de sustancias inhibidoras de la germinación. Así, se ha comprobado que, en numerosas semillas, el GA₃ contrarresta el efecto inhibidor.
- *Escarificación fría*: las semillas de algunas especies son capaces de vencer su latencia cuando se las estratifica, durante periodos variables, en un ambiente con un elevado contenido de humedad y a baja temperatura (alrededor de 5°C). La estratificación fría tiende a imitar condiciones naturales a las que se ven sometidas las semillas de muchas especies, durante el invierno.

2.7 Estructura de la cubierta seminal

Entre las diferentes capas que se han descrito para semillas con latencia física, están las siguientes.

- *Cutícula*: Cubierta externa sobre la epidermis de la testa, es la primera línea que contribuye a la impermeabilidad de la cubierta seminal (agua y gases) y puede influenciar el metabolismo y crecimiento del embrión (Vozzo, 2010).
- *Macroesclereidas*: líneas de células columnares, con paredes gruesas y compactas (células en empalizada o de Malpighi), se considera que estas células juegan un papel principal en evitar el ingreso del agua (Vozzo, 2010).

- Osteoesclereidas: líneas de células columnares en forma de huso, carrete o hueso, extremos están ensanchados y a veces ramificados (Salamanca-Delgadillo y Sierra-Camarena, 2019).
- Parénquima: es un tejido vivo, principal representante de los tejidos denominados fundamentales (parénquima, colénquima y esclerénquima). Es un tejido sencillo que está implicado en una gran variedad de funciones dependiendo de dónde se encuentre como la fotosíntesis, almacenamiento, la elaboración de sustancias orgánicas y la regeneración de tejidos (Megias *et al.*, 2020).

2.8 Literatura citada

- Fortúrbel, F. E., Achá, D. A., y Mondaca, D. A. (2007). Manual de Introducción a la Botánica. 2° edición, Ed. Publicaciones Integrales, La Paz, 252p.
- Matilla, J. Á. (2013). Desarrollo y germinación de las semillas. En *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (pp. 537–558).
- Megias, M., Molist, P., y Pombal, M. A. (2020). Tejidos Vegetales Parénquima. Universidad de Vigo (pp. 15).
- Naturalista. 2021. *Delonix regia*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/62839-Delonix-regia> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Ebenopsis ebano*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/search?q=Ebenopsis%20ebano> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Erythrina coralloides*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/206531-Erythrina-coralloides> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Lupinus montanus*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/148358-Lupinus-montanus> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Lupinus* sp. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/search?q=Lupinus> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Mimosa caesalpinifolia*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/556340-Mimosa-caesalpinifolia> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Mucuna* sp. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/132171-Mucuna> Consultado: 21 enero 2021.

- Naturalista. 2021. *Prosopis glandulosa*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/58160-Prosopis-glandulosa> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Prosopis laevigata*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/167456-Prosopis-laevigata> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Sapindus* sp. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/62832-Sapindus> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Vachellia farnesiana*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/79472-Vachellia-farnesiana> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Vachellia pennatula*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/349260-Vachellia-pennatula> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Vachellia schaffneri*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/809132-Vachellia-schaffneri> Consultado: 21 enero 2021.
- Naturalista. 2021. *Enterolobium cyclocarpum*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/search?q=Enterolobium%20cyclocarpum> Consultado: 21 enero 2021.
- Navarro-Cerrillo, R. M. (2003). Biología y descripción de semillas. En *Material vegetal de reproducción: manejo, conservación y tratamiento* (p. 229).
- Pérez-García, F., y Pita-Villamil, J. M. (1999). Dormición de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España (pp. 20).
- Salamanca-Delgadillo, J., y Sierra-Camarena, J. S. (2019). Morfología de Plantas Vasculares: Esclerénquima. Universidad de Guadalajara.
- Vozzo, J. A. (2010). Manual de semillas de árboles tropicales. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos Servicio Forestal. 894 p.

3. CAPÍTULO 3: CAPAS ESTRUCTURALES DE LA TESTA EN 15 ESPECIES CON LATENCIA FISICA (FABACEAE Y SAPINDACEAE)

3.1 Introducción

Las semillas son, en la mayor parte de las especies de interés agrícola, el principal mecanismo de reproducción. Las semillas están constituidas por un embrión y por compuestos de reserva (glúcidos, proteínas, lípidos), rodeados ambos por las cubiertas seminales. No obstante, esta estructura general varía entre las diferentes especies principalmente en relación al tipo y proporción de los compuestos de reserva y a las características de las cubiertas seminales (Pita-Villamil y Perez-García, 1998).

La cutícula de la superficie de la semilla es la primera línea de impermeabilidad, aunque no se le considera como la principal barrera para la entrada de agua, debajo de la esta se encuentran líneas de células de Malpighi (macroesclereidas), con paredes gruesas, que encierran completamente el embrión con la excepción del hilo, el micrópilo y el poro calazal; debajo estas células hay una capa corta y gruesa de hipodermas (osteoesclereidas) con paredes engrosadas, se considera que el conjunto de estas células juegan un papel principal en evitar el ingreso del agua. Debajo de las (Vozzo, 2010).

El termino latencia, se define como la incapacidad de una semilla intacta y viable, de germinar bajo condiciones de temperatura y humedad adecuadas para la germinación, esta es predominantemente impuesta por la testa considerada como una adaptación que contribuye a la supervivencia del individuo. La mayoría de las leguminosas tiene una cubierta seminal impermeable mediante la cual y en combinación con propiedades estructurales y/o químicas restringe mecánicamente al embrión. La testa no solo se involucra en el impedimento para una germinación rápida y uniforme, también cumple funciones críticas como regular la absorción de agua, proporciona una barrera contra la invasión de hongos y reducir el escape del embrión durante la imbibición (Vozzo, 2010).

La semilla de *Stylosanthes hamata* (L.) Taub. se caracteriza por presentar un alto grado de latencia asociada a una restricción a la absorción de humedad (semilla

dura), por lo que se realizó una caracterización morfo-anatómica de la cubierta seminal a través del uso del microscopio óptico y de barrido. Los resultados obtenidos señalaron que la dureza seminal estuvo relacionada con la presencia de un micropilo y un hilo totalmente cerrados, una epidermis compuesta por macroesclereidas en empalizada y a una alta concentración de compuestos hidrofóbicos en todos los tejidos que conforman la cubierta seminal (Castillo y Guenni, 2001).

En un estudio anatómico de la cubierta seminal realizado a ocho especies venezolanas del género *Passiflora*, se encontraron de una a ocho capas de células con diferentes patrones anatómicos se consideraron características como: grosor, tipo de capa y tipo de alargamiento radial de las células. De las capas de células presentes en las especies estudiadas, se destacó la presencia de una capa de macroesclereidas con patrón de alargamiento radial sinuoso y una capa de células obliteradas en todas las especies estudiadas, éstas siempre están ubicadas como las dos capas más internas de la cubierta seminal, excepto en *Passiflora edulis* SIMS., Cabe destacar que el patrón morfoanatómico de la cubierta seminal en el género *Passiflora* es característico de cada especie.(Pérez-Cortéz *et al.*, 2005).

Se estudio la morfología de las semillas y la anatomía de la cubierta seminal en cinco especies venezolanas del género *Calliandra*, con la finalidad de establecer similitudes y diferencias entre estos taxa, para su utilización como criterio taxonómico. La anatomía de la cubierta seminal es las especies estudiadas se caracterizó por la presencia de la capa de Malpighi (macroesclereidas), hipodermis formada por osteoesclereidas y parénquima colapsado, sin embargo se presentaron variaciones cuantitativas en el espesor de estas regiones permitiendo distinguir a cada especie (Leython y Jáuregui, 2008).

Anatómicamente, en semillas de *Medicago sativa* L., el incremento del grosor de la testa se asocia con el nivel de permeabilidad al agua, se le atribuye a la variación del grosor de la cutícula, longitud de las macroesclereidas, grosor de la pared celular, presencia y/o desarrollo de osteoesclereidas. Desde el punto de

vista fisiológico y químico, el mecanismo de dormición física por la testa, se explica por la mayor cantidad de componentes con características que repelen el agua y son cementantes, tales como polifenoles, ligninas, taninos condensados y sustancias pécticas y menor proporción de celulosa y hemicelulosa (Galussi *et al.*, 2015).

Las semillas de *Sophora tomentosa* y *Eythrina speciosa*, fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido (MEB) para observar la morfología de la cubierta de la semilla, para ambas especies la estructura la estructura es similar y consiste en la región extrahiliar con una capa de células en empalizada columnar, una capa de osteosclereidas, tejido esponjoso y células trituradas. Las células en empalizada están cubiertas por una gruesa cutícula (Delgado *et al.*, 2015). La testa de la semilla de *Ormosia paraensis*, está formada por una cutícula (sustancias hidrofóbicas), epidermis (macroesclereidas de la capa de empalizada), hipodermis (osteosclereidas) y células del parénquima (Marques *et al.*, 2018). Un análisis histoquímico realizado a las especies *S. tomentosa* y *E. speciosa* demostró que en la región hiliar de ambas especies está presente la lignina se encuentra principalmente en la parte superior de estas células (Delgado *et al.*, 2015).

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Anatomía microscópica de semillas

La observación y toma de imágenes mediante Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) fue realizada en la Unidad de Microscopia Electrónica del Colegio de Postgraduados, por el Biól. Simón Morales Rodríguez. Para la observación de las imágenes fue necesario entregar muestras de las semillas a ser observadas listas para que fueran fijadas al stub (objeto para fijar la muestra) para su posterior observación, para obtener la muestra de cada una de las siguientes especies (**Cuadro 9**) se realizó un proceso destructivo.

Cuadro 9. Especies observadas en el laboratorio.

	Especie
1	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Recolectada en 1983*)
2	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Recolectada en 2019)
3	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>
4	<i>Prosopis glandulosa</i>
5	<i>Prosopis laevigata</i>
6	<i>Erythrina coralloides</i>
7	<i>Vachellia farnesiana</i>
8	<i>Vachellia schaffneri</i>
9	<i>Vachellia pennatula</i>
10	<i>Ebenopsis ebano</i>
11	<i>Delonix regia</i>
12	<i>Mucuna</i> sp.
13	<i>Lupinus</i> sp.
14	<i>Lupinus montanus</i> **
15	<i>Sapindus</i> sp.

*37 años almacenada;

** esta especie no se observó en este laboratorio

3.2.2 Adquisición y obtención de muestras

Para la obtención de las muestras de testa fue necesario realizar un método destructivo, por ser semillas con latencia física fue necesario apoyarse de una pinza de presión y se buscó fracturar (para conserva la estructura de la muestra) la semilla, para que en el momento de la observación se logren apreciar las diferentes capas celulares de la cubierta seminal sin alteración, con una pinza de disección se eligieron los fragmentos de testa o testa-cotiledones que se vieran fracturados y no cortados, muestras de testa de 0.5-1.0 cm., para colocarla en un recipiente de muestra ser etiquetada (**Figura 3**) y entregada al laboratorio, este proceso se repitió con las 14 especies.



Figura 3. Muestras de testa para observación en MEB.

La adquisición las semillas para obtener la muestra para laboratorio fue obtenido de diferentes lugares.

Cuadro 10. Modo de adquisición de la muestra.

Especie	Modo de adquisición
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Recolectada en 1983)	Otorgada por el director de tesis de la reserva del laboratorio de semillas de la DICIFO, UACH.
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	
<i>Prosopis glandulosa</i>	
<i>Prosopis laevigata</i>	
<i>Vachellia farnesiana</i>	
<i>Vachellia schaffneri</i>	
<i>Vachellia pennatula</i>	
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Recolectada en 2016)	Donada por un estudiante de la DICIFO
<i>Ebenopsis ebano</i>	
<i>Erythrina coralloides</i>	Recolectada dentro de la UACH. Recolectada de un predio de San Pedro del Rosal Atlacomulco Estado de México
<i>Lupinus sp</i>	
<i>Lupinus montanus</i>	Para esta especie ya se contaba con las imágenes de microscopia al momento de hacer este estudio
<i>Delonix regia</i>	Las semillas de estas especies fueron obtenidas de aretes artesanales
<i>Mucuna sp.</i>	
<i>Sapindus sp.</i>	

3.2.3 Fijación de muestra

Para el proceso de fijación de la muestra en el stub se realizaron varias actividades. Primeramente, se limpian los stubs que se ocuparan (uno por muestra), con las manos protegidas con guantes de látex, en un trozo de tela de algodón fue colocada una pequeña cantidad de crema para pulir metales (BRASSO BRILLA METAL ®) y se froto por cada superficie del stub, para lograr limpiar restos oro-paladio de trabajos anteriores. Cuando se encontraron limpios se pasan por una tela limpia y sin tocarlos directamente con los guantes para no dejar marcas y se colocó un frasco limpio (**Figura 4**).

Colocados en el frasco limpio son lavados por cinco minutos con agua corriente y jabón neutro, pasados estos cinco minutos se enjuagan hasta quitar exceso de jabón, finalizando con un enjuague en agua desionizada, para ser colocados en acetona al 80% en un vaso de precipitados pequeño.

El vaso de precipitados es colocado en un sonicador por 15 minutos, para extraer impurezas. Pasados los 15 minutos, se extraen de la acetona y son colocados en un recipiente de plástico que en el fondo tiene papel estraza para quitar la acetona, se dejan aquí hasta que se ocupen.



Figura 4. Stubs sucios (izquierda) y limpios(derecha) para fijar la muestra.

Para fijar la muestra fue colocado sobre el stub un trozo redondo de cinta adhesiva de carbón del tamaño de este, y con el apoyo de un microscopio macroscópico y una pinza de disección se fijó la muestra sobre el stub (**Figura**

5), de manera que lograra apreciarse completamente el sitio de interés, para realizar la observación correctamente y a detalle.



Figura 5. Fijación de muestras en los stubs.

3.2.4 Recubrimiento

Cuando las muestras estuvieron fijadas a los stubs fueron colocadas en el Sputter (Modelo: FINE COAT ION SPUTTER JFC-1100) para que ser recubiertas con oro-paladio (50-50%), esto es para lograr apreciar las diferentes estructuras de la muestra, en la **Figura 6**, el técnico coloca el stub con la muestra fijada en el Sputter.



Figura 6. Colocación de muestras en el Sputter.

La **Figura 7**, se muestra al Sputter cuando empieza a realizar el recubrimiento por el tiempo que el técnico ya tiene determinada, este proceso solo es realizado por el técnico encargado del equipo.



Figura 7. Sputter realizando recubrimiento en muestras.

Ya que el Sputter termino de cubrir a las muestras con una capa fina de oro-paladio son retiradas y colocadas en una caja Petri previamente arreglada con cintas adhesivas doble cara (**Figura 8**) para que no se muevan al momento de moverlas de un sitio a otro, ya que, aunque este recubierta la muestra aún puede moverse.



Figura 8. Muestras recubiertas con oro-paladio.

3.2.5 Observación

Antes de realizar la observación las muestras recubiertas con oro-paladio fueron colocados en una platina de aluminio con capacidad para cuatro stubs, para posteriormente colocarla en un compartimento destinado para esta dentro del MEB, como se muestra en la **Figura 9**, este procedimiento es realizado exclusivamente por el técnico del equipo.

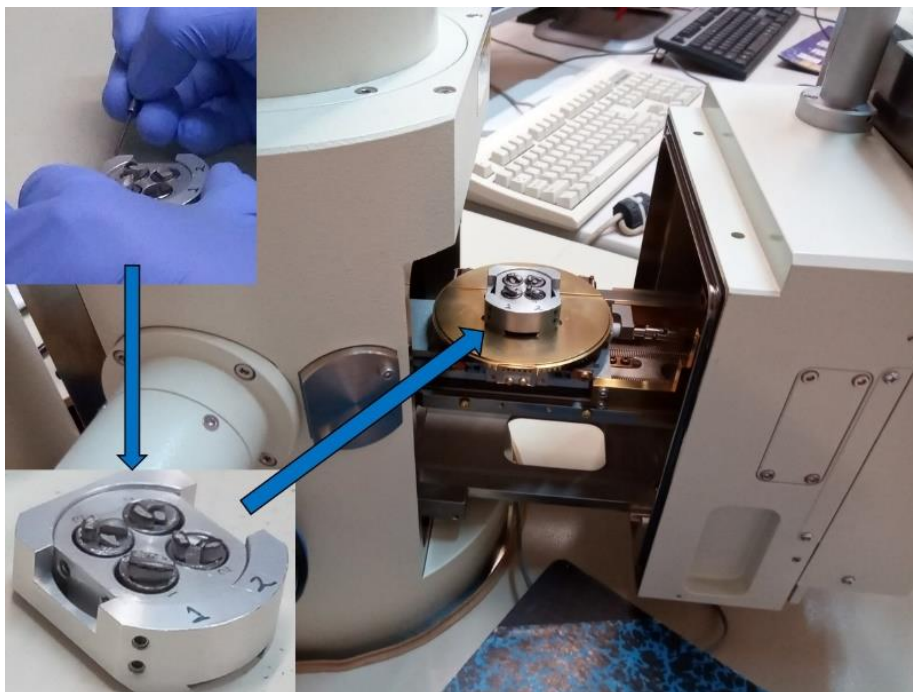


Figura 9. Preparación y colocación de platina en el MEB.

La observación es realizada exclusivamente por el técnico encargado del equipo, aunque se nos fue permitido estar como observadores, esto para indicar al técnico que partes de interés de la muestra enfocar.



Figura 10. MEB y equipo para observación.

El técnico realizó la observación con el apoyo de una computadora de escritorio (Modelo: NEC MultySync LCD2090UXi) enlazada al MEB (Modelo: JEOL JSM-6390 Scanning Electron Microscope) mediante el software JEOL Scanning Electron Microscope (**Figura 10 y 11**), algunos ejemplos de los resultados obteniendo en la observación se pueden apreciar en la **Figura 12**.



Figura 11. Técnico de MEB realizando la observación.

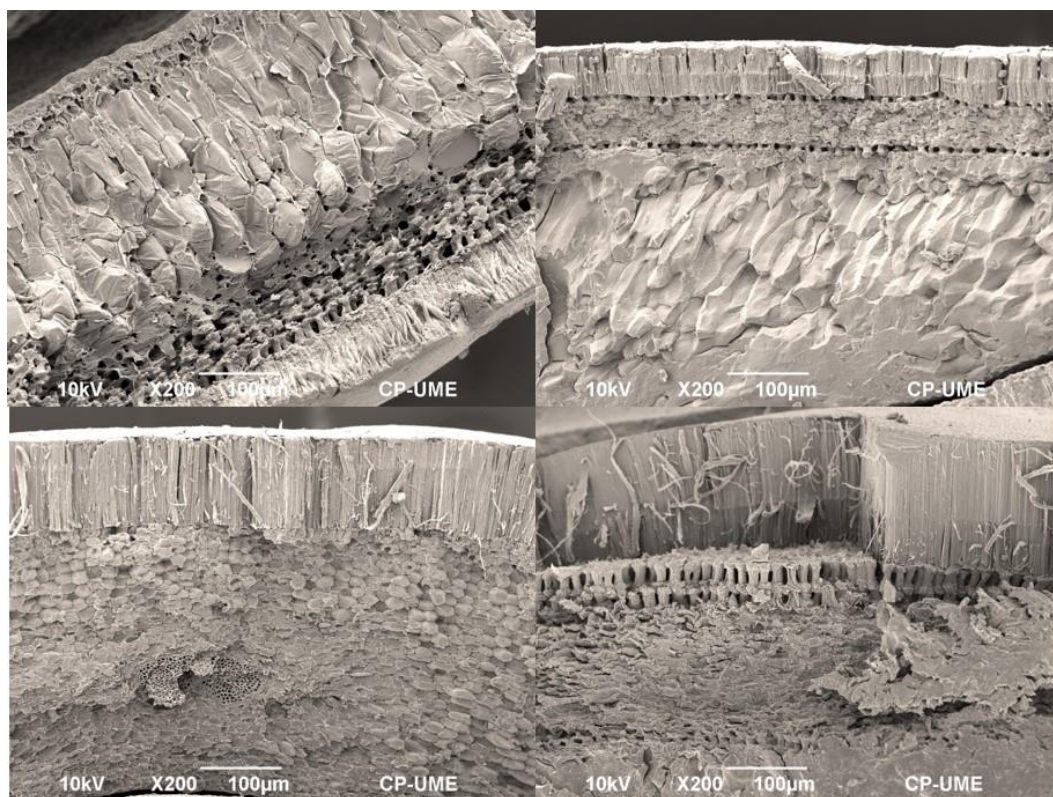


Figura 12. Imágenes observadas en MEB.

3.2.6 Análisis proximal de *Enterolobium cyclocarpum*

Este análisis fue enviado para ser elaborado por el Laboratorio de Nutrición Animal del departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, el laboratorio analiza esta muestra por triplicado. Para esto se nos fue solicitado 100 g de semilla de seca, como en este proceso el interés fue determinar por separado el análisis proximal de testa y cotiledones por lo que se realizó el siguiente proceso para obtención de la muestra.

Para la obtención de la muestra se usó un método destructivo, con el apoyo de unas pinzas de presión de rompió el equivalente a 106.515 g (**Figura 13**), en semillas completas, para posteriormente separar la testa de los cotiledones, entregando al laboratorio 54.103 g, de cotiledones y 45.989 g (**Figura 14**), de testa, ambas muestras completamente secas, con un total de 100.092 g, de semilla seca. Se obtuvo esta cantidad de muestra debido a las pérdidas que ocurrieron al momento de romperlas.



Figura 13. Semilla de *Enterolobium cyclocarpum* destinada a el análisis proximal.



Figura 14. Muestras de semilla requeridas para análisis proximal cotiledones (izquierda) y testa (derecha).

3.3 Experimento de germinación de *Enterolobium cyclocarpum*

3.3.1 Preparación de cajas de germinación

Se ocuparon ocho cajas de germinación (**Figura 15**) las cuales fueron lavadas con agua corriente y desinfectadas con agua y cloro (10 gotas Cloralex ®/ por litro de agua), en el fondo fue colocada tela fieltro del tamaño del fondo de la caja germinadora lavada y desinfectada. Se etiqueto cada una con la numeración 1-8 (bloques) y se le agrego etiquetas de la aleatorización de los diez tratamientos en cada bloque.



Figura 15. Caja germinadora con tapa hermética.

Cuando el fieltro fue colocado en el fondo, se le agrego 60 ml de agua con cloro (10 gotas Cloralex ®/ por litro de agua), esto para mantener la tela húmeda y la semilla pudiera germinar (**Figura 16**).

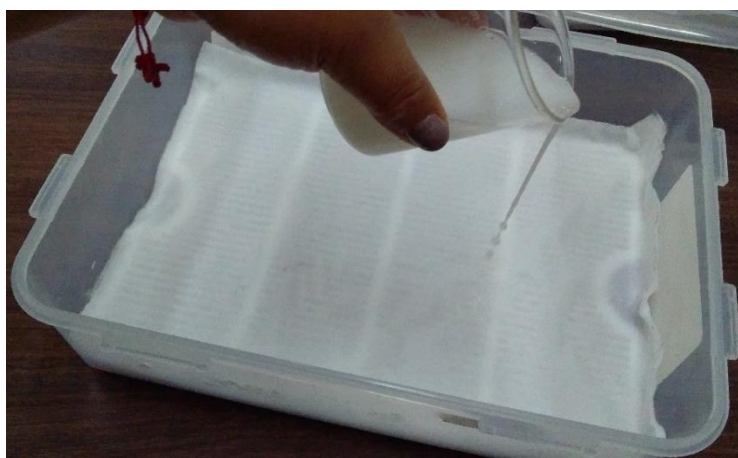


Figura 16. Caja germinadora preparada.

3.3.2 Métodos de escarificación

Para poder realizar el experimento de germinación se aplicaron diez tratamientos descritos en el **Cuadro 11**.

Cuadro 11. Tratamientos de escarificación para *Enterolobium cyclocarpum*.

No.		Tratamientos	Simbología
1		Testigo	T
2	MECÁNICO	Lijado: grano grueso	L
3		Agua hirviendo: +- 93°C	A93
4		Agua: 80°C	A80
5	TÉRMICO	Agua: 70°C	A70
6		Agua: 60°C	A60
7		Agua: 50°C	A50
8	QUÍMICO	Inmersión en hidróxido de sodio (NaOH): 12 horas	I12
9		Inmersión en hidróxido de sodio (NaOH): 18 horas	I18
10		Inmersión en hidróxido de sodio (NaOH): 24 horas	I24

- Tratamiento 1: Testigo

Para este tratamiento fueron desinfectada 160 semillas con agua y cloro (10 gotas Cloralex ®/ por litro de agua), este procedimiento se realizó para evitar alguna propagación de hongos en las cajas germinadoras y posteriormente fueron distribuidos en los bloques completamente al azar.

- Tratamiento 2: Escarificación mecánica

En este tratamiento fueron lijadas (lija TRUPER ® grano grueso) 160 semillas de un lado del micrópilo (**Figura 17**), para evitar afectar a la radícula, posteriormente fue desinfectada con agua y cloro (10 gotas Cloralex ®/ por litro de agua), para ser distribuidos en los bloques completamente al azar.

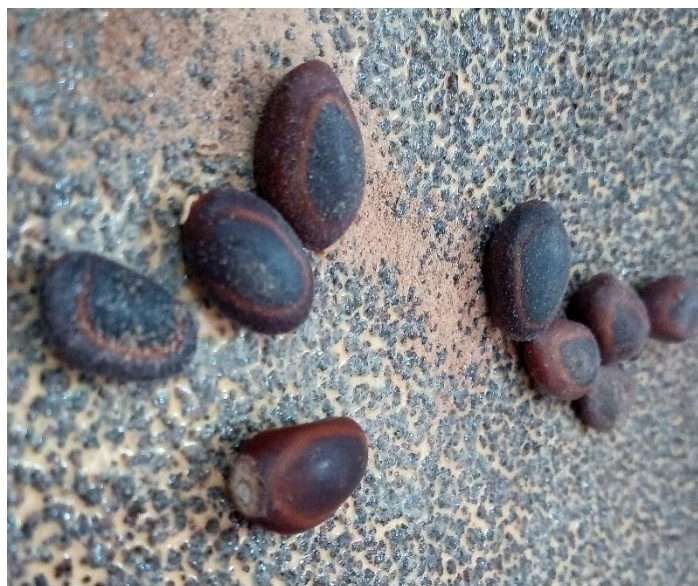


Figura 17. Semilla lijada.

- Tratamiento 3-7: Escarificación térmica

Para la escarificación térmica fueron realizados cinco tratamientos. Se desinfectaron 160 semillas y fueron colocadas en un recipiente de plástico con tapa hermética y graduados en ml (previamente lavado y desinfectado) (**Figura 18**), este recipiente se colocó sobre una superficie de madera, posteriormente se puso sobre el fuego un recipiente de aluminio con $\frac{1}{2}$ litro de agua, cuando empezó a hervir se tomó la temperatura (93°C), al retirar el agua del fuego el agua fue agregada inmediatamente al recipiente con las semillas hasta 750 ml (capacidad del recipiente de plástico en donde se colocaron las semillas) y se cerró herméticamente para dejar reposar por 24 horas, pasado este tiempo fueron distribuidos en los bloques completamente al azar. El proceso descrito anteriormente se repitió para los tratamientos con temperaturas 80, 70, 60 y 50°C para los tratamientos térmicos se usaron un total de 800 semillas.



Figura 18. Semilla de tratamientos 3-7 desinfectada.

- Tratamiento 8-10: Escarificación química
 - Preparación del hidróxido de sodio (NaOH)

La preparación del hidróxido de sodio (NaOH), se realizó con precaución usando guantes de plástico, cubrebocas y gafas de protección, se usó el producto de la marca comercial Limpiahornos mony®, que tiene un contenido neto de 470 g el contenido pastoso fue colocado en un recipiente de plástico de un litro y posteriormente se le agregó agua hirviendo hasta la medida de un litro para diluir la pasta, y se revolvió con una cuchara de plástico hasta que se logró homogeneizar la pasta de hidróxido de sodio con el agua (**Figura 19**).



Figura 19. Preparación del hidróxido de sodio (NaOH).

Fueron tres tratamientos de escarificación química y se realizaron con el siguiente procedimiento. Cuando se obtuvo la homogeneización del NaOH, en tres recipientes de plástico con tapa hermética y graduados en ml, se colocaron 160 semillas en cada recipiente, mismos que fueron puestos sobre una superficie de madera, posteriormente con precaución se le agrego NaOH hasta 375 ml de manera que se cubriera toda la semilla, enseguida se le agrego agua hirviendo hasta la marca 625 ml y se procedió a revolver con una cuchara de plástico hasta homogeneizar, se cerró herméticamente (**Figura 20**). El primer recipiente se dejó reposar 12 horas, el segundo 18 horas y el tercero 24 horas, pasado este tiempo cada tratamiento fueron distribuidos en los bloques completamente al azar, se usaron un total de 480 semillas para estos tres tratamientos.



Figura 20. Semillas reposando en hidróxido de sodio (NaOH).

3.3.3 Germinación

Colocados los diez tratamientos en los ocho bloques al azar (**Figura 21**), fueron situados sobre el suelo a temperatura ambiente, realizando observaciones diarias durante un mes, agregando agua y cloro (10 gotas Cloralex ®/ por litro de agua) cuando se comenzara observar disminución de esta, para que la tela fieltro se conservara siempre húmeda.



Figura 21. Bloque con tratamientos distribuidos al azar.

3.3.4 Diseño experimental

Los datos observados se fueron capturando en una hoja de cálculo del Software Microsoft® Excel para su posterior análisis. Se estableció un diseño experimental de bloques completamente al azar usando el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: μ = Media general, α_i = Efecto de i-ésimo tratamiento, β_j = Efecto de j-ésimo bloque, ε_{ijk} = Error experimental

El experimento se realizó con diez tratamientos y ocho repeticiones, se utilizaron 20 semillas por tratamiento, ocupando un total de 1600 semillas,

Cuadro 12. Diseño experimental de bloques completamente al azar.

BLOQUE	TRATAMIENTO									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	A50	T	A80	L	I24	I12	A60	A70	I18	A93
2	A60	I24	I12	A50	L	A80	T	A93	A70	I18
3	L	A60	I18	A93	I12	A70	A50	T	I24	A80
4	I24	A50	L	I18	A80	A93	A70	I12	A60	T
5	I12	L	A70	A93	A50	I24	A60	I18	T	A80
6	I24	A50	T	L	I18	A70	A80	A93	I12	A60
7	A50	A60	A80	I18	A93	I12	T	I24	A70	L
8	A93	A70	A50	A80	T	I18	A60	I12	L	I24

Control (T) semilla desinfectada; Lijado (L) lijado a un lado del micrópilo; Inmersión en agua hirviendo (93°C) hasta dejar enfriar por 24 horas (A93); Inmersión en agua a 80 °C hasta dejar enfriar por 24 horas (A80); Inmersión en agua a 70 °C hasta dejar enfriar por 24 horas (A70); Inmersión en agua a 60 °C hasta dejar enfriar por 24 horas (A60); Inmersión en agua a 50 °C hasta dejar enfriar por 24 horas (A50); Inmersión en NaOH por 12 horas (I12); Inmersión en NaOH por 18 horas (I18); Inmersión en NaOH por 24 horas (I24)

3.3.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de germinación y energía germinativa fueron analizados con el paquete estadístico SAS®, Versión 9.0, para microcomputadoras, empleando el procedimiento análisis de varianza ($p \leq 0.01$ o $p \leq 0.05$) (Proc Anova) (SAS Institute, 2010).

Debido a que la germinación es una variable binomial, fue transformada mediante la función arco seno. Las medias fueron comparadas mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.01$ o $p \leq 0.05$).

3.4 Resultados

3.4.1 Partes de la semilla de *Enterolobium cycloparpum*.

Se identificaron las partes mostradas en la **Figura 22**.

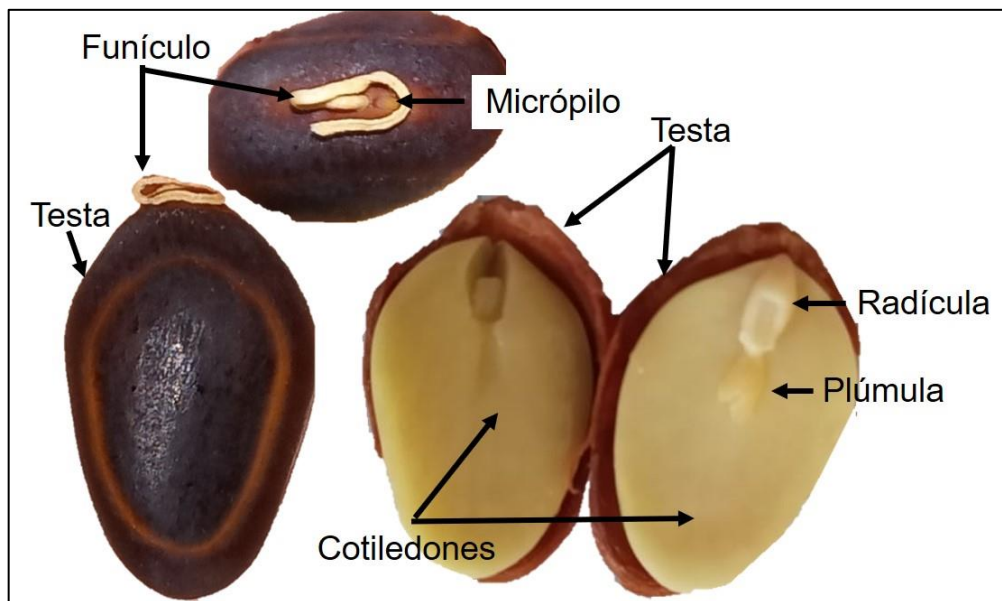


Figura 22. Partes de la semilla de *Enterolobiun cyclocarpum*.

3.5 Análisis de imágenes de microscopía

3.5.1 *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb, (2016).

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 23** y de la **Figura 24** a **29** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

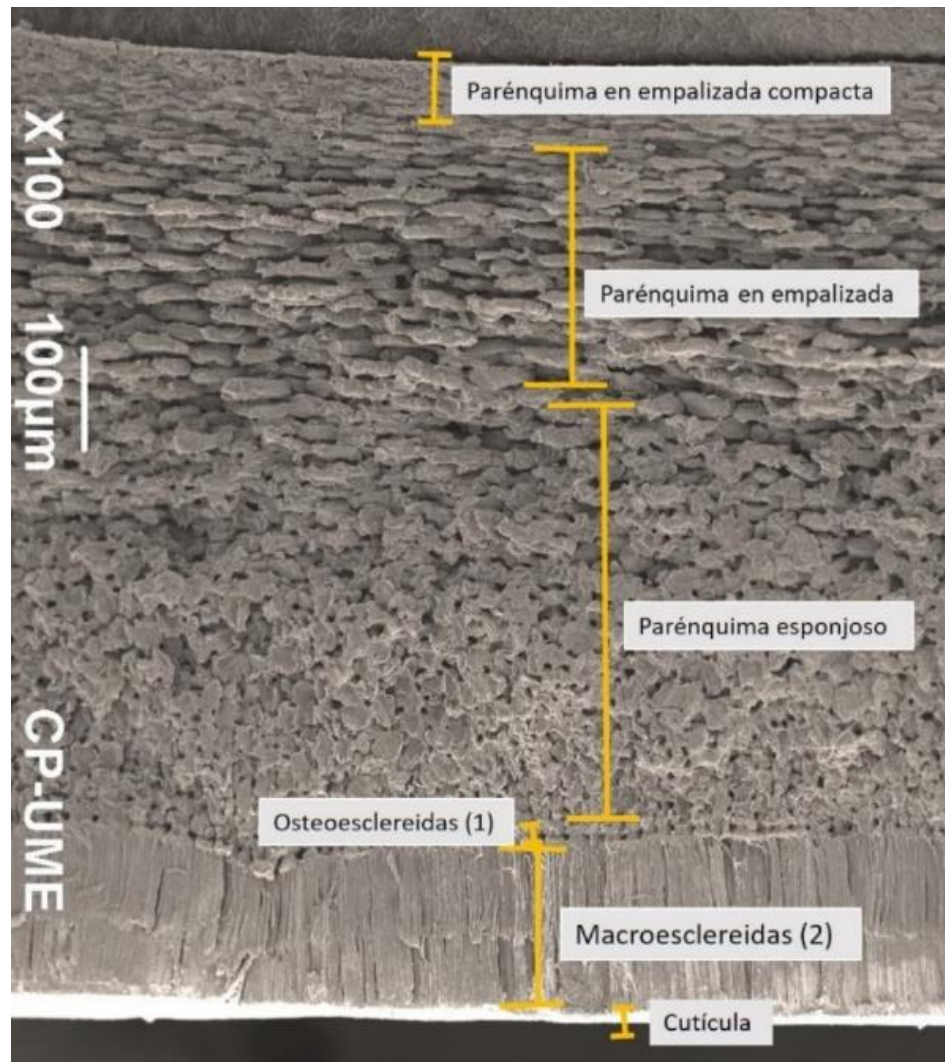


Figura 23. Estructuras de la cubierta seminal de *Enterolobium cyclocarpum*.

1. Cutícula:

La cutícula con una superficie de textura rugosa y presenta agrietamiento tipo piel de cocodrilo, aunque también se aprecian agrietamiento transversal y de esquina, es la capa más delgada de la testa en esta especie (**Figura 24**).

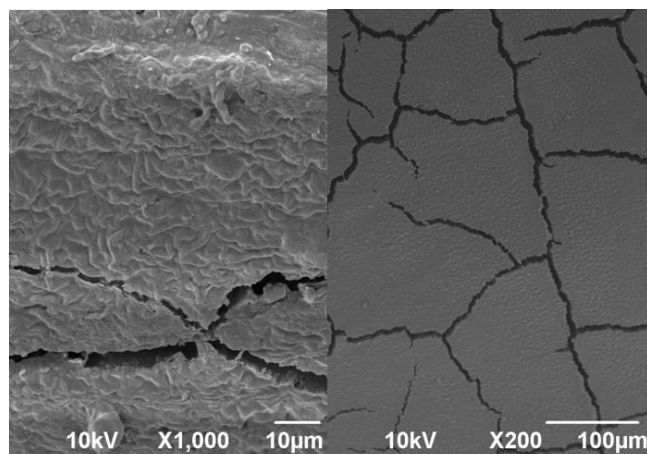


Figura 24. Cutícula de testa de *E. cyclocarpum*.

2. Macroesclereidas (2):

Líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, es posible apreciar dos niveles de estas células empalmadas, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, aunque sea una capa compacta se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la tercera capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 25**).

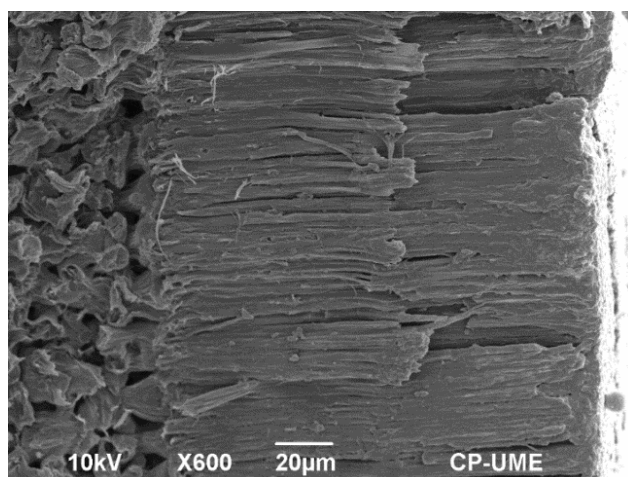


Figura 25. Macroesclereidas de testa de *E. cyclocarpum*.

3. Osteoesclereidas (1):

Una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la quinta capa más gruesa que presenta la especie (**Figura 26**).

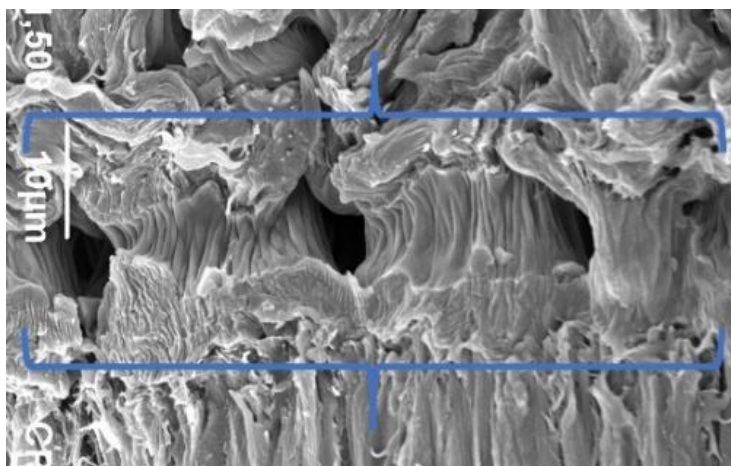


Figura 26. Osteoesclereidas de testa de *E. cyclocarpum*.

4. Parénquima esponjoso:

Es la capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “a una esponja porosa” (**Figura 27**).

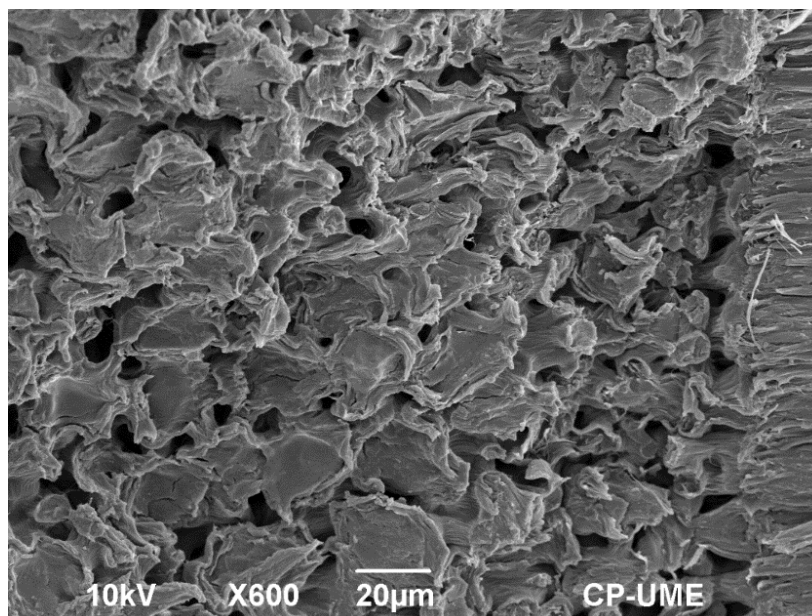


Figura 27. Parénquima esponjoso de testa de *E. cyclocarpum*.

5. Parénquima en empalizada:

Es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, con pequeñas formas alargadas acomodadas horizontalmente como una “pared de ladrillo”, aunque parece estar compacta se logran apreciar espacios vacíos (Figura 28).

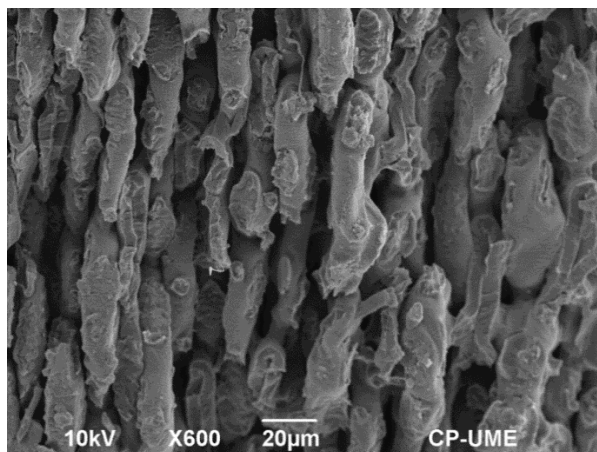


Figura 28. Parénquima en empalizada de testa de *E. cyclocarpum*.

6. Parénquima en empalizada compacta:

Es la cuarta capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, con pequeñas formas alargadas semejantes a “un grano de arroz” acomodadas horizontalmente como una “pared de ladrillo”, es una capa compacta, y la que está más interiormente junto al embrión (Figura 29).

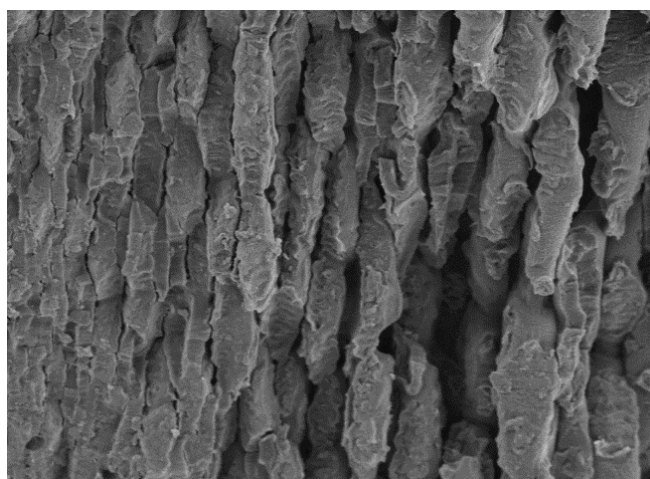


Figura 29. Parénquima en empalizada compacta de testa de *E. cyclocarpum*.

3.5.2 *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb, (1984).

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 30** y de la **Figura 31** a **37** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

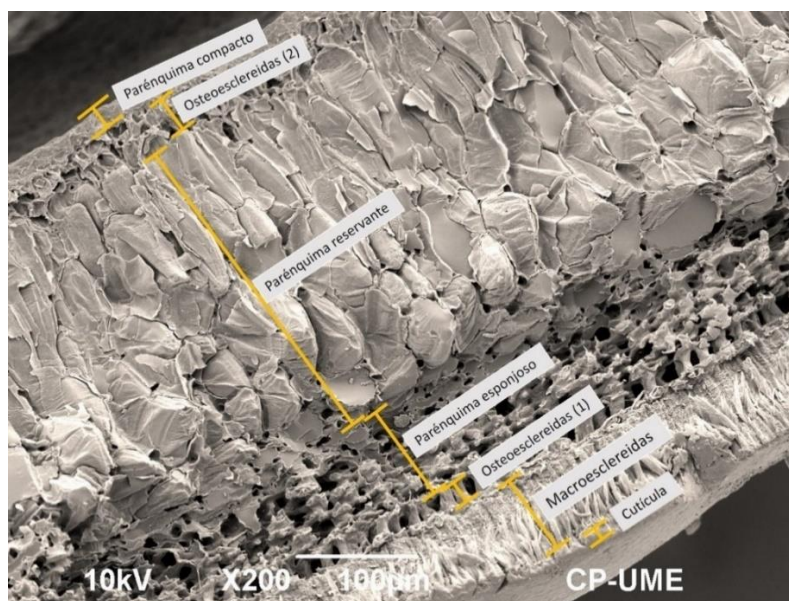


Figura 30. Estructuras de la cubierta seminal de *Enterolobium cyclocarpum* (1983).

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie lisa y con leves hundimientos similar a la superficie de una papa, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 31**).

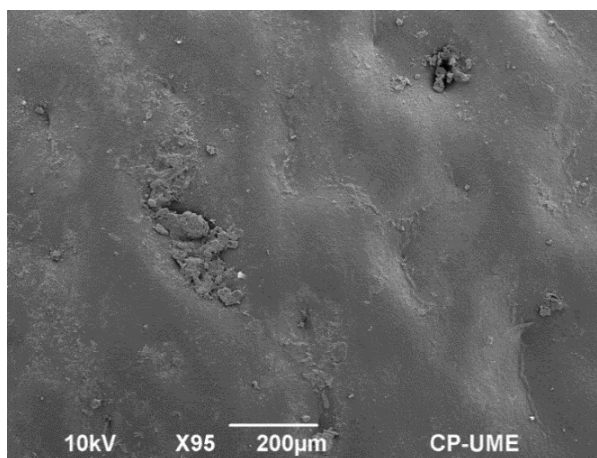


Figura 31. Cubierta seminal de *E. cyclocarpum* (1983).

2. Macroesclereidas (1):

Un nivel de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne” se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la tercera capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 32**).

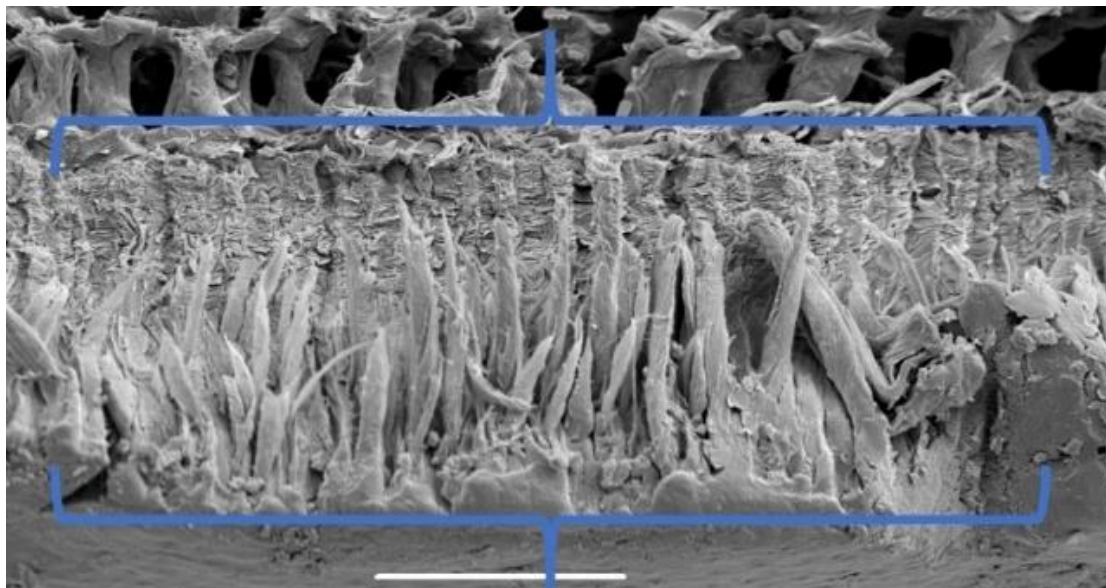


Figura 32. Macroesclereidas de testa de *E. cyclocarpum* (1983).

3. Osteoesclereidas (1):

Una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la quinta capa más gruesa que presenta la especie (**Figura 33**).

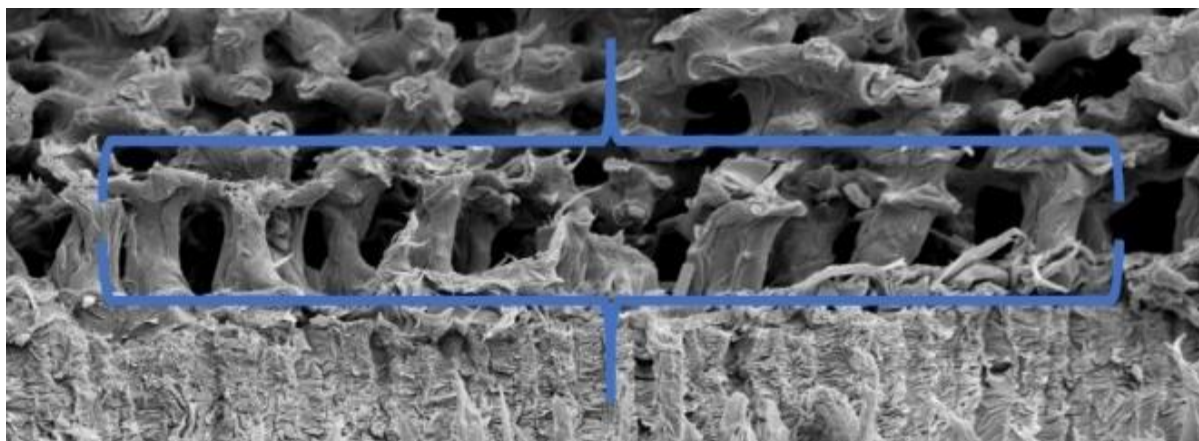


Figura 33. Osteoesclereidas de testa de *E. cyclocarpum* (1983).

4. Parénquima esponjoso:

Es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “una galería de hormigas” (**Figura 34**).

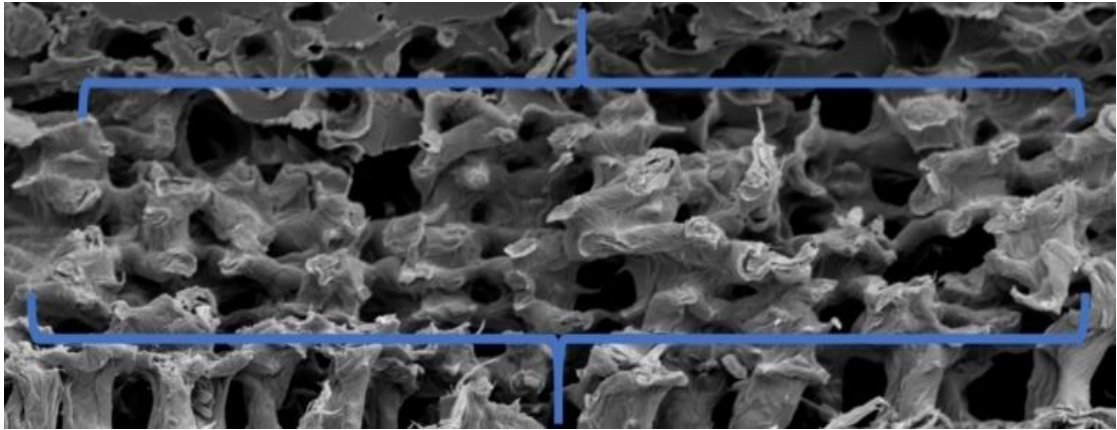


Figura 34. Parénquima esponjoso de testa de *E. cyclocarpum* (1983).

5. Parénquima reservante:

Es la capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja “hojuelas empalmadas”, acomodadas de manera vertical y compactas (**Figura 35**).

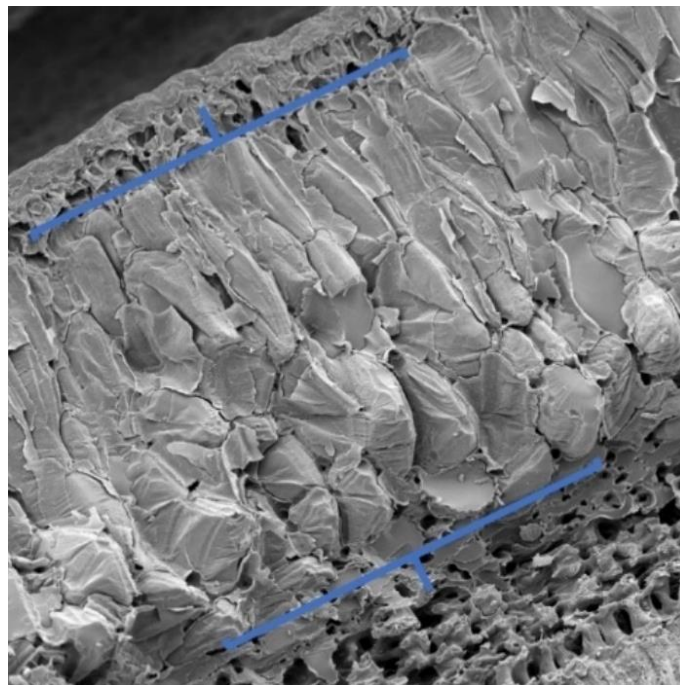


Figura 35. Parénquima reservante de testa de *E. cyclocarpum* (1983).

6. Osteoesclereidas (2):

Son dos niveles de capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, es la segunda capa más cercana al embrión. Esta especie en total presenta tres capas de osteoesclereidas (**Figura 36**).

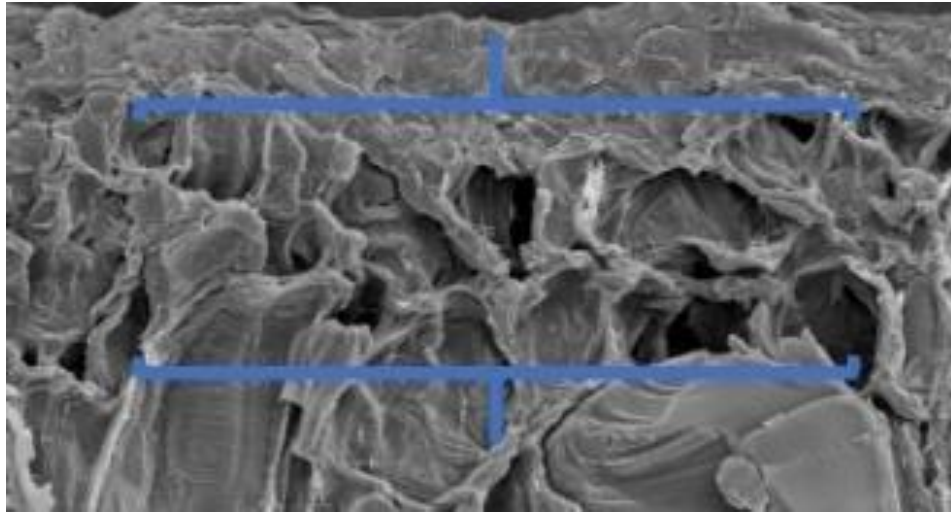


Figura 36. Osteoesclereidas de testa de *E. cyclocarpum* (1983).

7. Parénquima compacto:

Es la sexta capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, con textura ondulada con superficie lisa y compacta, es la que está más cerca del embrión (**Figura 37**).

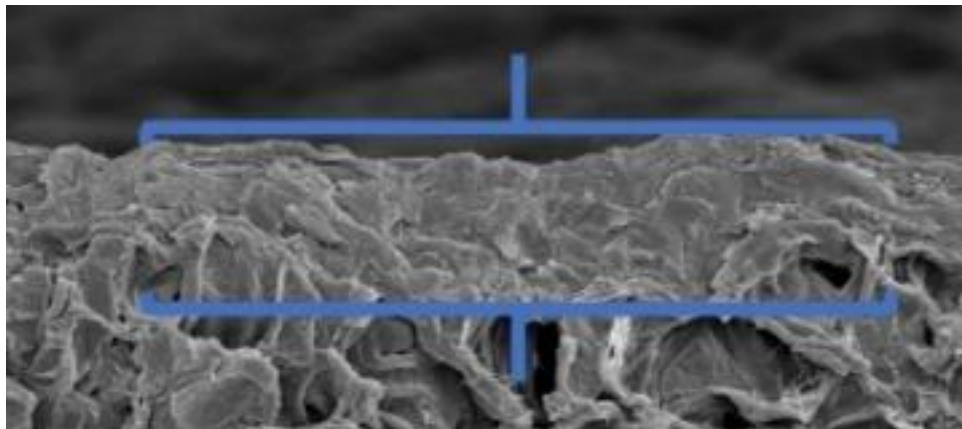


Figura 37. Parénquima compacto de testa de *E. cyclocarpum* (1983).

3.5.3 *Ebenopsis ebano* (Berl.) Britton y Rose.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 38** y de la **Figura 39** a **44** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

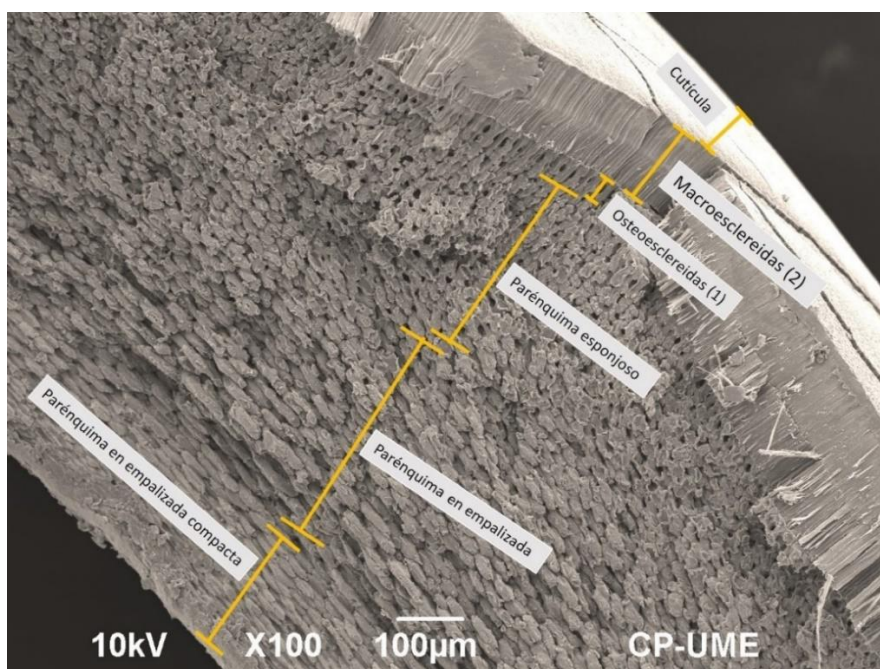


Figura 38. Estructuras de la cubierta seminal de *Ebenopsis ebano*.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie con textura levemente rugosa (piel de naranja) y presenta agrietamientos longitudinales, transversales y de esquina, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 39**).

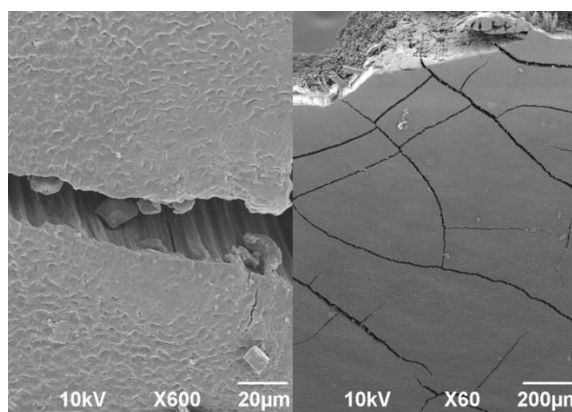


Figura 39. Cutícula de la testa de *E. ebano*.

2. Macroesclereidas (2):

Líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, es posible apreciar dos niveles de estas células empalmadas, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, aunque sea una capa compacta se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la cuarta capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 40**).

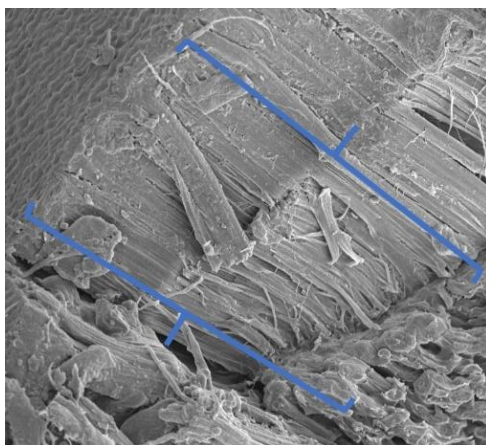


Figura 40. Macroesclereidas de la testa de *E. ebano*.

3. Osteoesclereidas (1):

Una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la sexta capa más gruesa que presenta la especie (**Figura 41**).

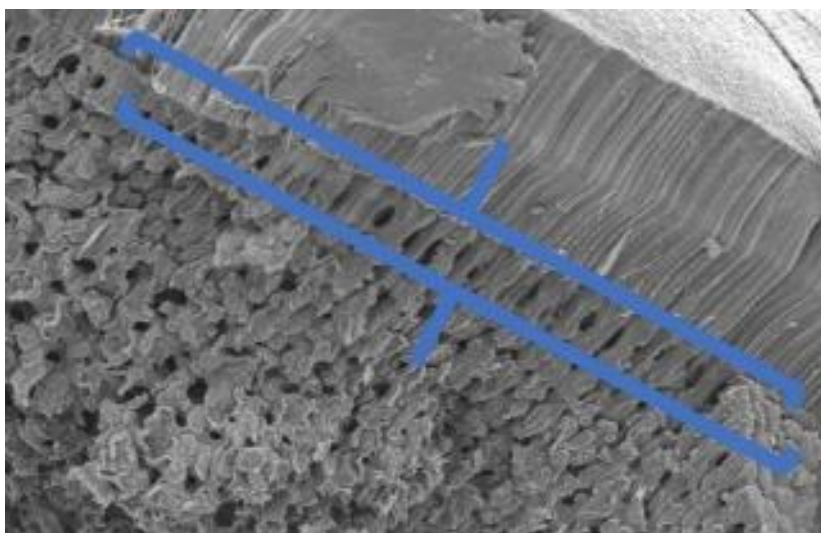


Figura 41. Osteoesclereidas de la testa de *E. ebano*.

4. Parénquima esponjoso:

Es la capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “a una esponja porosa” (**Figura 42**).

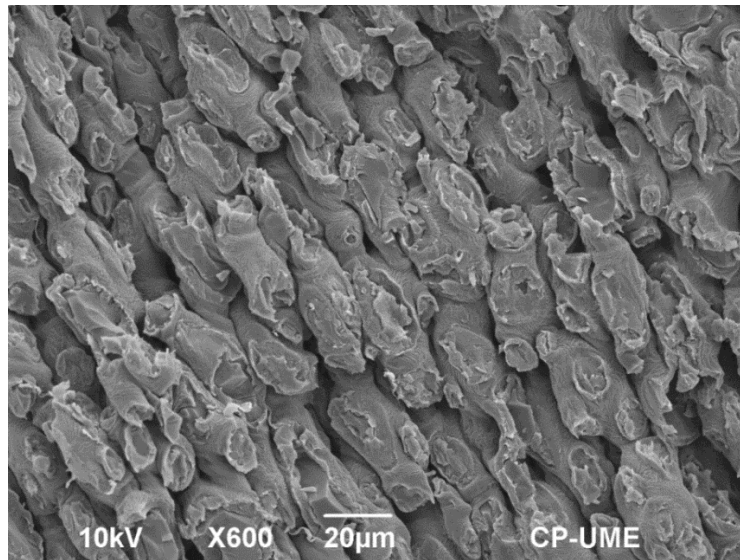


Figura 42. Parénquima esponjoso de la testa de *E. ebano*.

5. Parénquima en empalizada:

Es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, con pequeñas formas alargadas acomodadas horizontalmente como una “pared de ladrillo”, aunque parece estar compacta se logran apreciar espacios vacíos (**Figura 43**).

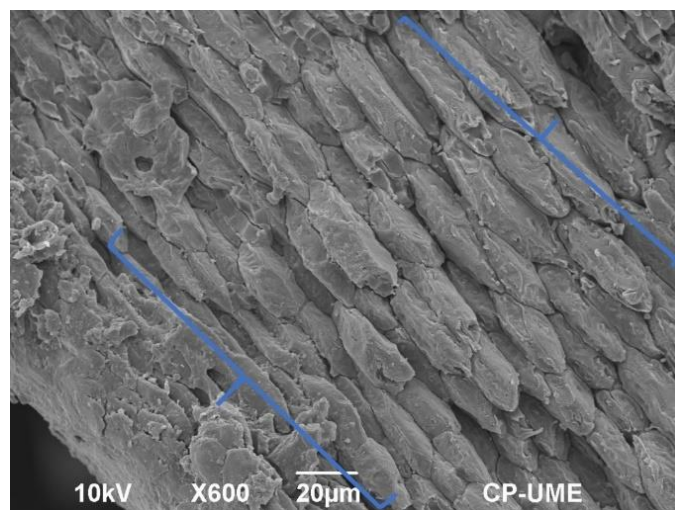


Figura 43. Parénquima en empalizada de la testa de *E. ebano*.

6. Parénquima en empalizada compacta:

Es la quinta capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, capa compacta, y la que está junto al embrión (**Figura 44**).

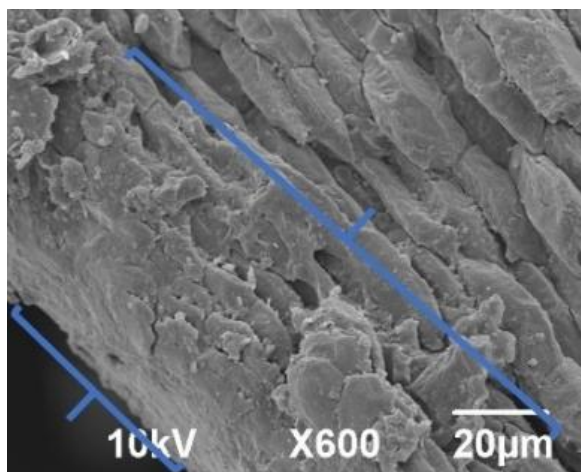


Figura 44. Parénquima en empalizada compacta de la testa de *E. ebano*.

3.5.4 *Prosopis glandulosa* Torr.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 45** y de la **Figura 46** a **51** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

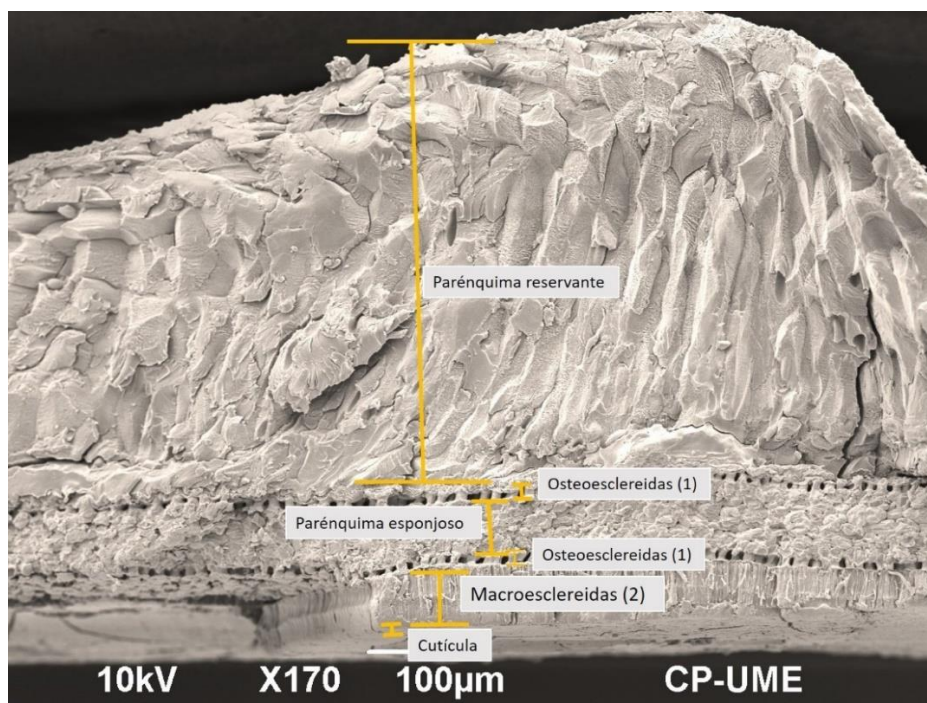


Figura 45. Estructuras de la cubierta seminal de *Prosopis glandulosa*.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie con textura pop-corn y presenta agrietamientos longitudinales, transversales y de esquina, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 46**).

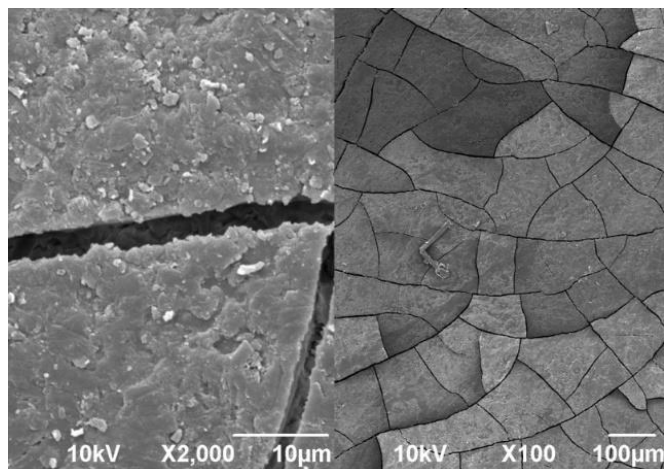


Figura 46. Cutícula de la testa de *P. glandulosa*.

2. Macroesclereidas (2):

Líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, es posible apreciar dos niveles de estas células empalmadas, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, aunque sea una capa compacta se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la tercera capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 47**).

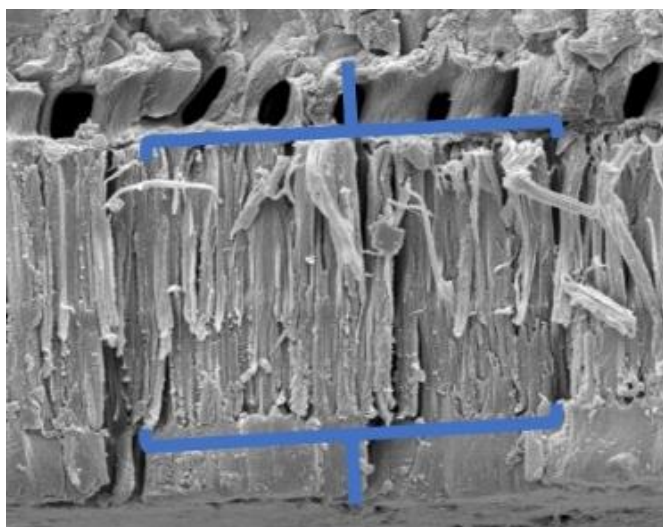


Figura 47. Macroesclereidas de la testa de *P. glandulosa*.

3. Osteoesclereidas (1):

Una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la cuarta capa más gruesa que presenta la especie (**Figura 48**).

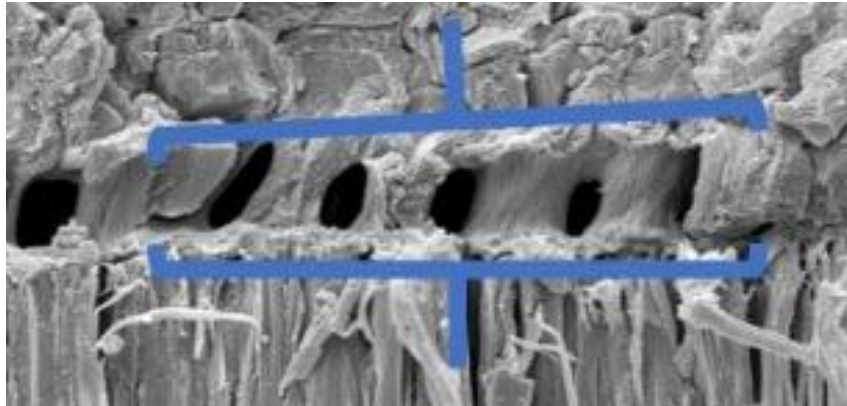


Figura 48. Osteoesclereidas de la testa de *P. glandulosa*.

4. Parénquima esponjoso:

Es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “a una esponja” pero en esta especie se presenta compacta (**Figura 49**).

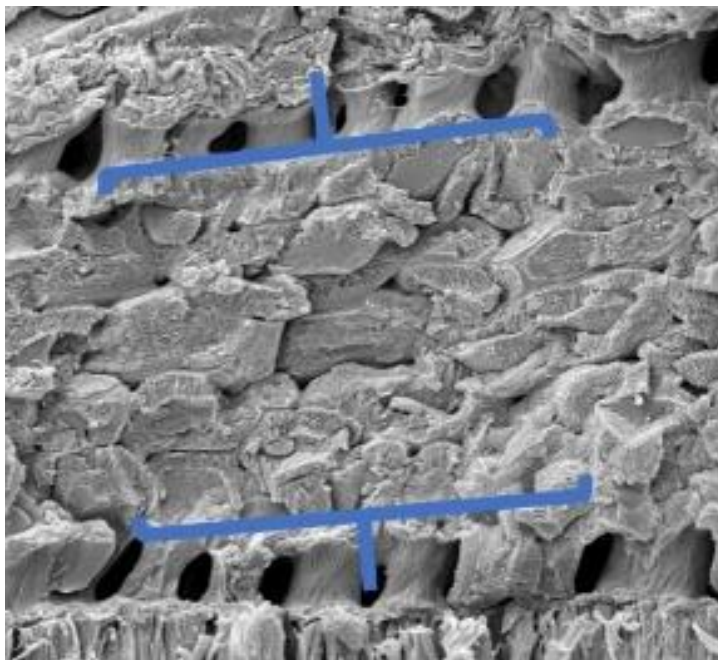


Figura 49. Parénquima esponjoso de la testa de *P. glandulosa*.

5. Osteoesclereidas (1):

Una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la cuarta capa más gruesa que presenta la especie. Esta especie cuenta con un total de dos capas de osteoesclereidas (**Figura 50**).

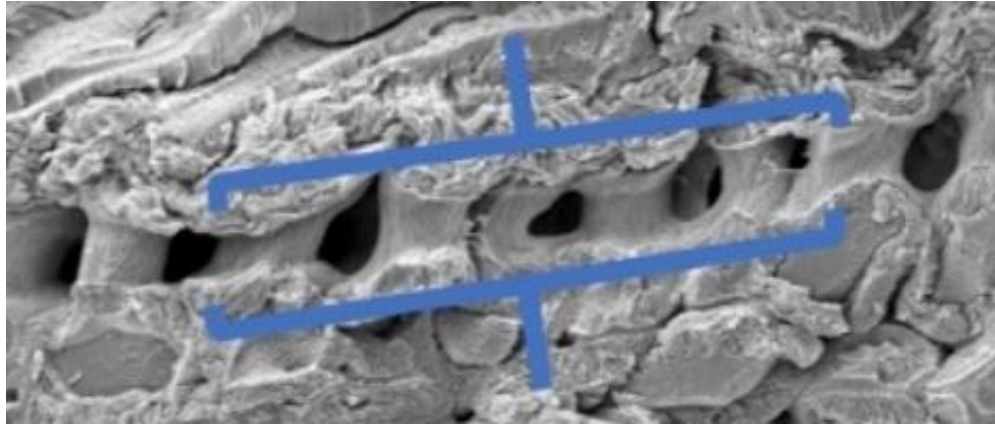


Figura 50. Osteoesclereidas de la testa de *P. glandulosa*.

6. Parénquima reservante:

Es la primera capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja “piedra caliza y dura”, puesta de manera vertical y compactas. Aunque es la capa de mayor grosor, este grosor varío alrededor de los cotiledones esto se debe a la forma de la semilla (**Figura 51**).

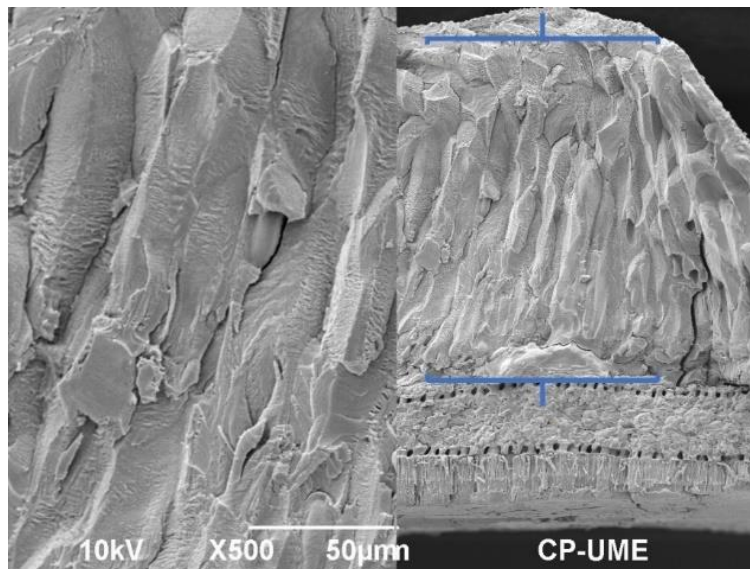


Figura 51. Parénquima reservante de la testa de *P. glandulosa*.

3.5.5 *Prosopis laevigata* (Humb. y Bonpl. ex Willd.) M.C.Johnst.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 52** y de la **Figura 53** a **58** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

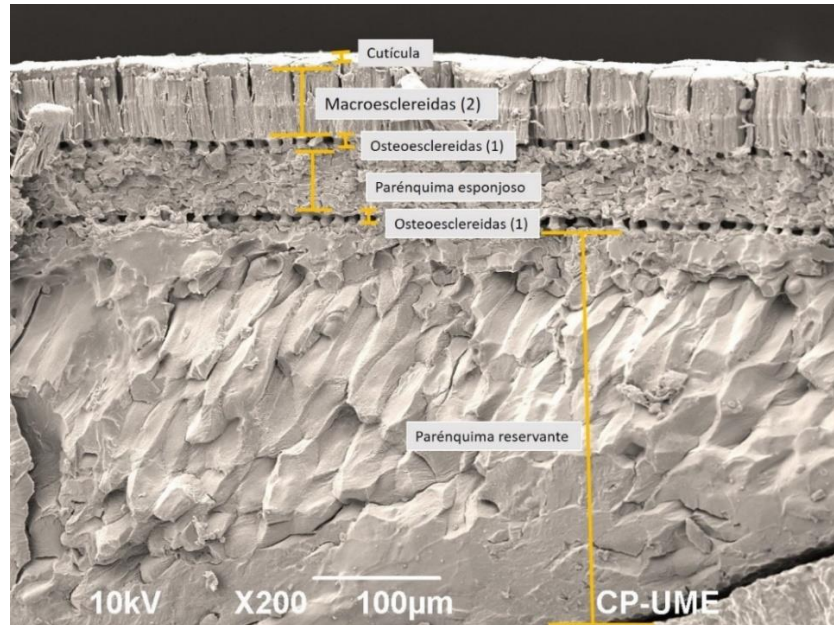


Figura 52. Estructuras de la cubierta seminal de *Prosopis laevigata*.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie con textura de pop-corn y presenta agrietamientos tipo piel de cocodrilo, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 53**).

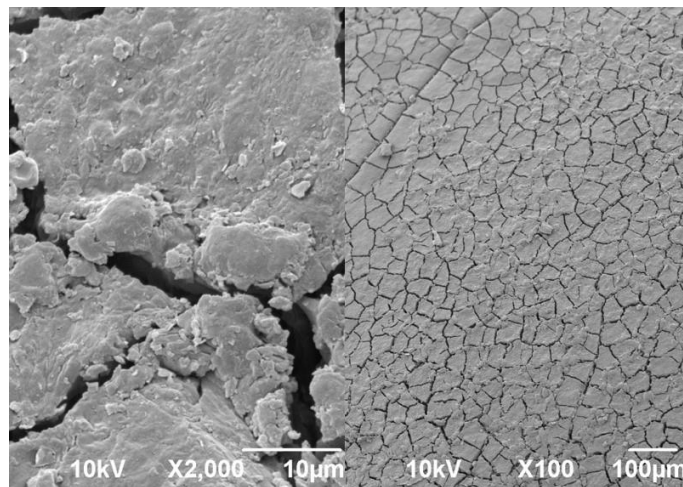


Figura 53. Cutícula de la testa de *P. laevigata*.

2. Macroesclereidas (2):

Líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, es posible apreciar dos niveles de estas células empalmadas, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, aunque sea una capa compacta se logran apreciar pequeños espacios vacíos y la separación del primer nivel por el agrietamiento presente en la cutícula, es la tercera capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 54**).

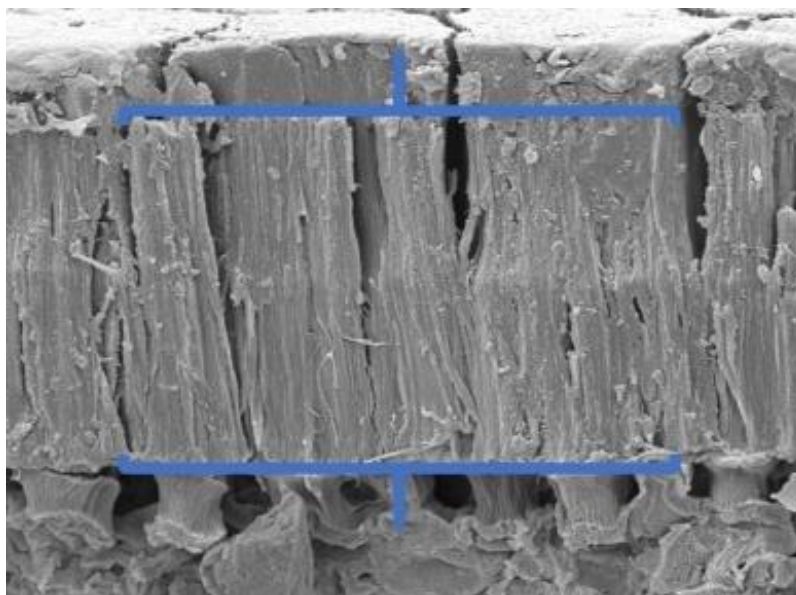


Figura 54. Macroescleeridas de la testa de *P. laevigata*

3. Osteosclereidas (1):

Una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la cuarta capa más gruesa que presenta la especie (**Figura 55**).

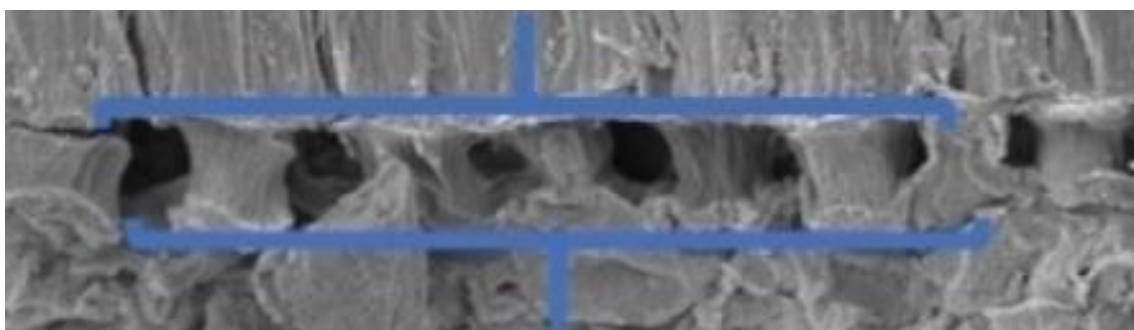


Figura 55. Osteoscleridas de la testa de *P. laevigata*

4. Parénquima esponjoso:

Es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “a una esponja” pero en esta especie se presenta compacta (**Figura 56**).

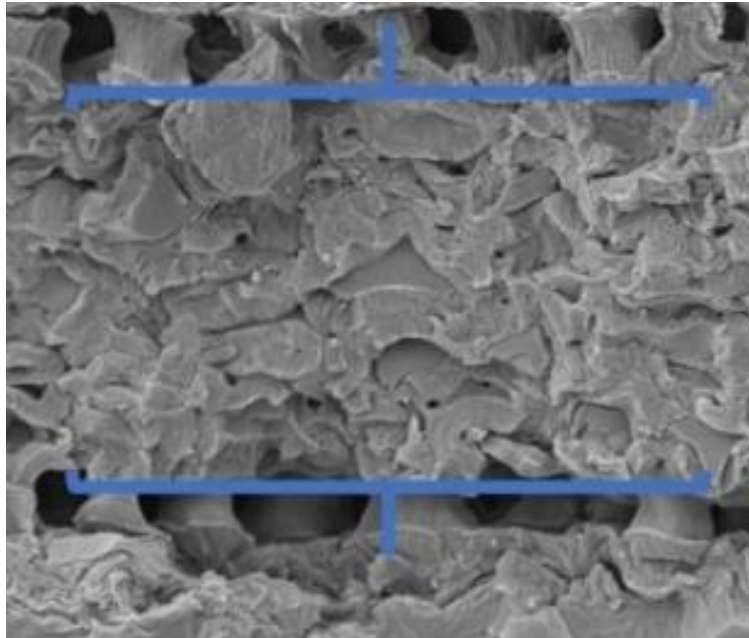


Figura 56. Parénquima esponjoso de la testa de *P. laevigata*.

5. Osteoesclereidas (1):

Una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la cuarta capa más gruesa que presenta la especie. Esta especie cuenta con un total de dos capas de osteoesclereidas (**Figura 57**).

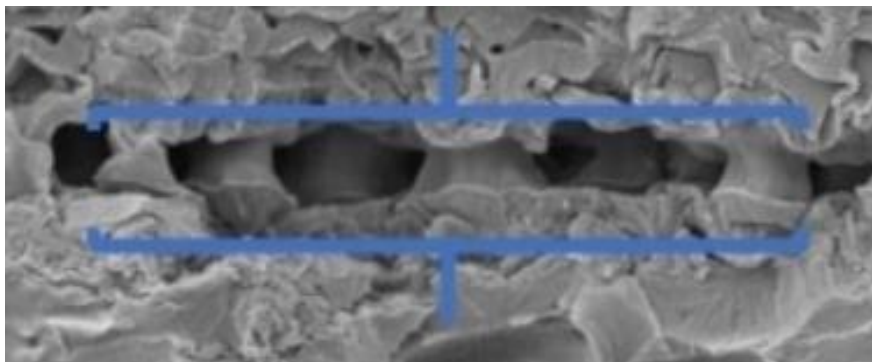


Figura 57. Osteoesclereidas de la testa de *P. laevigata*.

6. Parénquima reservante:

Es la primera capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja “piedra caliza y dura”, puesta de manera vertical y compactas. Aunque es la capa de mayor grosor, este grosor varía alrededor de los cotiledones esto se debe a la forma de la semilla (**Figura 58**).

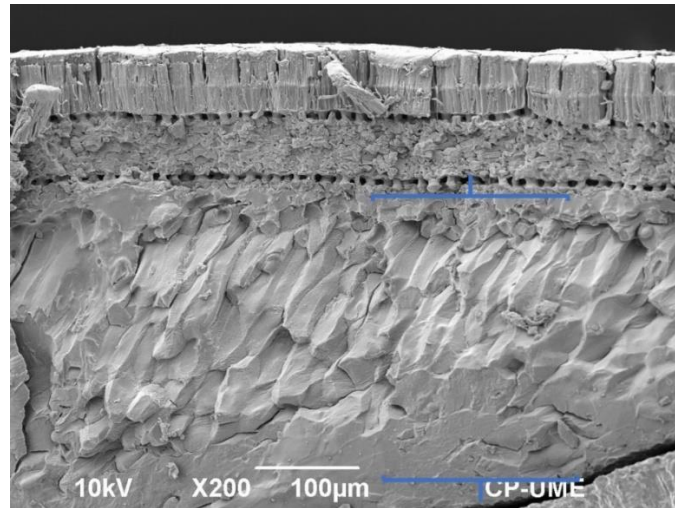


Figura 58. Parénquima reservante de la testa de *P. laevigata*.

3.5.6 *Mimosa caesalpinifolia* Benth.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 59** y de la **Figura 60** a **63** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

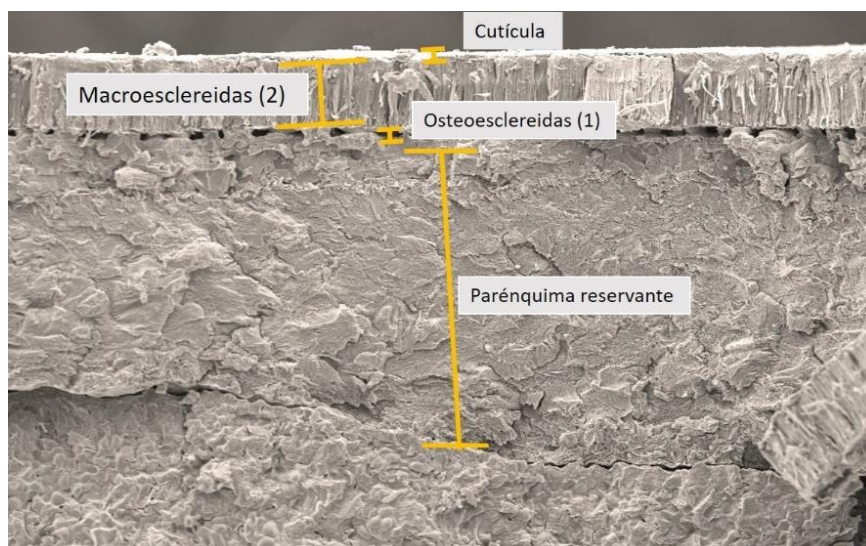


Figura 59. Estructuras de la cubierta seminal de *Mimosa caesalpinifolia*.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie con textura rugosa en forma de mosaico y presenta agrietamientos longitudinales, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 60**).

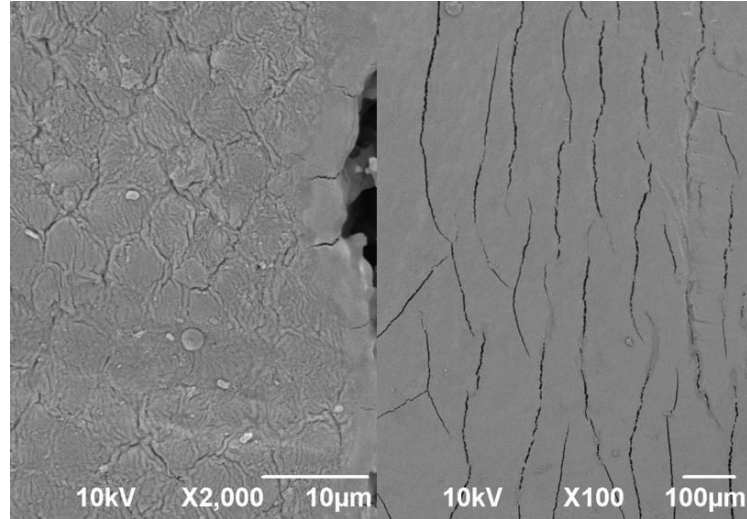


Figura 60. Cutícula de la testa de *M. caesalpiniifolia*.

2. Macroesclereidas (2):

Dos niveles Líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, hay un grosor distinto en ambos niveles, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, aunque sea una capa compacta se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la segunda capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 61**).

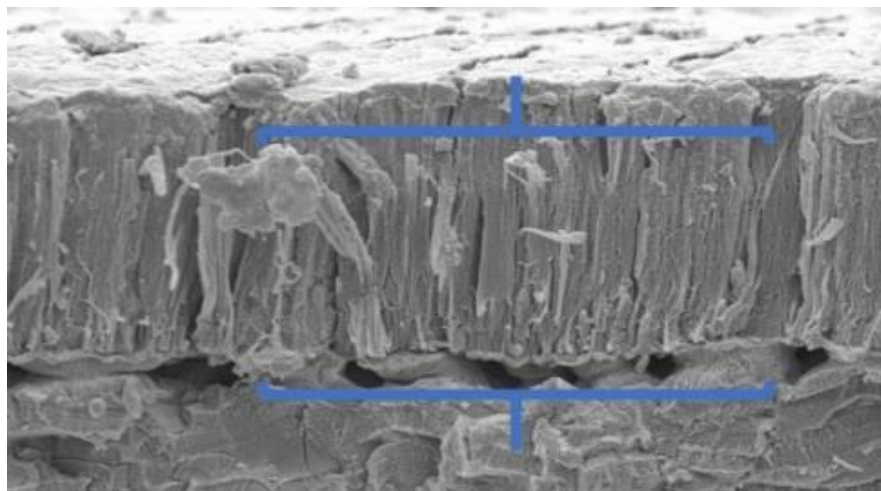


Figura 61. Macroesclereidas de la testa de *M. caesalpiniifolia*.

3. Osteoesclereidas (1):

Una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la tercer capa más gruesa que presenta la especie (**Figura 62**).

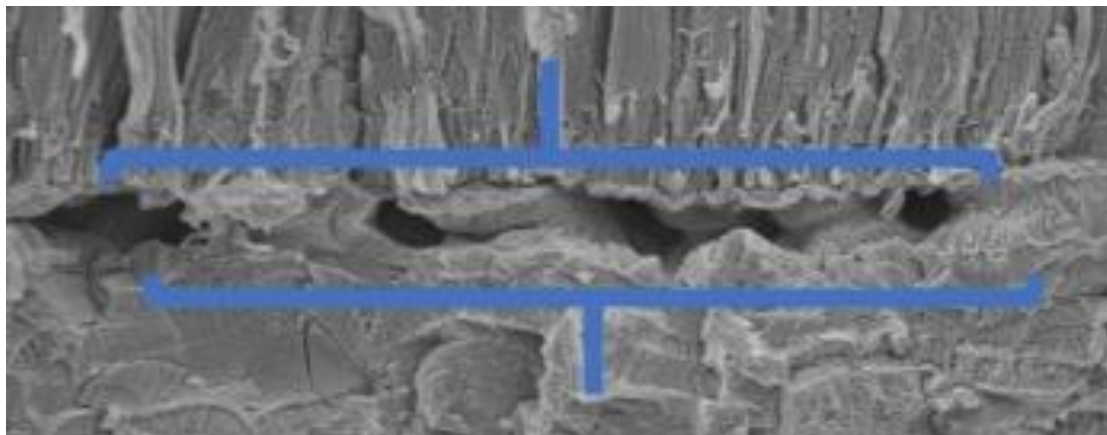


Figura 62. Osteoesclereidas de la testa de *M. caesalpiniifolia*.

4. Parénquima reservante:

Es la capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja “a una roca maciza” (**Figura 63**).

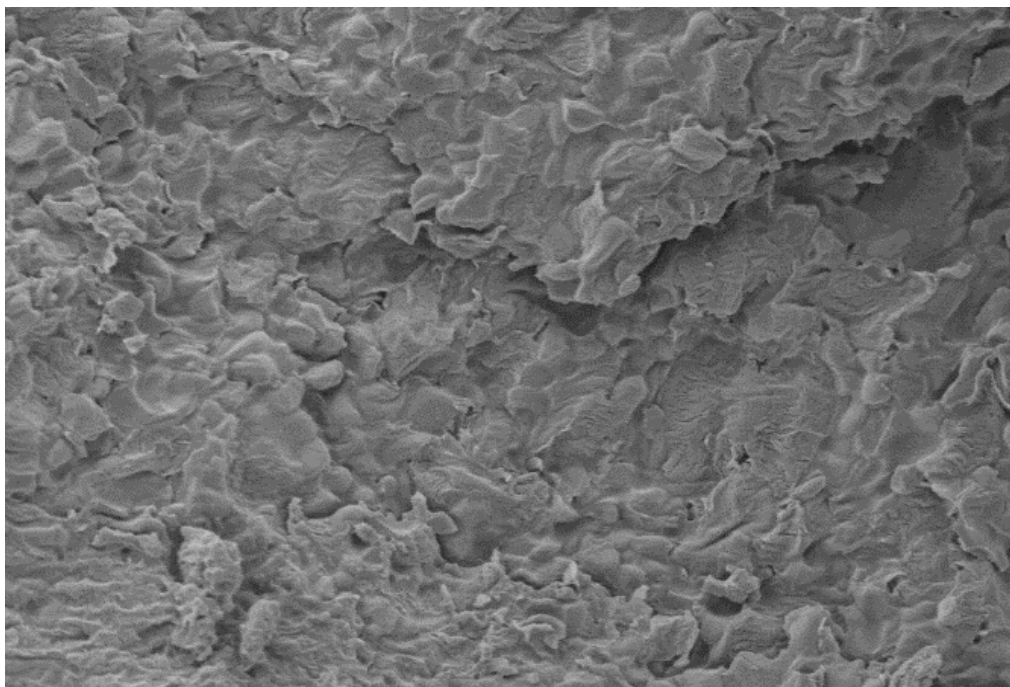


Figura 63. Parénquima reservante de la testa de *M. caesalpiniifolia*.

3.4.7 *Vachellia farnesiana* (L.) Willd. y Arn.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 64** y de la **Figura 65** a **69** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

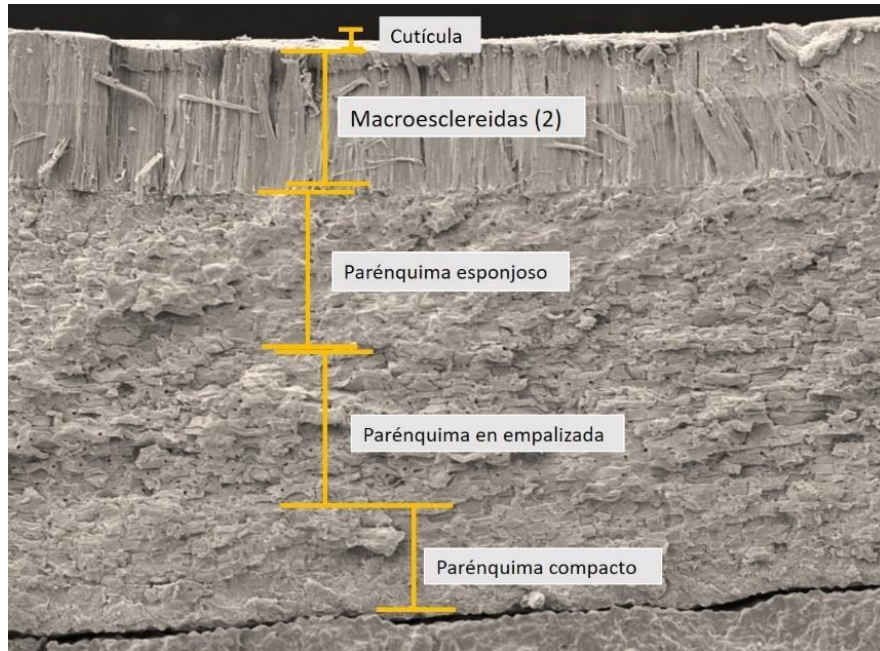


Figura 64. Estructuras de la cubierta seminal de *Vachellia farnesiana*.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie con textura rugosa en y presenta agrietamientos longitudinales y transversales, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 65**).

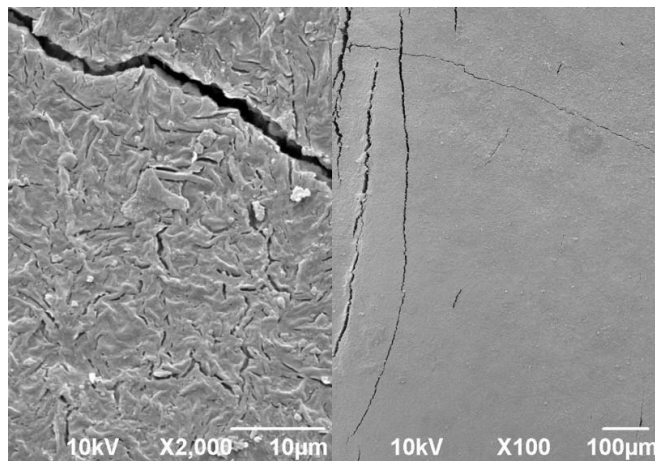


Figura 65. Cutícula de la testa de *V. farnesiana*.

2. Macroesclereidas (2):

Dos niveles de líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, hay un grosor distinto en ambos niveles, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, aunque sea una capa compacta se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 66**).

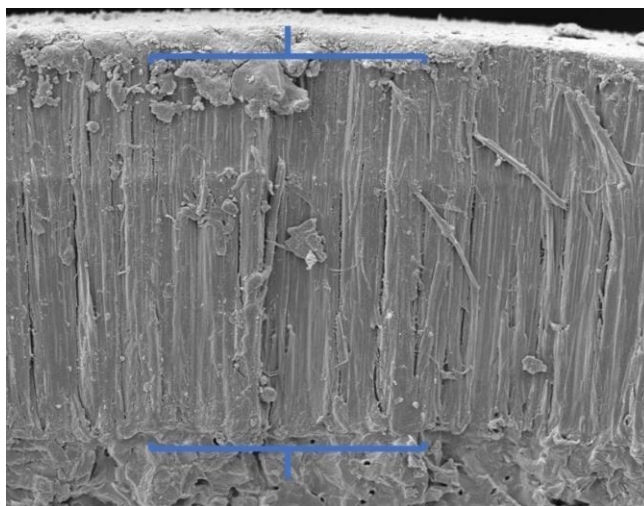


Figura 66. Macroesclereidas de la testa de *V. farnesiana*.

3. Parénquima esponjoso:

Es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “a una esponja” pero en esta especie se presenta compacta (**Figura 67**).

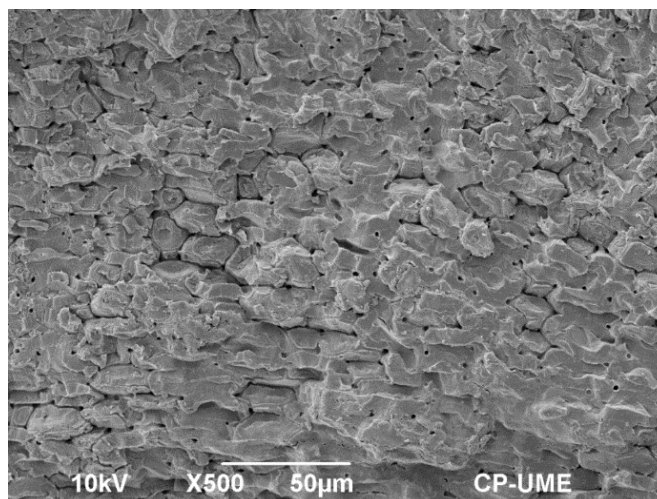


Figura 67. Parénquima esponjoso de la testa de *V. farnesiana*.

4. Parénquima en empalizada:

Es la tercera capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, con pequeñas formas alargadas y compactas acomodadas horizontalmente como una “pared de ladrillo” (**Figura 68**).

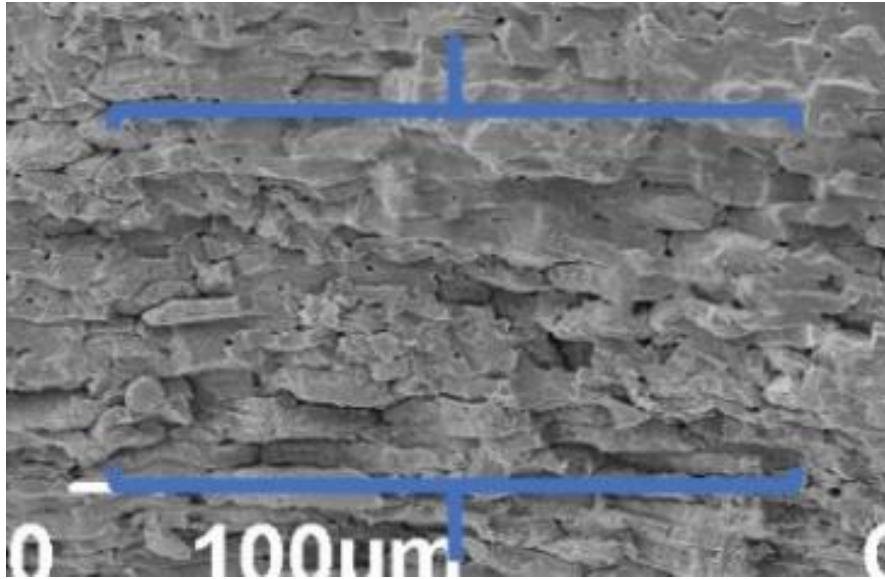


Figura 68. Parénquima en empalizada de la testa de *V. farnesiana*.

5. Parénquima compacto:

Es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, capa compacta, y la que está junto al embrión (**Figura 69**).

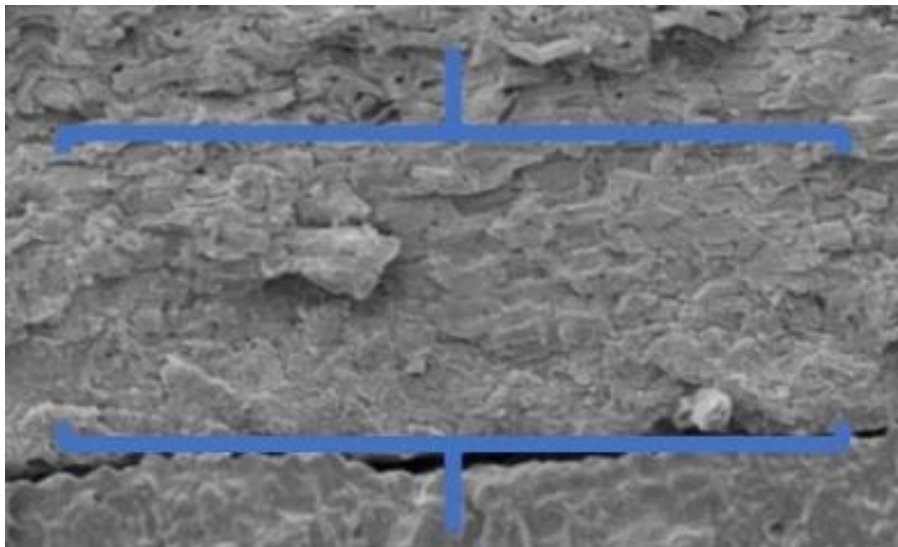


Figura 69. Parénquima compacto de la testa de *V. farnesiana*.

3.4.8 *Vachellia schaffneri* (S. Watson) Seigler y Ebinger.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 70** y de la **Figura 71** a **75** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

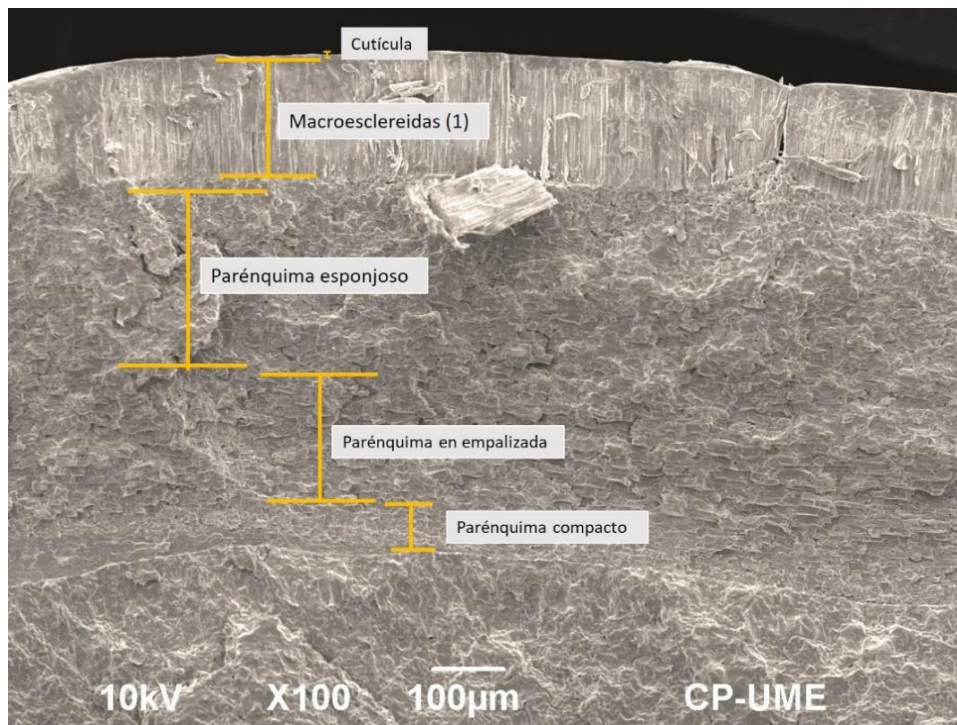


Figura 70. Estructuras de la cubierta seminal de *Vachellia schaffneri*.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie con textura tipo popcorn presenta agrietamientos longitudinales, transversales y de esquina, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 71**).

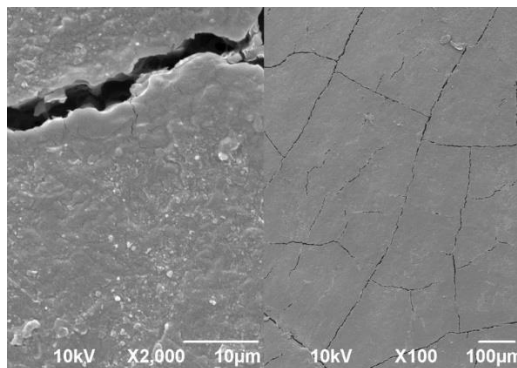


Figura 71. Cutícula de la testa de *V. schaffneri*.

2. Macro esclereidas (1):

Un nivel de líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, es la capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 72**).

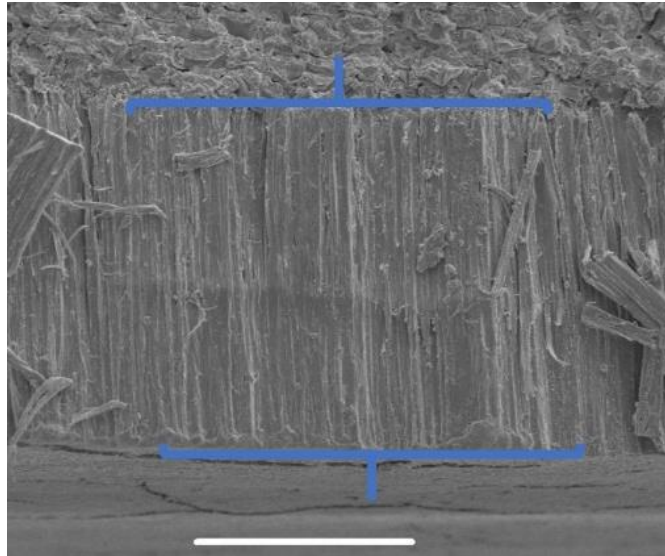


Figura 72. Macro esclereidas de la testa de *V. schaffneri*.

3. Parénquima esponjoso:

Es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “a una esponja” (**Figura 73**).

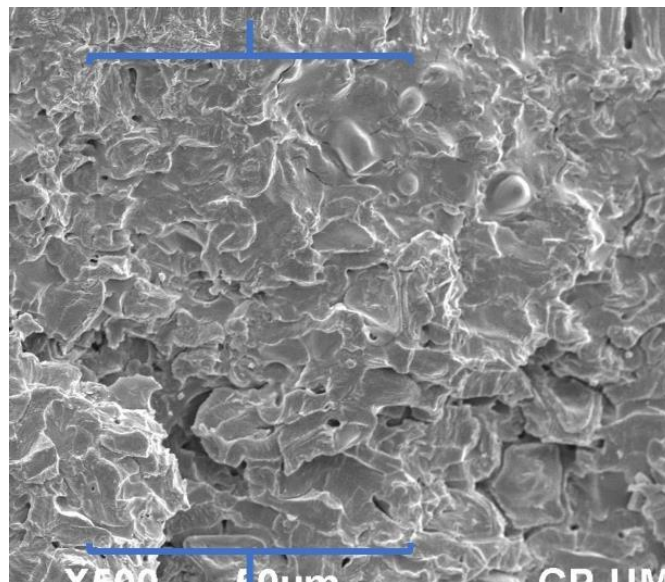


Figura 73. Parénquima esponjoso de la testa de *V. schaffneri*.

4. Parénquima en empalizada:

Es la tercera capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, con pequeñas formas alargadas y compactas acomodadas horizontalmente como una “pared de ladrillo” (**Figura 74**).

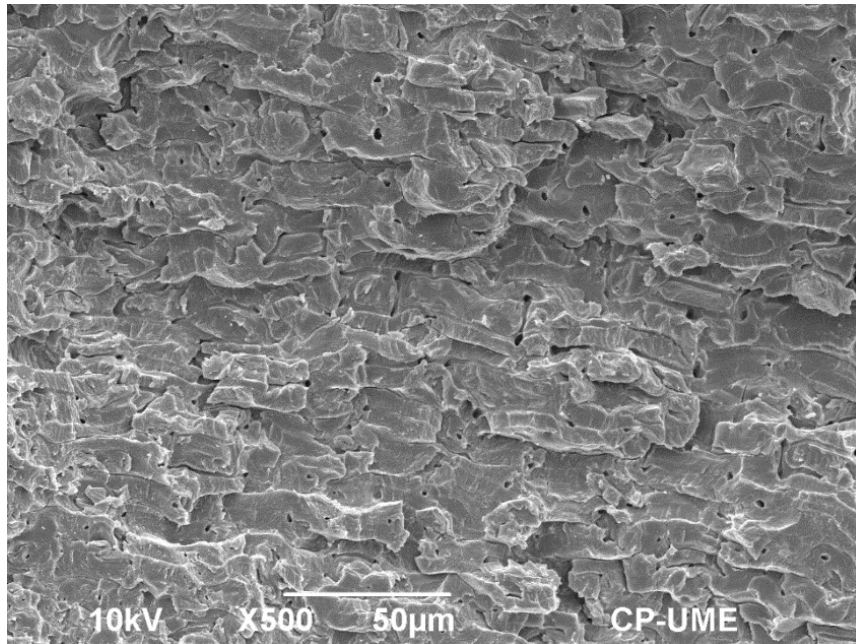


Figura 74. Parénquima en empalizada de la testa de *V. schaffneri*.

5. Parénquima compacto:

Es la cuarta capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, capa compacta, y la que está junto al embrión (**Figura 75**).

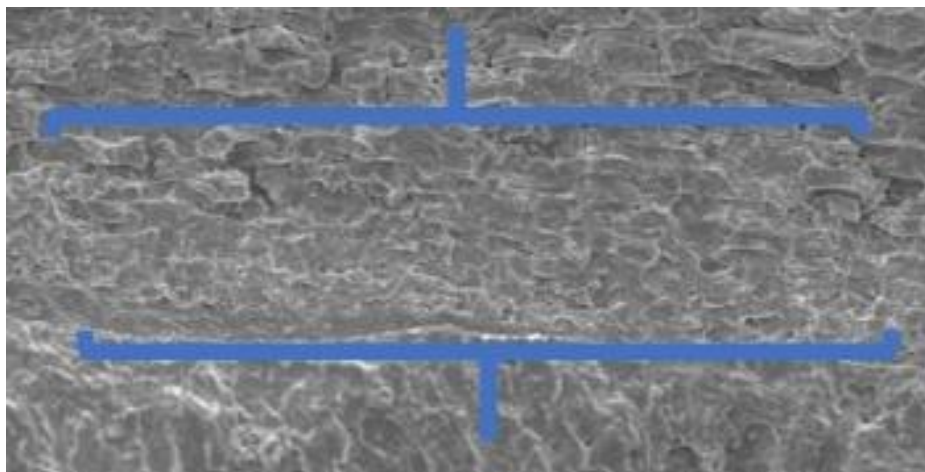


Figura 75. Parénquima compacto de la testa de *V. schaffneri*.

3.4.9 *Vachellia pennatula* (Schltdl. y Cham.) Benth.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 76** y de la **Figura 77** a **81** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

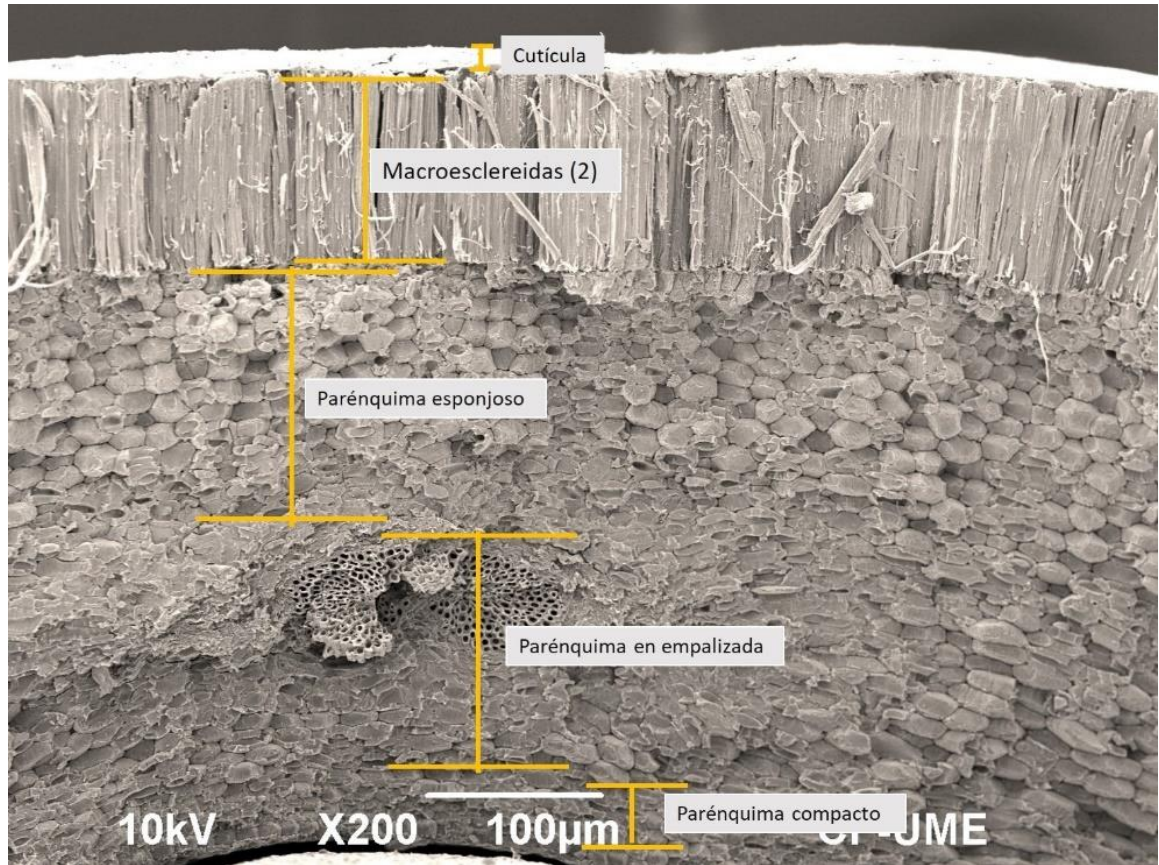


Figura 76. Estructuras de la cubierta seminal de *Vachellia pennatula*.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie con textura tipo popcorn presenta agrietamientos longitudinales, transversales y de esquina, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 77**).

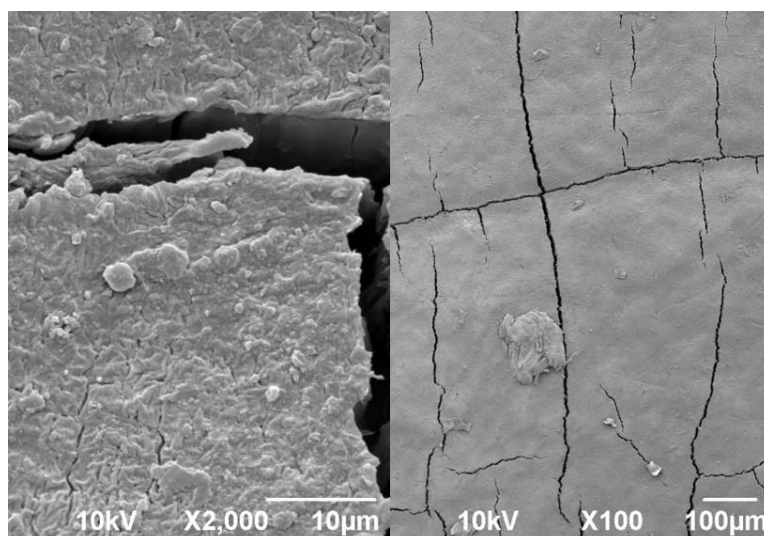


Figura 77. Cutícula de la testa de *V. pennatula*.

2. Macroesclereidas (2):

Dos niveles de líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, hay un grosor distinto en ambos niveles, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, aunque sea una capa compacta se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la segunda capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 78**).

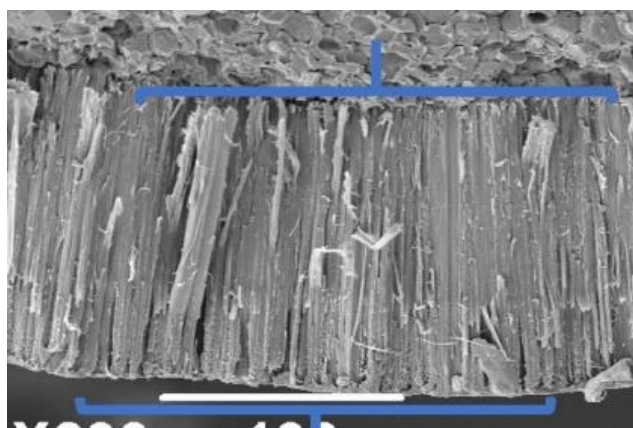


Figura 78. Macroesclereidas de la testa de *V. pennatula*.

3. Parénquima esponjoso:

Es la capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “pelotitas compactas” pero en esta especie se presenta compacta (**Figura 79**).

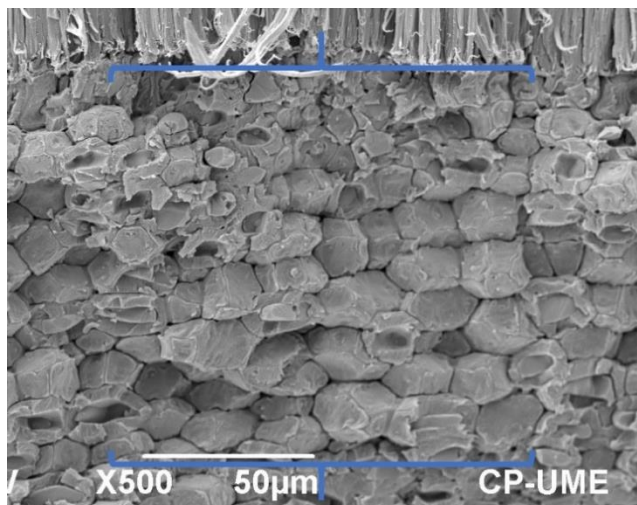


Figura 79. Parénquima esponjoso de la testa de *V. pennatula*.

4. Parénquima en empalizada:

Es la tercera capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, con pequeñas formas alargadas y compactas acomodadas horizontalmente como una “pared de ladrillo” (**Figura 80**).

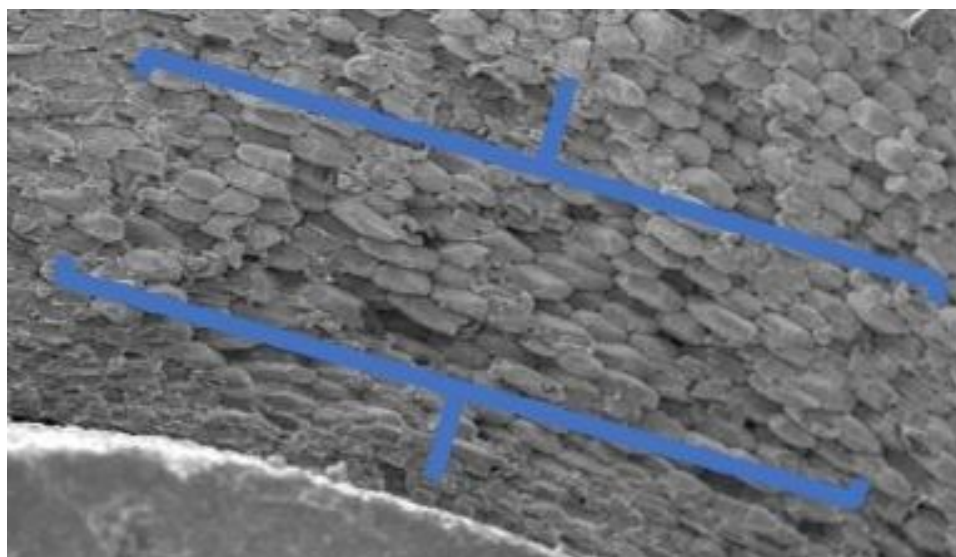


Figura 80. Parénquima en empalizada de la testa de *V. pennatula*.

5. Parénquima compacto:

Es la cuarta capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, capa con estructura de bolitos compactas, y la que está junto al embrión (**Figura 81**).

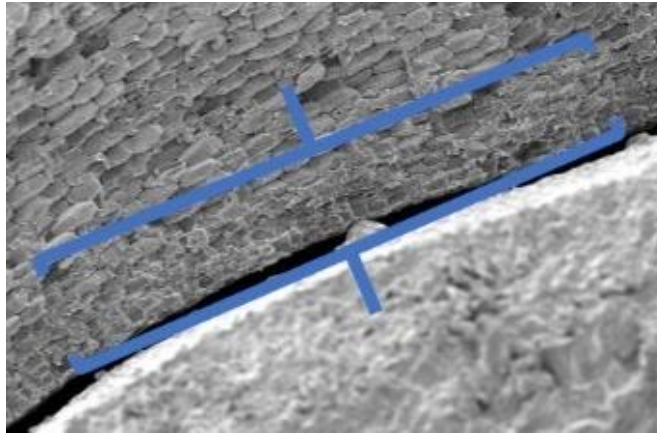


Figura 81. Parénquima compacto de la testa de *V. pennatula*.

3.4.10 *Erythrina coralloides* DC. 1825

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 82** y de la **Figura 83** a **86** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

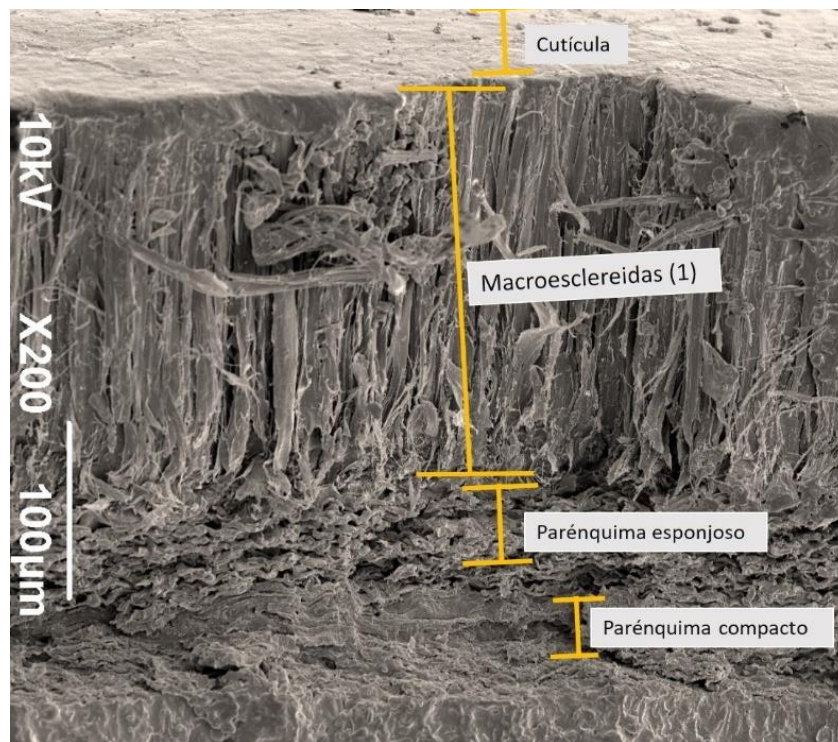


Figura 82. Estructuras de la cubierta seminal de *Erythrina coralloides*.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie lisa con textura levemente accidentada, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 83**).

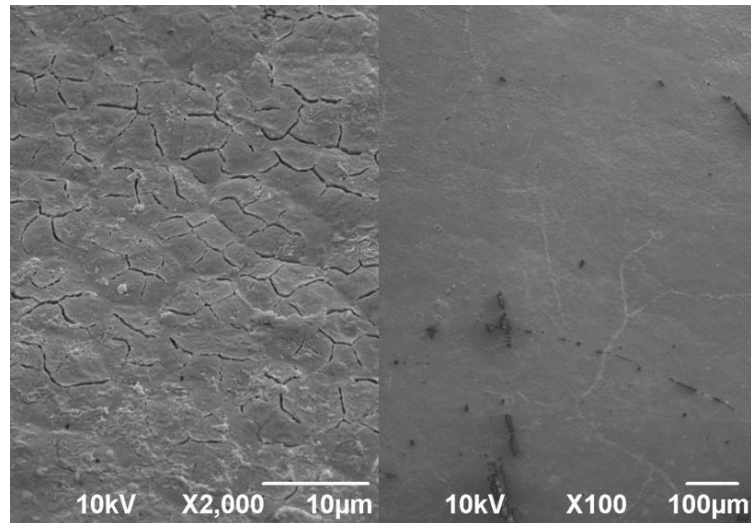


Figura 83. Cutícula de la testa de *E. coralloides*

2. Macroesclereidas (1):

Un nivel de líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, es la capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 84**).

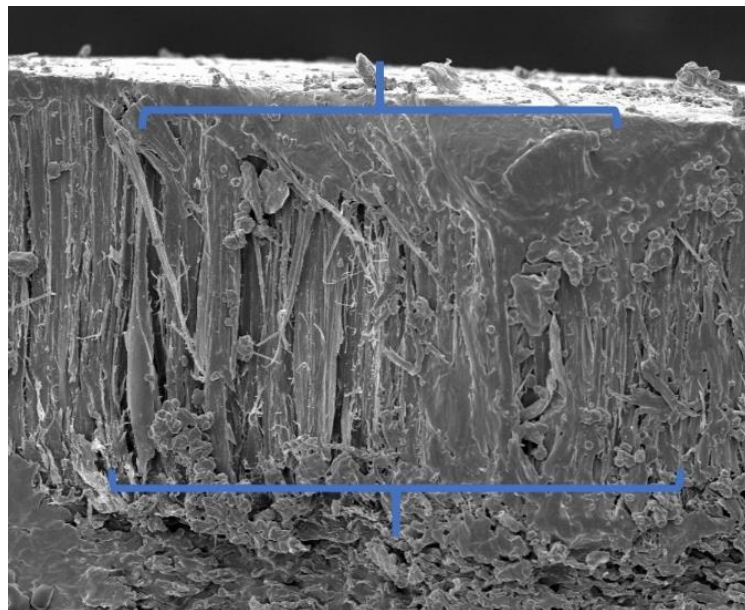


Figura 84. Macroesclereidas de la testa de *E. coralloides*.

3. Parénquima esponjoso:

Es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “a una esponja” (**Figura 85**).

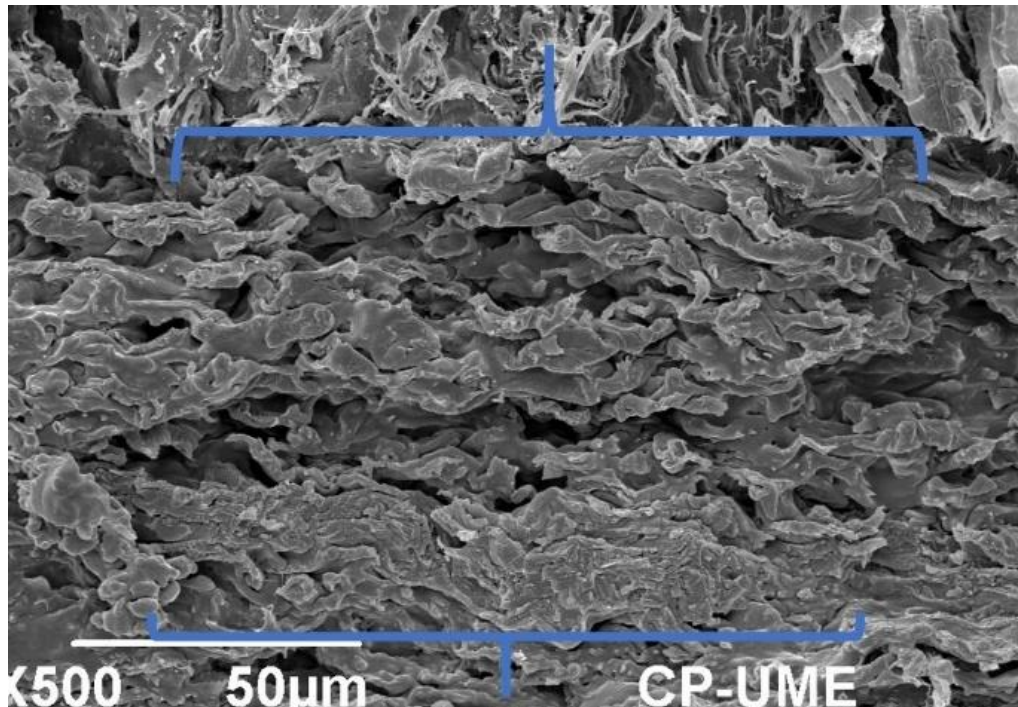


Figura 85. Parénquima esponjoso de la testa de *E. coralloides*.

4. Parénquima compacto:

Es la tercera capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, capa compacta, y la que está junto al embrión (**Figura 86**).

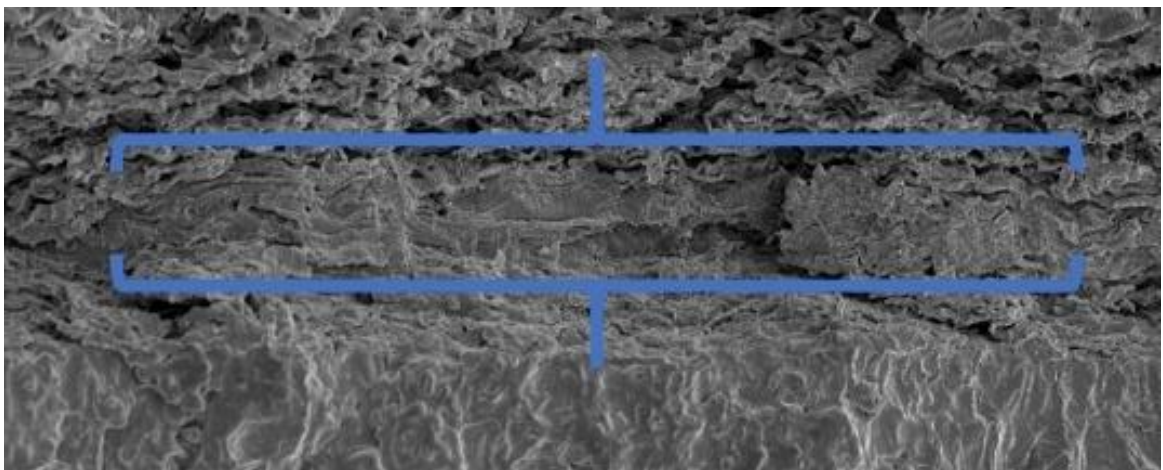


Figura 86. Parénquima compacto de la testa de *E. coralloides*.

3.4.11 *Mucuna* sp.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 87** y de la **Figura 88** a **91** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

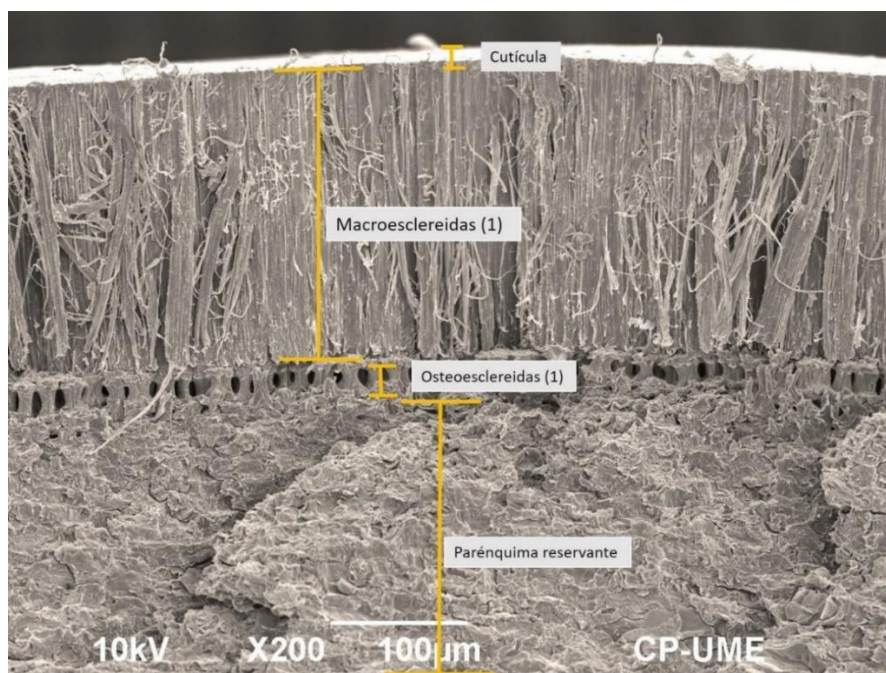


Figura 87. Estructuras de la cubierta seminal de *Mucuna* sp.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie lisa con textura agrietada y presenta agrietamientos longitudinales, transversales y de esquina, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 88**).

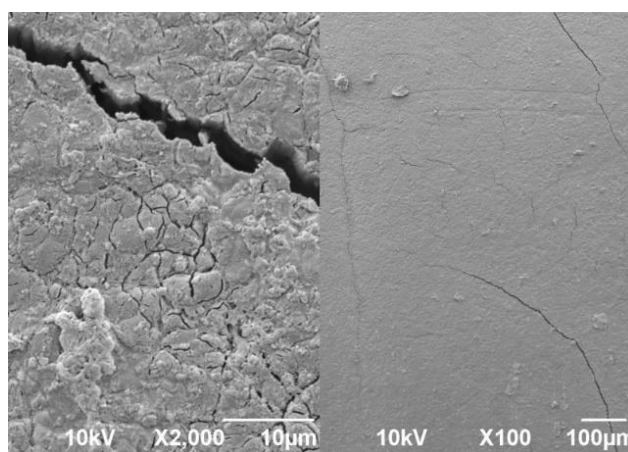


Figura 88. Cutícula de la testa de *Mucuna* sp

2. Macroesclereidas (1):

Un nivel de líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, es la capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 89**).

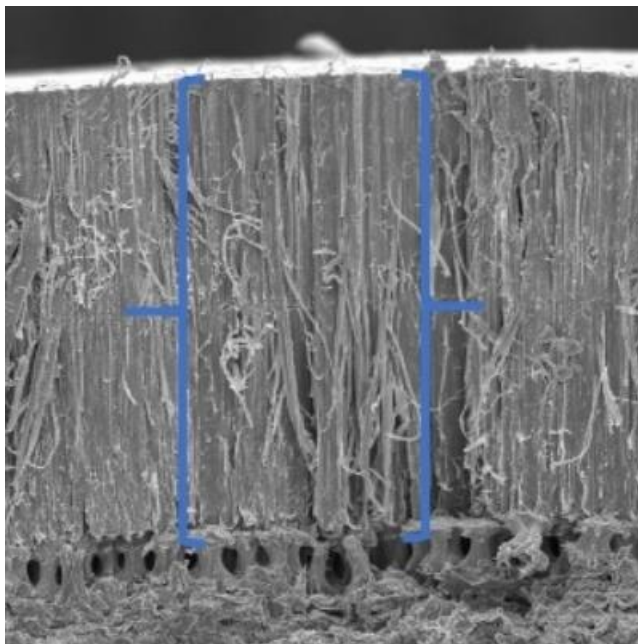


Figura 89. Macroesclereidas de la testa de *Mucuna* sp.

3. Osteoesclereidas (1):

Una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la tercer capa más gruesa que presenta la especie (**Figura 90**).

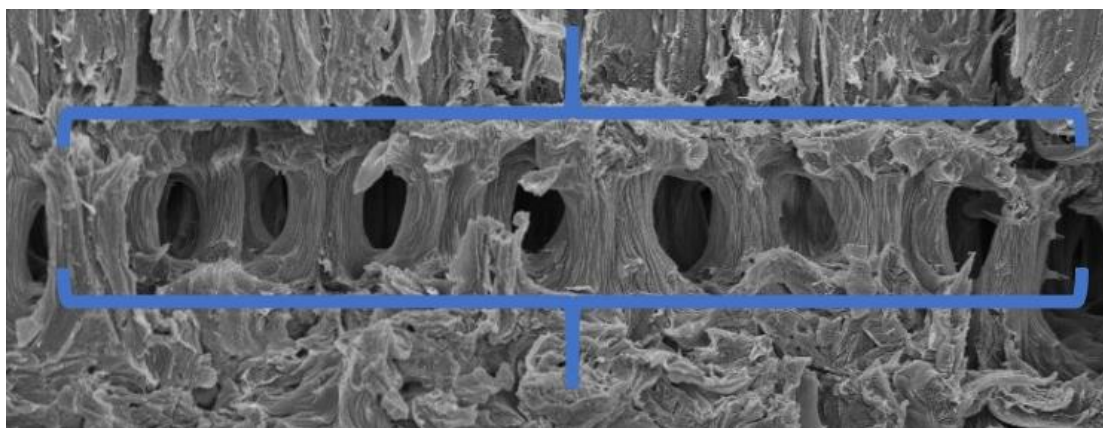


Figura 90. Osteoesclereidas de la testa de *Mucuna* sp.

4. Parénquima reservante:

Es la capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja “piedra caliza y dura”, puesta de manera vertical y compactas. Aunque este grosor puede variar alrededor de los cotiledones esto se debe a la forma de la semilla (**Figura 91**).

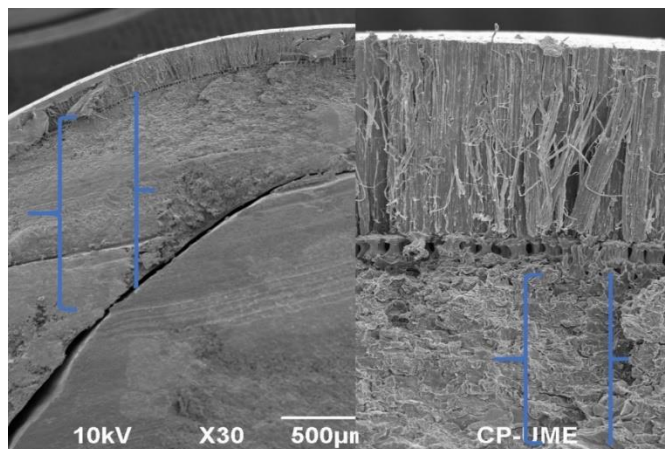


Figura 91. Parénquima reservante de la testa de *Mucuna* sp.

3.4.12 *Lupinus montanus* Kunth.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 92** y de la **Figura 93** a **96** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

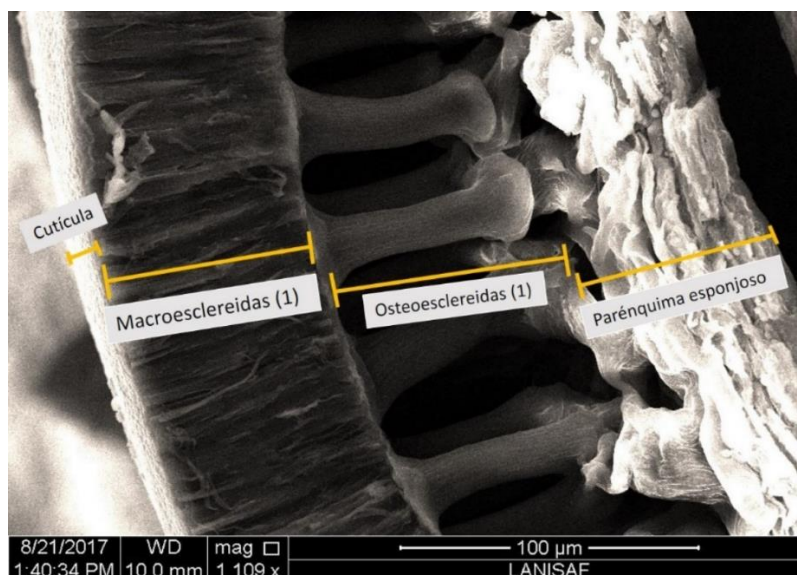


Figura 92. Estructuras de la cubierta seminal de *Lupinus montanus*.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie lisa con pequeñas formas semicirculares aglomeradas, es la capa celular más delgada de la testa (Figura 93).

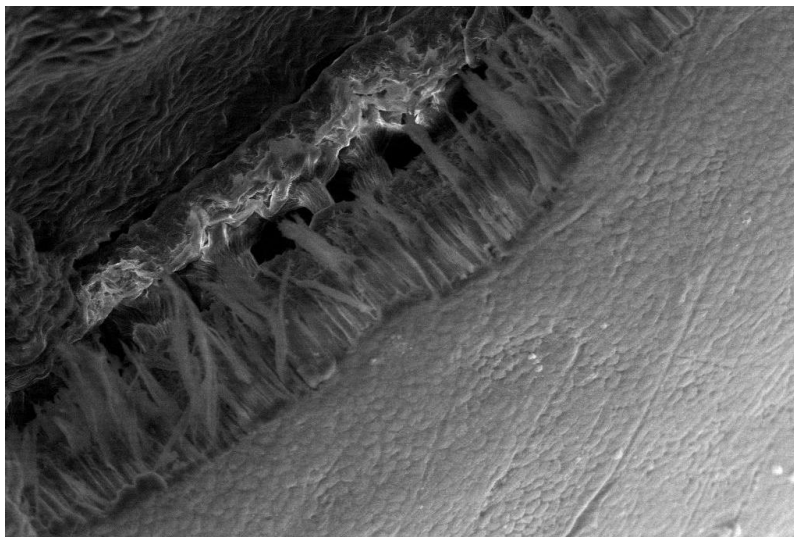


Figura 93. Cutícula de la testa de *L. montanus*.

2. Macro esclereidas (1):

Un nivel de líneas de células alargadas y compactas acomodadas verticalmente, al verlas con detalle parecen ser huecas, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, es la capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (Figura 94).

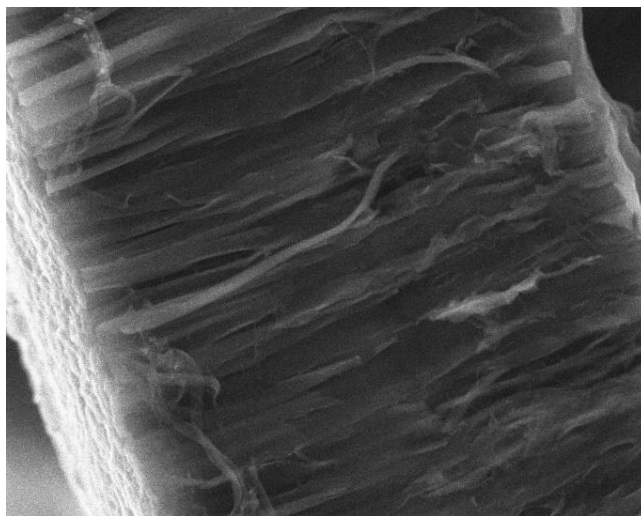


Figura 94. Macro esclereidas de la testa de *L. montanus*.

3. Osteoesclereidas (1):

Una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados los extremos, acomodado en un solo nivel, es la segunda capa de mayor grosor. Que observándolas a detalle en otras imágenes obtenidas también son huecas (**Figura 95**).

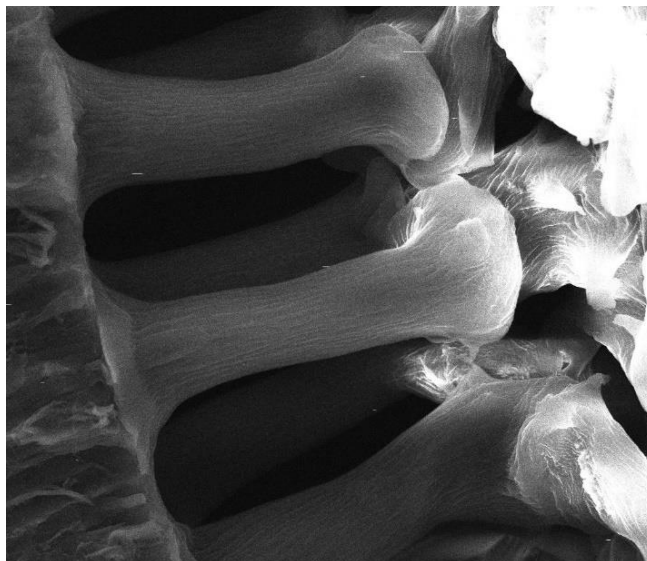


Figura 95. Osteoesclereidas de la testa de *L. montanus*.

4. Parénquima esponjoso:

Es la tercera capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “hojuelas empalmadas” y compactas, que está junto al embrión (**Figura 96**).

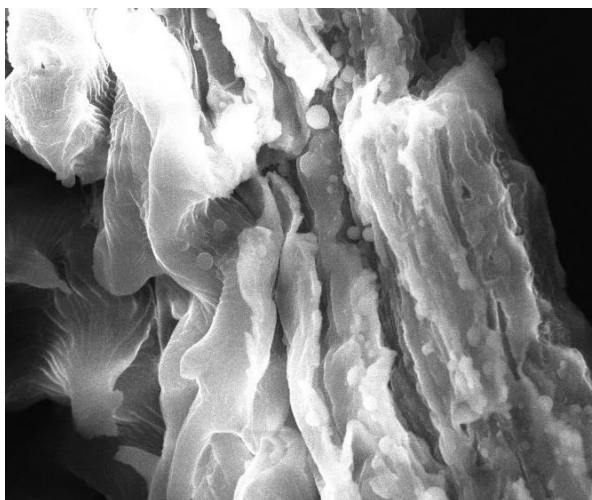


Figura 96. Parénquima esponjoso de la testa de *L. montanus*.

3.4.13 *Lupinus* sp.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 97** y de la **Figura 98** a **101** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

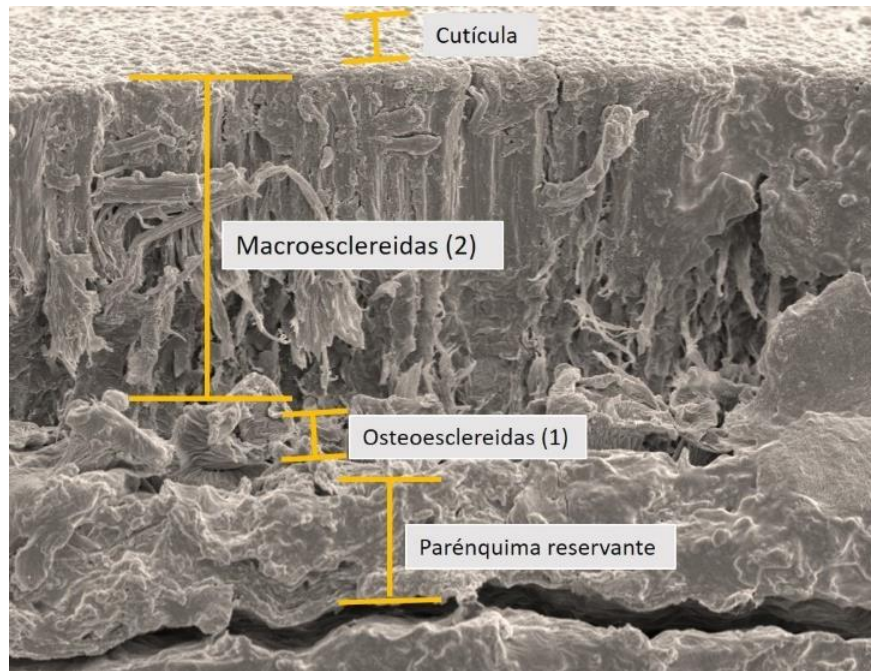


Figura 97. Estructuras de la cubierta seminal de *Lupinus* sp.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie que a simple vista se aprecia rugosa, pero presenta pequeñas formas alargadas y abultadas, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 98**).

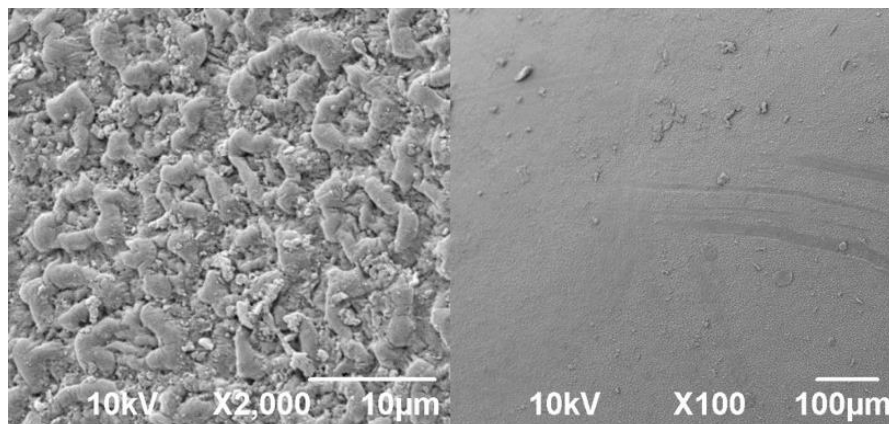


Figura 98. Cutícula de la testa de *Lupinus* sp.

2. Macroesclereidas (2):

Dos niveles de líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, hay un grosor distinto en ambos niveles, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, aunque sea una capa compacta se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la segunda capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 99**).

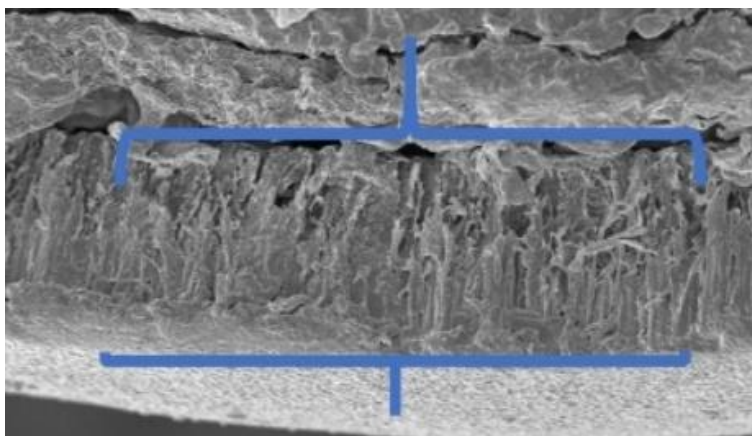


Figura 99. Macroesclereidas de la testa de *Lupinus* sp.

3. Osteoesclereidas (1):

Una capa de células columnares en forma de hueso, con los extremos ensanchados, acomodado en un solo nivel, es la tercer capa de mayor grosor. Aunque en esta especie se observan colapsadas y no como en el resto de las especies con presencia de osteoesclereidas, en donde se observan completas (**Figura 100**).

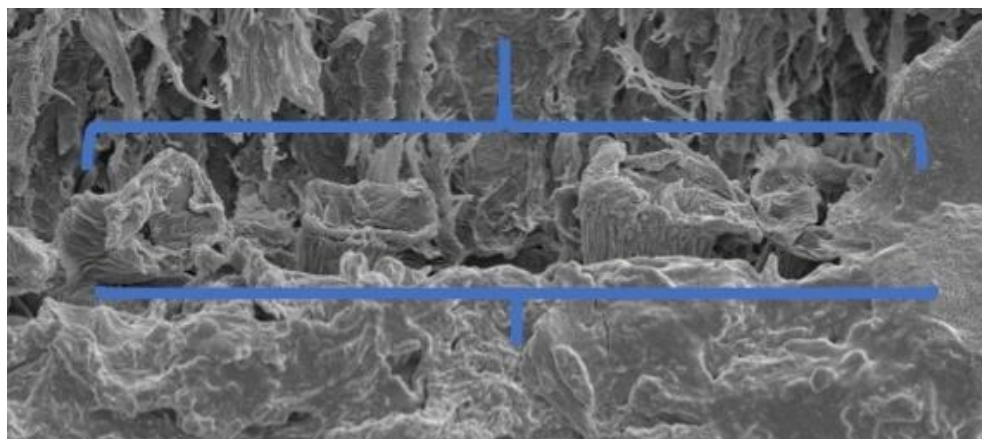


Figura 100. Osteoesclereidas de la testa de *Lupinus* sp.

4. Parénquima reservante:

Es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “hojuelas empalmadas” y compactas, que está junto al embrión (**Figura 101**).

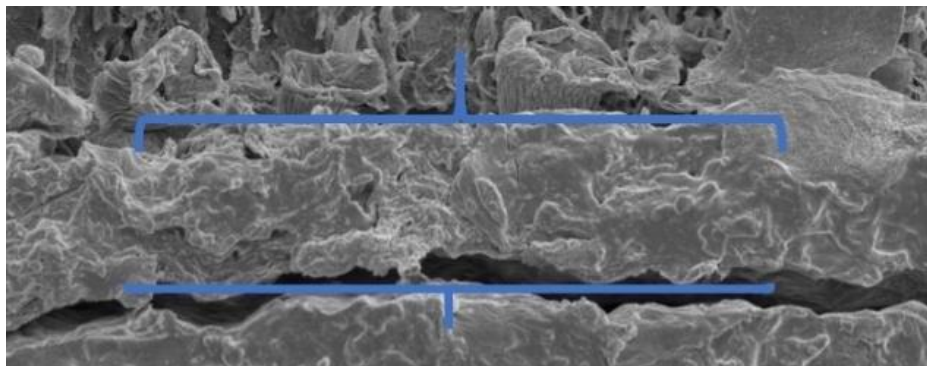


Figura 101. Parénquima reservante de la testa de *Lupinus* sp.

3.4.14 *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 102** y de la **Figura 103** a **108** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

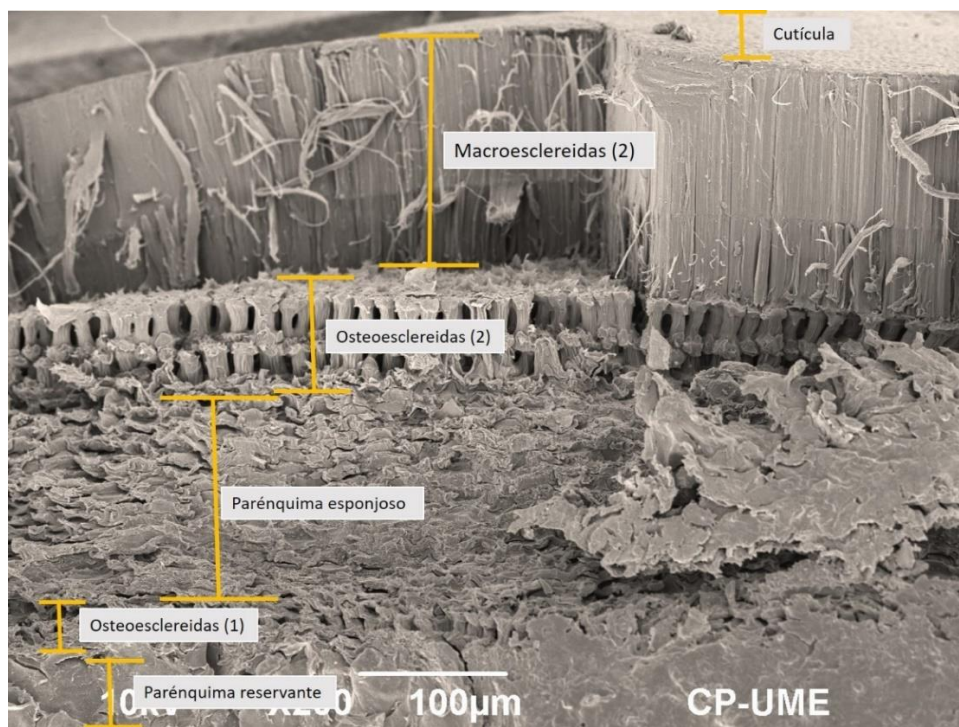


Figura 102. Estructuras de la cubierta seminal de *Delonix regia*.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie con textura parecidas a dunas y presenta agrietamientos longitudinales, transversales y de esquina, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 103**).

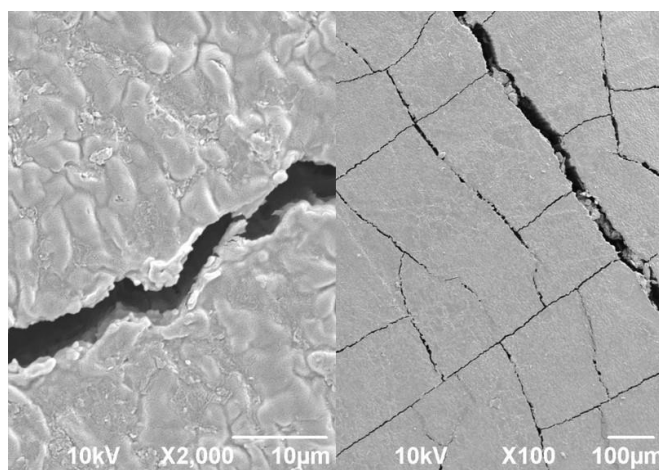


Figura 103. Cutícula de la testa de *D. regia*.

2. Macroesclereidas (2):

Líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, es posible apreciar dos niveles de estas células empalmadas, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, aunque sea una capa compacta se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la tercer capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 104**).

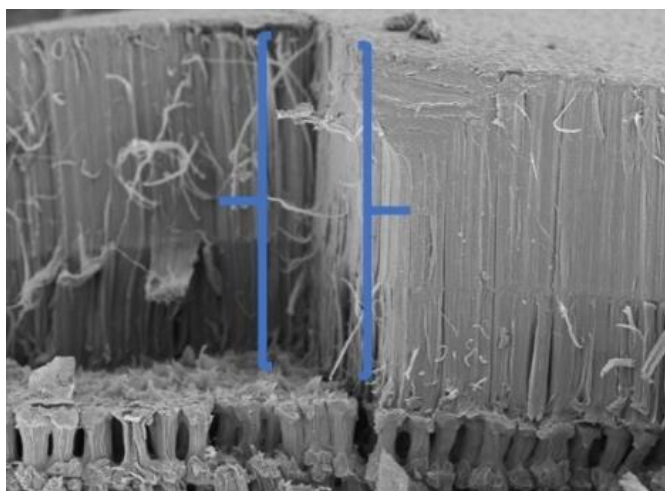


Figura 104. Macroesclereidas de la testa de *D. regia*.

3. Osteoesclereidas (2):

Son dos niveles de capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en los extremos, es la cuarta capa de mayor grosor (**Figura 105**).

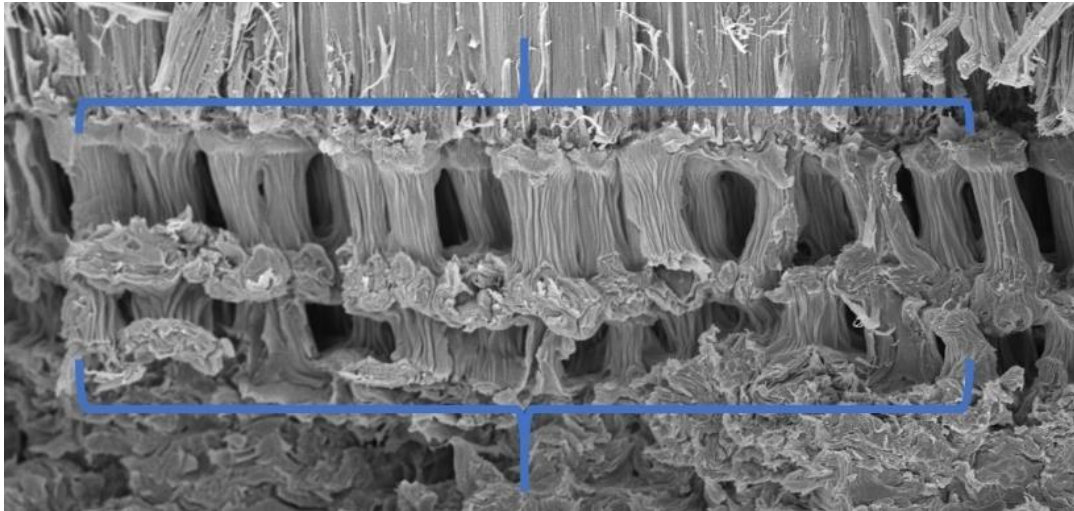


Figura 105. Osteoesclereidas de la testa de *D. regia*.

4. Parénquima esponjoso:

Es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “hojuelas”, acomodadas horizontalmente y compactas (**Figura 106**).

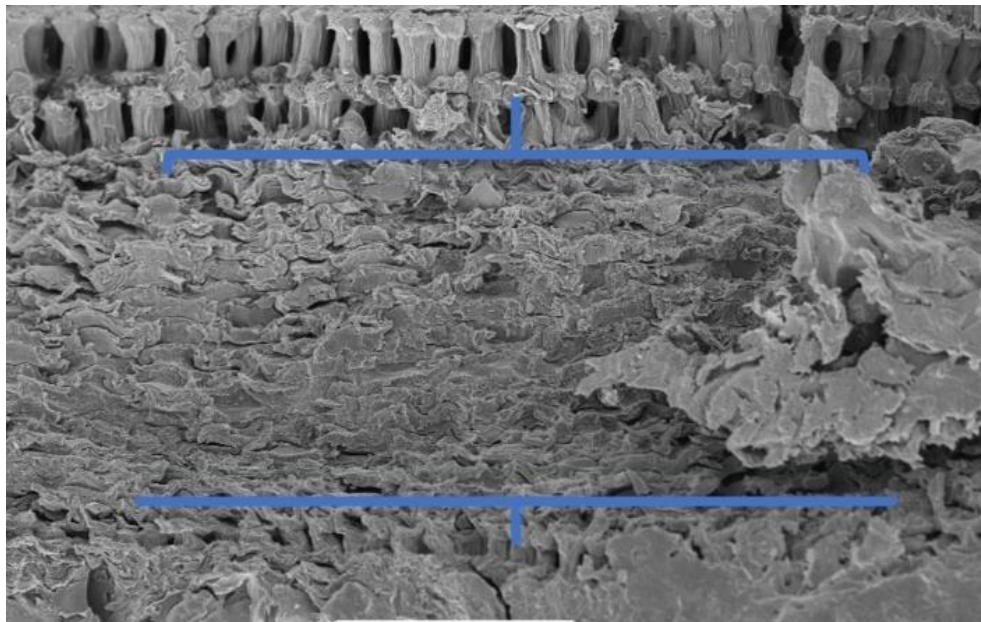


Figura 106. Parénquima esponjoso de la testa de *D. regia*.

5. Osteoesclereidas (1):

Un nivel de capas de células columnares en forma de hueso, ensanchados en los extremos, es la quinta capa de mayor grosor (**Figura 107**).

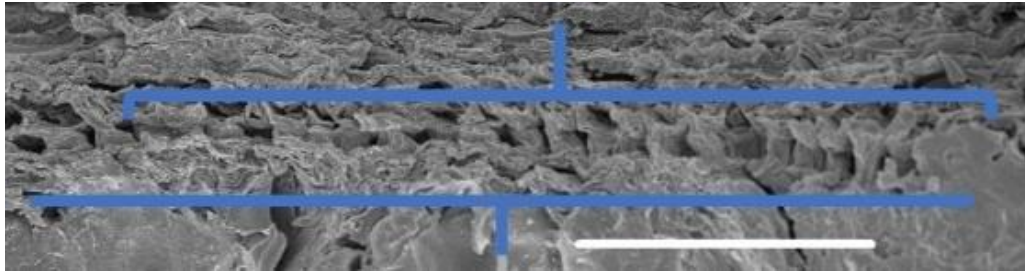


Figura 107. Osteoesclereidas de la testa de *D. regia*.

6. Parénquima reservante:

Es la capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “madera rasgada” y compacta, aunque es la capa de mayor grosor, este varía alrededor de los cotiledones esto se debe a la forma de la semilla (**Figura 108**).

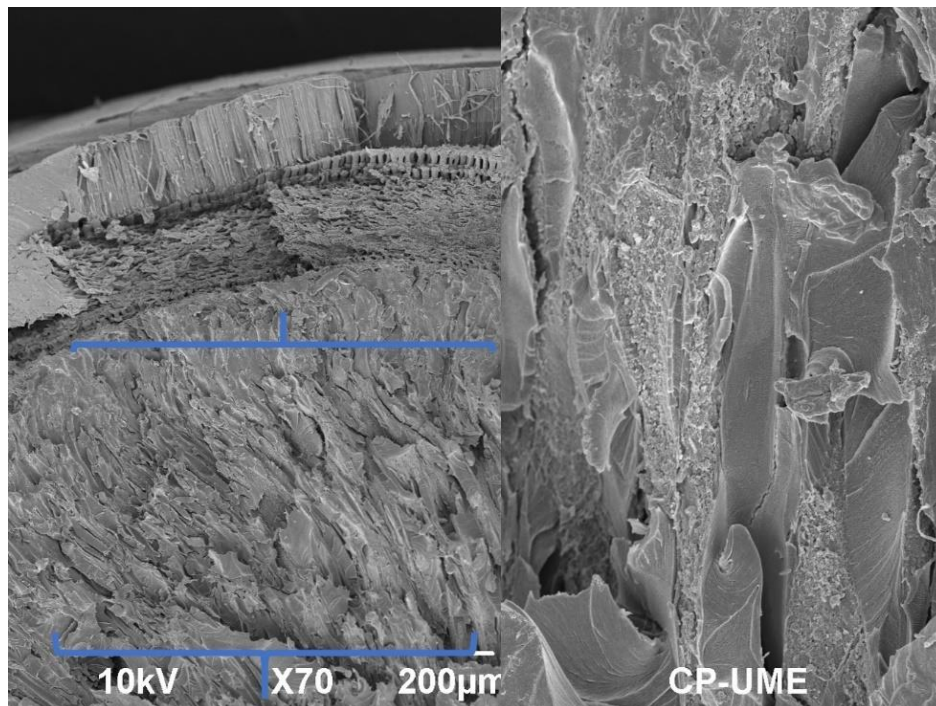


Figura 108. Parénquima reservante de la testa de *D. regia*.

3.4.15 *Sapindus* sp.

Las capas de la cubierta seminal halladas se refieren a continuación y se aprecian en general en la **Figura 109** y de la **Figura 110** a **113** se presentan cada una de las capas de la cubierta seminal brevemente descritas.

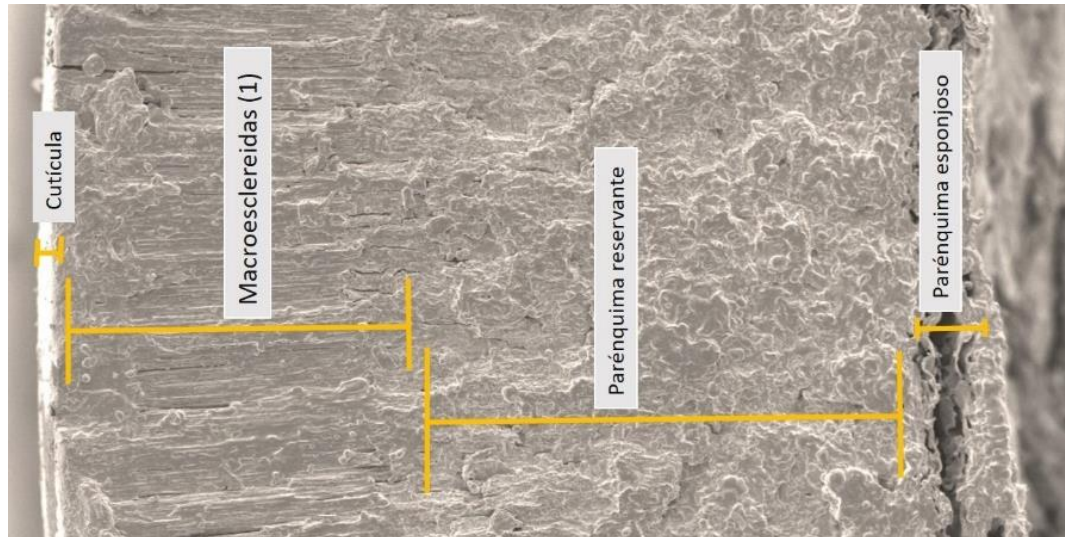


Figura 109. Estructuras de la cubierta seminal de *Sapindus* sp.

1. Cutícula:

La cutícula que presenta esta especie tiene una superficie con texturas similares a un cráter presenta agrietamientos longitudinales y de esquina, es la capa celular más delgada de la testa (**Figura 110**).

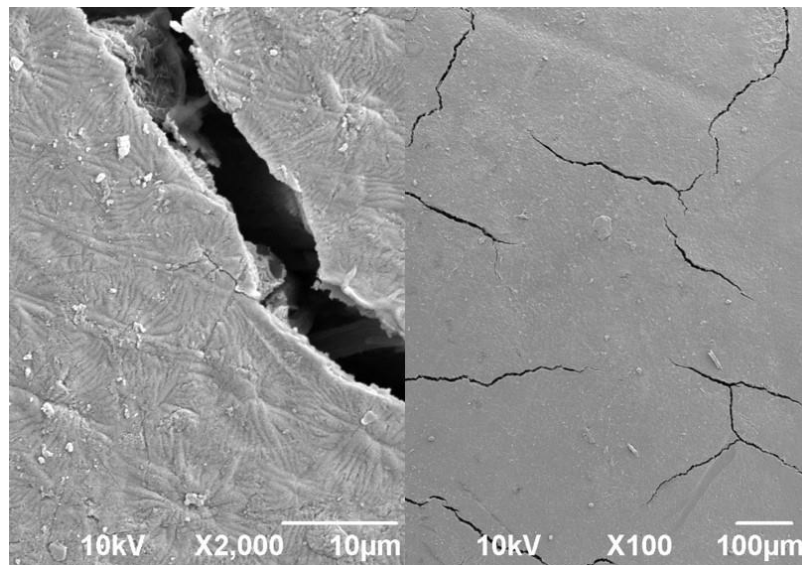


Figura 110. Cutícula de la testa de *Sapindus* sp.

2. Macro esclereidas (1):

Línea de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, aunque sea una capa compacta se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la segunda capa de mayor grosor presente en la testa de esta especie (**Figura 111**).

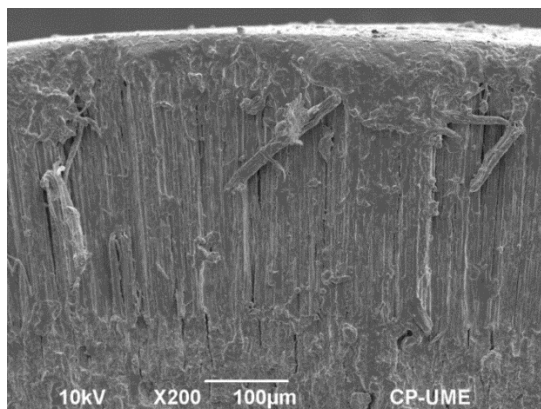


Figura 111. Macro esclereidas de la testa de *Sapindus* sp.

3. Parénquima reservante:

Es la capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura es uniforme con algunas formas redondas, es la capa de mayor grosor (**Figura 112**).

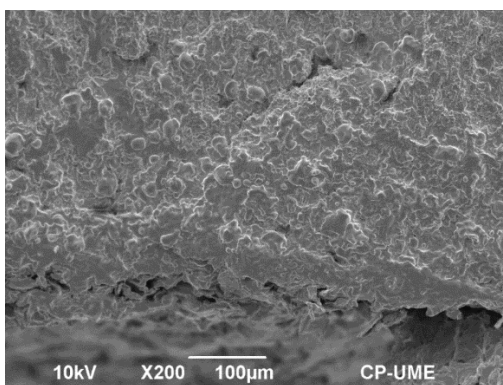


Figura 112. Parénquima reservante de la testa de *Sapindus* sp.

4. Parénquima esponjoso:

Es la tercer capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “hojuelas empalmadas”, está junto al embrión (**Figura 113**).

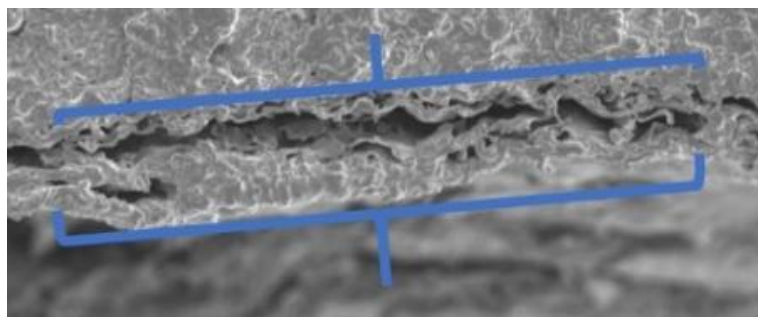


Figura 113. Parénquima esponjoso de la testa de *Sapindus* sp.

3.5 Comparación de capas celulares entre especies

Las estructuras descritas en cada una de las semillas de las diferentes especies son relativamente similares, se tiene de cuatro a ocho capas de estructuras distintas, hay especies en donde algunas de las estructuras aparecen más de una vez dentro del grosor de la cubierta seminal.

Las capas de estructuras que se encontraron en la mayoría de las especies son: cutícula, macroesclereidas, osteoesclereidas, parénquima (esponjoso, en empalizada, reservante, compacto). Debe de destacarse que en el caso de algunas especies el grosor de la cubierta seminal varía, esto depende de la forma de la semilla, por ejemplo, la semillas que independientemente de su forma, pero parecen estar aplastadas, la cubierta seminal de la parte más aplastada (orillas) es más gruesa que en la parte donde se aprecian los cotiledones que es más delgada. En el caso de las especies de los géneros *Prosopis*, *Delonix* y *Mucuna* observadas en esta investigación se observó que la capa de parénquima que se encontraba más cerca de los cotiledones el grosor no era uniforme variaba, como no se observó en el MEB la cubierta seminal de todas las partes de la semilla, es probable que el grosor de la testa sea diferente en cada parte de la semilla y por ende su función.

En el **Cuadro 13**, se muestran las especies a las cuales se les observó la conformación su testa con el nombre de cada capa presente, así como del número de capas individuales presente.

Cuadro 13. Tejidos vegetales presentes en la testa de las especies analizadas.

ESPECIE	TEJIDOS VEGETALES PRESENTES EN LA TESTA								
	Cutícula	Macroesclereidas	Osteoesclereidas	Parénquima esponjoso	Parénquima en empalizada	Parénquima en empalizada compacta	Parénquima reservante	Parénquima compacto	Capas presentes en testa
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (2016)	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓			7
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (1983)	✓	✓	✓✓✓	✓			✓	✓	8
<i>Ebenopsis ebano</i>	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓			7
<i>Prosopis glandulosa</i>	✓	✓✓	✓✓	✓			✓		7
<i>Prosopis laevigata</i>	✓	✓✓	✓✓	✓			✓		7
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	✓	✓✓	✓				✓		5
<i>Vachellia farnesiana</i>	✓	✓✓		✓	✓			✓	6
<i>Vachellia schaffneri</i>	✓	✓		✓	✓			✓	5
<i>Vachellia pennatula</i>	✓	✓✓		✓	✓			✓	6
<i>Erythrina coralloides</i>	✓	✓		✓				✓	4
<i>Mucuna sp.</i>	✓	✓	✓				✓		4
<i>Lupinus montanus</i>	✓	✓	✓	✓					4
<i>Lupinus sp.</i>	✓	✓✓	✓				✓		5
<i>Delonix regia</i>	✓	✓✓	✓✓✓	✓			✓		8
<i>Sapindus sp.</i>	✓	✓		✓			✓		4

✓ Cada una refiere a una capa del tejido vegetal presente en la testa.

En el **Cuadro 13**, están presentes 14 especies de leguminosas y una especie del género *Sapindus*, las especies de leguminosas presentan de cuatro a ocho capas de tejidos vegetales, la especie del género *Sapindus* tiene cuatro capas de tejidos vegetales. Nueve de las 14 especies de leguminosas presentan de una a tres capas de osteoesclereidas, el resto de especies de leguminosas que no las presentan pertenecen a los géneros *Vachellia* y *Erythrina*,

Enterolobium cyclocarpum recolectado en 1983 y *Delonix regia* son las especies que tienen ocho capas de tejidos vegetal y de estas capas tres son de osteoesclereidas. *Enterolobium cyclocarpum* recolectado en 2016, *Ebenopsis ebano*, *Prosopis glandulosa*, *Prosopis laevigata* presentaron siete capas de tejido vegetal. *Vachellia farnesiana* y *Vachellia pennatula* presentaron seis capas de tejido vegetal. *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Vachellia schaffneri* y *Lupinus* sp., presentaron cinco capas de tejido vegetal. *Erythrina coralloides*, *Mucuna* sp., *Lupinus montanus*, *Sapindus* sp., presentaron cuatro capas de tejido vegetal.

3.6 Análisis proximal de *Enterolobium cyclocarpum*

El análisis proximal fue hecho por triplicado en el **Cuadro 14**, se resumen los resultados de cada variable de testa y cotiledones en base húmeda y seca.

Cuadro 14. Análisis proximal de cotiledones y testa de *E. cyclocarpum*.

	Cotiledones		Testa	
	Base		Base	
	Seca (%)	Húmeda (%)	Seca (%)	Húmeda (%)
Humedad (H)	0.00	6.32	0.00	10.00
Materia seca (MS)	100.00	93.68	100.00	90.00
Cenizas (Cen)	3.36	3.15	5.23	4.71
Materia orgánica (MO)	96.64	90.52	94.77	85.29
Proteína cruda (PC)	26.08	24.43	3.74	3.37
Extracto etéreo (EE)	1.84	1.73	2.49	2.24
Fibra cruda (FC)	2.66	2.49	28.67	25.81
Extracto libre de nitrógeno (ELN)	45.24	42.38	23.00	20.70
Fibra detergente neutro (FDN)	23.47	21.98	65.54	58.98
Fibra detergente ácido (FDA)	4.63	4.34	46.08	41.47
Lignina (L)	1.30	1.21	21.00	18.90

3.6.1 Lignina

El análisis proximal fue realizado por triplicado en todas sus variables, se realizó principalmente para explorar la presencia del porcentaje lignina en la cubierta seminal, que es principalmente la estructura de la semilla a la cual se enfocó más este estudio.

El análisis realizado fue por separado para cubierta seminal y cotiledones. En cotiledones la presencia de lignina es muy baja en base seca y base húmeda de 1.30 y 1.21% respectivamente. Sin embargo, en la cubierta seminal se aprecia valores para la lignina de 21.00, 18.90% en base seca y base húmeda respectivamente. Es de notarse que variables como fibra cruda (BS: 28.67%; BH: 25.81%), fibra detergente Neutro (BS: 65.54%; BH: 58.98%) y Fibra Detergente Ácido (BS: 46.08%; BH: 41.47%), tanto en base húmeda o seca superan notablemente a los resultados obtenidos para los cotiledones.

3.7 Germinación de *Enterolobium cyclocarpum*

3.7.1 Capacidad germinativa

De acuerdo con la variable capacidad germinativa considerada como el porcentaje de semillas que germinó y desarrolla una plántula normal cuando se coloca en condiciones ambientales óptimas para su crecimiento (Borrajo, 2006), en la **Figura 114**, se aprecia la tendencia de la germinación acumulada de los diez tratamientos evaluados. Las semillas a las que se les realizó el lijado comenzaron a germinar el día seis de instalado el experimento y las últimas lo hicieron el día 22, logrando un porcentaje de germinación del 98.1%, comparando con el testigo que comenzó a germinar el día 6, pero dejaron de germinar el día 33.

Los resultados del análisis de varianza muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$) y bloques. La prueba de Tukey arrojó que el tratamiento de lijado (L), fue superior con 98.1% de germinación, los tratamientos A60, A70, A80, A93 e I35 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, pero fueron superiores al resto de tratamientos I60, A50, I45 y T con una germinación de 45.6, 39.4, 37.5 y 10.6% respectivamente.

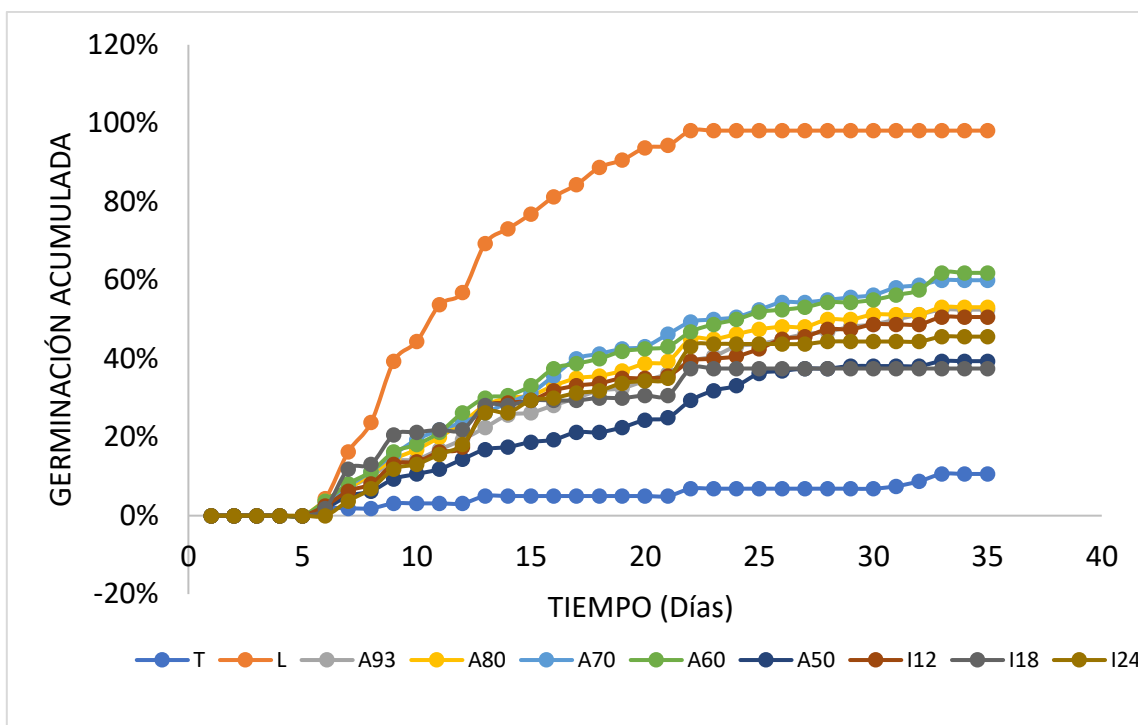


Figura 114. Germinación acumulada de los tratamientos: Control (T) semilla desinfectada; Lijado (L) lijado a un lado del micrópilo; Inmersión en agua hirviendo (93°C) hasta dejar enfriar por 24 horas (A93); Inmersión en agua a 80 °C hasta dejar enfriar por 24 hora (A80); Inmersión en agua a 70 °C hasta dejar enfriar por 24 horas (A70); Inmersión en agua a 60 °C hasta dejar enfriar por 24 horas (A60); Inmersión en agua a 50 °C hasta dejar enfriar por 24 horas (A50); Inmersión en NaOH por 12 horas (I12); Inmersión en NaOH por 18 horas (I18); Inmersión en NaOH por 24 horas (I24).

Cuadro 15. Análisis de varianza de germinación acumulada de *E. cyclocarpum*.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Tratamientos	9	35226.56	3914.06	83.99	<0.0001
Bloques	7	592.19	84.59	1.82	0.0998
Error	63	2935.94	46.60		
Total corregido	79	38754.69			

Cuadro 16. Comparación de medias (Prueba Tukey) de la capacidad germinativa.

Tratamiento	Media (%)*
L	98.1 a
A60	61.9 b
A70	60.0 bc
A80	53.1 bcd
A93	52.5 bcd
I35	50.6 cd
I60	45.6 ed
A50	39.4 e
I45	37.5 e
T	10.6 f

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

3.7.2 Energía germinativa

Para la variable de energía germinativa de las semillas, que representa el tiempo estipulado para calcular el porcentaje de semillas que germinó varía con la especie y suele ser aproximadamente $\frac{1}{4}$ del tiempo que se considera para la energía germinativa (Borrajó, 2006), para este estudio se consideró el número de días requerido para alcanzar el 70 % de la germinación final de cada tratamiento. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. El tratamiento de lijado obtuvo germinación de 98.13% sin embargo los días que necesito para llegar a 70% de la germinación total fue de 13 días en promedio. Por otro lado, el testigo que tuvo la germinación más baja de 10.63% necesito de al menos 19 días en promedio para llegar al 70% de la germinación total para este tratamiento. Lo que indica que a menor energía germinativa hay mayor porcentaje de germinación y viceversa para el caso de este estudio.

Cuadro 17. Análisis de varianza de energía germinativa de *E. cyclocarpum*.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	9	297.200	33.0222	0.85	0.5761
Bloques	7	173.600	24.8000	10.64	0.7241
Error	63	2455.5000	38.974		
Total corregido	79	2926.2000			

Cuadro 18. Comparación de medias (Tukey) de energía germinativa de *Enterolobium cyclocarpum*.

Tratamiento	Media (días)*
A93	19.4 ^a
T	19.4 a
A60	19.3 a
I12	19.1 a
A50	19.0 a
A80	18.4 a
A70	18.0 a
I24	16.8 a
I18	16.3 a
L	13.0 a

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

3.8 Discusión

Dentro de las 15 especies observadas en un Microscopio Electronico de Barrido, 14 de ellas son leguminosas y una especie del género *Sapindus*, las especies de leguminosas presentaron de cuatro a ocho capas de tejidos vegetales, y la especie del género *Sapindus* tiene cuatro capas de tejidos vegetales. Nueve de las 14 especies de leguminosas presentaron de una a tres capas de osteoesclereidas, el resto de especies de leguminosas que no las presentan pertenecen a los géneros *Vachellia* y *Erythrina*, la presencia de osteoesclereidas posiblemente hace posible que la latencia física sea mayor, esto se pudo observa al momento de obtener la muestra del laboratorio, semillas como *E. cyclocarpum*, *Ebenopsis ebano*, *Delonix regia* fueron semillas que estaban muy duras y fue mas complicado obtener la muestra. La dureza de la semilla de *Stylosanthes hamata* (L.) Taub., está relacionada con la presencia de un micropilo y un hilo totalmente cerrados, una epidermis compuesta por macroesclereidas en empalizada (Castillo y Guenni, 2001).

En un estudio anatómico de la cubierta seminal realizado a las capas de células presentes en las ocho especies del género *Passiflora* se destacó la presencia de una capa de macroesclereidas con patrón de alargamiento radial sinuoso y una capa de células obliteradas en todas las especies estudiadas, éstas siempre están ubicadas como las dos capas más internas de la cubierta seminal, excepto en

Passiflora edulis. Cabe destacar que el patrón morfoanatómico de la cubierta seminal en el género *Passiflora* es característico de cada especie.(Pérez-Cortéz *et al.*, 2005).

La anatomía de la cubierta seminal de cinco especies venezolanas del género *Calliandra*, es las especies estudiadas se caracterizó por la presencia de la capa de Malpighi (macroesclereidas), hipodermis formada por osteoesclereidas y parénquima colapsado, sin embargo se presentaron variaciones cuantitativas en el espesor de estas regiones permitiendo distinguir a cada especie (Leython y Jáuregui, 2008).

Anatómicamente, en semillas de *Medicago sativa* L., el incremento del grosor de la testa se asocia con el nivel de permeabilidad al agua, se le atribuye a la variación del grosor de la cutícula, longitud de las macroesclereidas, grosor de la pared celular, presencia y/o desarrollo de osteoesclereidas (Galussi *et al.*, 2015).

Las semillas de *Sophora tomentosa* y *Eythrina speciosa*, fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido (MEB) para observar la morfología de la cubierta de la semilla, y está conformada por la región extrahiliar con una capa de células en empalizada columnar, una capa de osteosclereidas, tejido esponjoso y células trituradas (Delgado *et al.*, 2015).

La testa de la semilla de *Ormosia paraensis* Ducke está formada por una cutícula (sustancias hidrofóbicas), epidermis (macroesclereidas de la capa de empalizada), hipodermis (osteoesclereidas) y células del parénquima (Marques *et al.*, 2018).

Enterolobium cyclocarpum recolectado en 1983 y *Delonix regia* son las especies que tienen ocho capas de tejidos vegetal y de estas capas tres son de osteoesclereidas. *Enterolobium cyclocarpum* recolectado en 2016, *Ebenopsis ebano*, *Prosopis glandulosa*, *Prosopis laevigata* presentaron siete capas de tejido vegetal. *Vachellia farnesiana* y *Vachellia pennatula* presentaron seis capas de tejido vegetal. *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Vachellia schaffneri* y *Lupinus* sp., presentaron cinco capas de tejido vegetal. *Erythrina coralloides*, *Mucuna* sp., *Lupinus montanus*, *Sapindus* sp., presentaron cuatro capas de tejido vegetal.

Es notorio que las especies de *Vachellia* (tribu Acacieae) estudiadas carecen de osteoesclerénquima y es conveniente verificar si alguna especie de dicho género lo presentan. En cambio, en los géneros *Mucuna* y *Erythrina* (ambas de la misma tribu, *Phaseolae*), dicho tejido aparece en la primera, pero no en la segunda. Asimismo, el parénquima en empalizada solo se observó en *Enterolobium*, *Ebenopsis* y *Vachellia* (las dos primeras de la tribu Ingeae, la tercera Acacieae). De igual forma es conveniente comprobar, en estudios futuros, si este último tejido se observa en más especies de los géneros referidos y no en las otras, de modo que estas características puedan considerarse como típicas de las especies y tribus. Desde luego, también cabe la posibilidad de variación en grosor y en capas existentes en diferentes partes de la semilla y de variabilidad intraespecífica.

La semilla de *Enterolobium cyclocarpum* presentó una germinación exitosa, del tratamiento de lijado (L), se obtuvo 98.3% de germinación, los tratamientos A60, A70, A80, A93 e I35 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, pero fueron superiores al resto de tratamientos I60, A50, I45 y T con una germinación de 45.6, 39.4, 37.5 y 10.6% respectivamente. Si por un momento se deja a un lado el porcentaje de germinación ya que el testigo también germinó, aunque sea 10.6% se declara una germinación exitosa, porque a *E. cyclocarpum* se le considera una especie ruderal de sucesión secundaria con semillas recalcitrantes por lo que no son viables más allá de un año, es por eso que los resultados obtenidos demuestran lo contrario, ahora es necesario realizar más investigaciones con especies de semillas con latencia física consideradas como recalcitrantes para determinar si es solo en algunas especies la viabilidad se mantiene por más tiempo.

La lignina es un componente fundamental de la pared celular vegetal que además de la lignina, está básicamente formada por celulosa, hemicelulosa, pectina, proteínas, cutina, suberina y sales minerales (Bonawitz y Chapple, 2010). En un estudio realizado al tegumento de *Araucaria angustifolia* el contenido de lignina fue relativamente alto (32.43%), en comparación con los niveles reportados para semillas de otras especies arbóreas (Affonso-Sampaio *et al.*, 2016).

En el análisis realizado en esta investigación la presencia de lignina es baja en base seca y base húmeda de 1.30 y 1.21% respectivamente. Sin embargo, en la cubierta seminal se aprecia valores de 21.00, 18.90% en base seca y base húmeda respectivamente. En base seca se obtuvo mayor porcentaje que en base húmeda por lo que pudiera ser posible que entre más latente y seca este una semilla tendrá mayor porcentaje de lignina, claro que debe de buscarse cuál es el límite de la semilla de mantenerse seca de forma que no pierda la viabilidad.

La lignificación de la pared celular está regulada en espacio y tiempo varían de acuerdo a la especie de planta, edad y tejido, y de si se trata de paredes celulares primarias o secundarias (Grabber, 2005). Un análisis histoquímico realizado en semillas de *Sophora tomentosa* y *Eythrina speciosa* demostró que en la región hilar de ambas especies se encuentra principalmente lignina en la parte superior de estas células (Delgado *et al.*, 2015). Para aportar este tipo de resultados es necesario realizar análisis proximal o histoquímico a testas de especies de leguminosas que sean semejantes a *Enterolobium cyclocarpum* para poder determinar la semejanza o no de la presencia de lignina.

Con más frecuencia se concibe a la lignina como una barrera física potencial contra la invasión por fitopatógenos; en la interacción planta-nematodos endoparásitos, son parte de las modificaciones involucradas en la reestructuración de las paredes de las células de la raíz del hospedante (Lagunes-Fortiz y Zavaleta-Mejía, 2016). Las partes digeribles de un alimento por los rumiantes son la celulosa y hemicelulosa de la pared celular no unidas a la lignina y el contenido celular (Mejía-Delgadillo *et al.*, 2011). Como se ha demostrado en investigaciones realizadas la lignina actúa como una barrera para nematodos y por otro lado es una parte no digerible para rumiantes, siendo estos organismos que digieren una gran cantidad de compuestos indigeribles para los humanos. Es posible que gracias a la lignina presente en semillas de *E. cyclocarpum*, esta tenga latencia física.

3.9 Conclusiones

Se identificaron las estructuras que conforman la cubierta seminal de 15 especies con latencia física, mediante la observación y análisis de imágenes obtenidas en un Microscopio Electrónico 14 de estas son leguminosas (*Enterolobium cyclocarpum*(2), *Prosopis laevigata*, *P. glandulosa*, *Vachellia farnesiana*, *V. schaffneri*, *V. penatula*, *Erythrina coralloides*, *Mimosa Caesalpiniiifolia*, *Lupinus* sp., *Lupinus montanus*, *Delonix regia*, *Mucuna* sp., *Ebenopsis ebano*) y una especie del género *Sapindus*, las especies de leguminosas presentaron de cuatro a ocho capas de tejidos vegetales, y la especie del género *Sapindus* tiene cuatro capas de tejidos vegetales.

Enterolobium cyclocarpum recolectado en 1983 y *Delonix regia* son las especies que tienen ocho capas de tejidos vegetal y de estas capas tres son de osteoesclereidas. *Enterolobium cyclocarpum* recolectado en 2016, *Ebenopsis ebano*, *Prosopis glandulosa*, *Prosopis laevigata* presentaron siete capas de tejido vegetal. *Vachellia farnesiana* y *Vachellia pennatula* presentaron seis capas de tejido vegetal. *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Vachellia schaffneri* y *Lupinus* sp., presentaron cinco capas de tejido vegetal. *Erythrina coralloides*, *Mucuna* sp., *Lupinus montanus*, *Sapindus* sp., presentaron cuatro capas de tejido vegetal.

Cabe la posibilidad de que algunos géneros y tribus no presenten capas típicamente como el osteoesclerénquima y presenten otras, como el parénquima en empalizada (en ambos casos el ejempli son las especies estudiadas del género *Vachellia*, tribu *Acadeae*).

El tratamiento de lijado y los tratamientos térmicos a partir de 60 °C, fueron los más efectivos métodos escarificatorios para *E. cyclocarpum*. El análisis proximal realizado encontró lignina en cotiledones en base seca y base húmeda de 1.30 y 1.21% respectivamente. La cubierta seminal obtuvo valores de 21.00, 18.90% en base seca y base húmeda respectivamente.

Se lograron cubrir los objetivos planteados para la presente investigación, aunque no fueron resueltas muchas incógnitas que presentan aun hoy en día las semillas,

se plantean muchas dudas y sugerencias que pueden y deben retomar estudios subsecuentes.

3.10 Recomendaciones

Realizar estudios de germinación en semillas con latencia física consideradas recalcitrantes ya que como se demuestra en las semillas de *E. cyclocarpum* que tiene cinco años de ser recolectadas no deberían de considerarse como recalcitrantes ya que después de dos años siguen siendo viable como se demuestra en esta investigación, estos experimentos de germinación se recomiendan hacer también con esta con *Delonix regia*, por ser considerada ruderal recalcitrante a pesar de que tiene la presencia de ocho capas de células en la cubierta seminal y tres de ellas son osteoesclereidas.

Es necesario realizar estudios proximales o histoquímicos a la testa de semillas de *Delonix regia*, ya que por las ocho capas que presenta y dentro de estas presenta tres capas de osteoesclereidas sea posible encontrar un porcentaje considerable de lignina

Realizar observaciones más detallados de la cubierta seminal y de ser posible de cada parte de la cubierta seminal que conforma a la semilla de *Prosopis glandulosa*, *Prosopis laevigata*, *Delonix regia*, *Mimosa caesalpinifolia*, *Mucuna* sp., esto porque en las observaciones realizadas en la presente investigación se aprecia un grosor muy variado en un pequeño trozo de la muestra, por ende, con mucha posibilidad este grosor va a ser diferente en cada parte de la semilla.

3.11 Literatura citada

- Affonso-Sampaio, D., Dos Santos-Abreu, H., Silveira-Augusto, L. D., Da Silva, B., y Marcela-Ibanez, C. (2016). Perfil lignoidico del tegumento de semillas de *Araucaria angustifolia*. *Bosque*, 37(3), 549–555.
<https://doi.org/10.4067/S0717-92002016000300012>
- Bonawitz, N.D., y Chapple, C. (2010). The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetic*.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163508>
- Borrajó, C. I. (2006). Importancia de la calidad de semillas. En Curso Internacional En Ganadería Bovina Subtropical.

- Castillo, R., y Guenni, O. (2001). Latencia en semillas de *Stylosanthes hamata* (Leguminosae) y su relación con la morfología de la cubierta seminal. *Revista de Biología Tropical*, 49(1), 287–299.
- Delgado, C. M. L., de Paula, A. S., Santos, M., y Paulilo, M. T. S. (2015). Dormancy-breaking requirements of *Sophora tomentosa* and *Erythrina speciosa* (fabaceae) seeds. *Revista de Biología Tropical*, 63(1), 285–294. <https://doi.org/10.15517/rbt.v63i1.13903>
- Galussi, A. A., Argüello, J. A., Cerana, M. M., Maximino, M., y Moya, M. E. (2015). Características anatómicas y químicas del tegumento seminal de *Medicago sativa* L. (alfalfa) cv. Baralfa 85 y su asociación con la dormición. *Phyton*, 84(1), 163–175.
- Grabber JH. (2005). How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science*. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2004.0191>
- Lagunes-Fortiz, E., y Zavaleta-Mejía, E. (2016). Función de la Lignina en la Interacción Planta-Nematodos Endoparásitos Sedentarios. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 43–63. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1506-7>
- Leython, S., y Jáuregui, D. (2008). Morfología de la semilla y anatomía de la cubierta seminal de cinco especies de Calliandra (Leguminosae-Mimosoideae) de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 56(3), 1075–1086.
- Marques, B., Oliveira, C. De, Moro, F. V., Vieira, R. D., Ducke, O., Sementes, P., y De, C. (2018). Seed anatomy and water uptake and their relation to seed dormancy of *Ormosia paraensis* Ducke. *Journal of Seed Science*, 40(3): 237–245.
- Mejía-Delgadillo, M. A., Álvarez-Almora, E. G., Pinos-Rodríguez, J. M., Ponce-Medina, J. F., Plascencia-Jorquera, A., Escoboza-García, L. F., y Rodríguez-García, J. (2011). Digestion of wheat hay as compared to alfalfa and ryegrass in steers. *Agrociencia* 45, 13–21.
- Pérez-Cortéz, S., Escala, M., y Tillett, S. (2005). Anatomía de la cubierta seminal de ocho especies de *Passiflora* L., subgénero *Passiflora*. *Acta Botanica Venezuelica*, 28(2), 337–348.
- Pita-Villamil, J. M., y Perez-García, F. (1998). Germinación de semillas. Secretaria General Técnica, Centro de Publicaciones.
- Vozzo, J. A. (2010). Manual de semillas de árboles tropicales. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos Servicio Forestal. 894 p.

4. CAPITULO 4. ARTÍCULO CIENTÍFICO

Latencia física, morfoanatomía y análisis proximal de la semilla de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb

Physical dormancy, morphoanatomy and proximal analysis of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb seed

Resumen

Objetivo: analizar anatomía y composición de la cubierta seminal en semillas de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb, mediante el uso de imágenes obtenidas en un microscopio electrónico de barrido (MEB), realizar pruebas de germinación y un análisis proximal.

Diseño metodológico: se observaron en un MEB muestras de cubierta seminal de *E. cyclocarpum* de dos procedencias y año de recolección distintas (1983 y 2019). También fueron observadas 12 especies leguminosas. Para semillas de *E. cyclocarpum* recolectada en 2019 se emplearon tratamientos de escarificación para realizar un estudio de germinación y también se hizo un análisis proximal.

Resultados: el número de capas celulares presentes en todas las especies va de cuatro a ocho. El análisis estadístico de germinación fue significativo ($p < 0.0001$) entre los tratamientos, el de mayor germinación fue el lijado. La presencia de un alto porcentaje de lignina (L), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), y extracto libre de nitrógeno (ELN) en la cubierta seminal fue determinada por un análisis proximal.

Limitaciones de la investigación: para la obtención de muestra de cubierta seminal, es necesario considerar la parte de la semilla de donde se toma, ya que el grosor de esta puede variar.

Hallazgos: las capas celulares presentes en la cubierta seminal son cutícula, macroesclereidas, osteoesclereidas, parénquima (esponjoso, en empalizada, compacto), *E. cyclocarpum* tiene siete y ocho capas, en el resto de las especies se observaron de cuatro a ocho. La presencia de capas celulares y lignina presente en la cubierta seminal (base seca) de *E. cyclocarpum* determina su latencia física.

Palabras clave: *Enterolobium cyclocarpum*, latencia física, morfoanatomía, análisis proximal, capas celulares.

Abstract

Objective: to analyze the anatomy and composition of the coat in seeds of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb, by using images obtained in a scanning electron microscope (SEM) and to conduct germination tests and a proximal analysis.

Methodological desing: samples of *E. cyclocarpum* seed coat from two different provenances and year of collection were observed in an electronic microscope, along with 12 other legume species were. Scarification treatments for a germination test and a proximal analysis were conducted for *E. cyclocarpum* seeds collected in 2019.

Results: the number of cell layers present in all of the species ranges from four to eight . The statistical analysis of gemination was significant ($p < 0.0001$) among the treatments, the one with the highest germination was sanding. The presence of a high percentage of lignin (L), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (FDA), and nitrogen-free extract (ELN) in the seed coat was determined.

Research limitations: to obtain a seed coat sample, it is necessary to consider the place of the seed from which it is taken, since the thickness of the seed coat can vary.

Findings: the cell layers present in the seed coat are cuticle, macrosclereids, osteosclereids, parenchyma (spongy, palisade, compact); *E. cyclocarpum* has seven and eight layers, while in the rest of the species four to eight layers were observed. The presence of cell layers and lignin in the seed coat of *E. cyclocarpum* determines its physical dormancy.

Keywords: *Enterolobium cyclocarpum*, physical dormancy, morphoanatomy, proximal analysis, cell layers.

INTRODUCCIÓN

Las semillas están constituidas por un embrión y por compuestos de reserva, ambos rodeados por cubiertas seminales (Pita-Villamil y Perez-García, 1998). La mayoría de las leguminosas tiene una cubierta seminal impermeable con propiedades estructurales y/o químicas que restringe mecánicamente al embrión (Vozzo, 2010). La latencia, definida como la incapacidad para germinar de una semilla intacta y viable, bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad, está predominantemente impuesta por la cubierta seminal. Esta última no solo se involucra en el impedimento para la germinación, cumple funciones críticas como regulación de absorción de agua, proporciona una barrera contra hongos y reduce el escape del embrión durante la imbibición (Vozzo, 2010).

La cutícula de la cubierta seminal es la primera línea de impermeabilidad, debajo de esta se encuentran líneas de células de Malpighi (macroesclereidas) que encierran completamente el embrión; y bajo estas células hay una capa corta y gruesa de hipodermis (osteo esclereidas), se considera que el conjunto de estas células juega un papel principal para evitar el ingreso del agua (Vozzo, 2010). La semilla de *Stylosanthes hamata* (L.) Taub, se caracteriza por presentar un alto grado de latencia física, asociada con micropilo e hilo sellados y epidermis compuesta por macroesclereidas en empalizada (Castillo y Guenni, 2001).

En un estudio anatómico de cubierta seminal realizado a ocho especies venezolanas del género *Passiflora*, se encontraron de una a ocho capas de células con diferentes patrones anatómicos; destacó la presencia de una capa de macroesclereidas y una de células obliteradas, en siete especies están ubicadas como las capas más internas de la cubierta seminal, excepto en *Passiflora edulis* Sims (Pérez-Cortéz *et al.*, 2005). La anatomía de la cubierta seminal en cinco especies venezolanas del género *Calliandra* se caracterizó por la presencia de la capa de Malpighi, hipodermis formada por osteo esclereidas y parénquima colapsado (Leython y Jáuregui, 2008). En semillas de *Medicago sativa* L., el incremento del grosor de la cubierta seminal se asocia con el nivel de permeabilidad al agua, se relaciona con la variación del grosor de la cutícula, longitud de las macroesclereidas, grosor de la pared celular y con la presencia y/o desarrollo de osteo esclereidas (Galussi *et al.*, 2015). Las semillas de *Sophora tomentosa* L. y *Erythrina speciosa* Andrews, presentan estructuras similares y su cubierta consiste de una región extrahiliar con una capa de células en

empalizada columnar, una capa de osteosclereidas, tejido esponjoso y células trituradas. Las células en empalizada están cubiertas por una gruesa cutícula (Delgado-Luzia *et al.*, 2015).

La lignina es un componente fundamental de la pared celular vegetal, junto con celulosa, hemicelulosa, pectina, proteínas, cutina, suberina y sales minerales (Bonawitz y Chapple, 2010). La lignificación de la pared celular está regulada en espacio y tiempo y varía con la especie de planta, edad, tejido y de si se trata de paredes celulares primarias o secundarias (Grabber, 2005). Con más frecuencia se concibe a la lignina como una barrera física potencial contra la invasión por fitopatógenos; en la interacción planta-nemátodos endoparásitos, son parte de las modificaciones involucradas en la reestructuración de las paredes de las células de la raíz del hospedante (Lagunes-Fortiz y Zavaleta-Mejía, 2016). El contenido de lignina en el tegumento de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze es alto en comparación con los niveles reportados para semillas de otras especies arbóreas (Affonso-Sampaio *et al.*, 2016). Las partes digeribles de un alimento por los rumiantes son la celulosa y hemicelulosa de la pared celular no unidas a la lignina y el contenido celular (Mejía-Delgadillo *et al.*, 2011). La cubierta seminal de la semilla de *Ormosia paraensis* Ducke, está formada por una cutícula (sustancias hidrofóbicas), epidermis (macroesclereidas de la capa de empalizada), hipodermis (osteosclereidas) y células del parénquima (Silva-Silva *et al.*, 2018). Un análisis histoquímico realizado en semillas de *Sophora tomentosa* L. y *Erythrina speciosa* Andrews demostró que en la región hiliar de ambas especies se encuentra principalmente compuesta de lignina en la parte superior de estas células (Delgado-Luzia *et al.*, 2015). La semilla de *Stylosanthes hamata* (L.) Taub, presentan una alta concentración de compuestos hidrofóbicos en todos los tejidos que conforman la cubierta seminal (Castillo y Guenni, 2001). Desde el punto de vista fisiológico y químico, el mecanismo de latencia física por la cubierta seminal, se explica por la mayor cantidad de componentes con características que repelen el agua y son cementantes, tales como polifenoles, ligninas, taninos condensados y sustancias pécticas y menor proporción de celulosa y hemicelulosa (Galussi *et al.*, 2015).

El objetivo de esta investigación fue analizar y comparar la anatomía y composición de la cubierta seminal en semillas de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb, de dos procedencias y años de recolección distintos, y de otras 12 especies de leguminosas, mediante

el uso de imágenes obtenidas en un microscopio electrónico de barrido (MEB); así como una prueba de germinación y un análisis proximal de la primera especie.

METODOLOGÍA

Germinación

El experimento de germinación fue realizado con semillas de *E. cyclocarpum* recolectadas en Tamuin, San Luis Potosí en el año 2019, fue instalado en una casa particular del municipio de Cuauhtepac de Hinojosa, en el estado de Hidalgo, debido a contingencia sanitaria por la el COVID 19, no fue posible realizarlo bajo condiciones de ambiente controlado. Se ocuparon ocho cajas de germinación lavadas con agua corriente y desinfectadas (agua con cloro: 10 gotas Cloralex ®/ por litro de agua), en el fondo fue colocada tela fieltro lavada y desinfectada, posteriormente se le agregaron 60 ml de agua con cloro para mantener húmedo el fieltro. Se aplicaron diez tratamientos de escarificación enseguida descritos:

Testigo: fueron desinfectada 160 semillas, este procedimiento se realizó para prevenir presencia de hongos fitopatógenos en las cajas germinadoras.

Escarificación física: fueron lijadas (lija TRUPER ® grano grueso) 160 semillas), posteriormente fueron desinfectadas.

Escarificación térmica: se desinfectaron 160 semillas y fueron colocadas en un recipiente de plástico con tapa hermética (lavado y desinfectado) donde se les aplicó agua hirviendo (93°C en este lugar) hasta completar 750 ml (capacidad del recipiente). Se cerró herméticamente y se dejó reposar por 24 h. Este proceso se repitió para los tratamientos con temperaturas 80, 70, 60 y 50 °C.

Escarificación química: fue realizada con hidróxido de sodio (NaOH), se usó el producto de la marca comercial Limpiahornos mony ® con contenido pastoso neto de 470 g, el contenido fue colocado en un recipiente de plástico de 1 l, posteriormente se le agregó agua hirviendo hasta la medida de un litro para diluir la pasta, y se revolvió con una cuchara de plástico hasta que se homogeneizara. Se aplicaron tres tiempos de escarificación química con el NaOH que se preparó, en cada uno de tres recipientes de plástico con tapa se colocaron 160 semillas, se les agregó NaOH hasta que cubriera toda la semilla, enseguida se le añadió agua hirviendo hasta la marca 625 ml y se procedió a revolver con una cuchara de plástico hasta

homogeneizar, y se cerró. El primer recipiente se dejó reposar 12 h, el segundo 18 h y el tercero 24 h.

Diseño experimental

Se estableció un diseño experimental de bloques completamente al azar usando el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: μ = media general, α_i = efecto de i-ésimo tratamiento, β_j = efecto de j-ésimo bloque, ε_{ijk} = error experimental

El experimento se realizó con diez tratamientos y ocho repeticiones, se utilizaron 20 semillas por tratamiento, ocupando un total de 1600 semillas, las observaciones fueron diarias por 35 días.

Los tratamientos y su simbología fueron: control (T) (con semilla desinfectada), lijado (L) (a un lado del micrópilo), inmersión en agua hirviendo (93°C) hasta dejar enfriar y remojar por 24 h (A93), inmersión en agua a 80 °C hasta dejar enfriar y remojar por 24 h (A80), inmersión en agua a 70 °C hasta dejar enfriar y remojar por 24 h (A70), inmersión en agua a 60 °C hasta dejar enfriar y remojar por 24 h (A60), inmersión en agua a 50 °C hasta dejar enfriar y remojar durante 24 h (A50), inmersión en NaOH por 12 h (I12), inmersión en NaOH por 18 h (I18), inmersión en NaOH por 24 h (I24).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de germinación y energía germinativa fueron analizados con el paquete estadístico SAS®, Versión 9.0, empleando el procedimiento análisis de varianza ($p \leq 0.05$) (Proc Anova) (SAS Institute, 2010). Debido a que la germinación es una variable binomial, fue transformada mediante la función arco seno. Las medias fueron comparadas mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Anatomía de cubierta seminal

La obtención de imágenes mediante microscopio electrónico de barrido (MEB) fue realizada en la Unidad de Microscopia Electrónica del Colegio de Postgraduados, por el Biól. Simón Morales Rodríguez. Las especies observadas fueron *E. cyclocarpum* Recolectada en 1983 (Acapetahua, Chiapas; 37 años almacenada); *E. cyclocarpum* Recolectada en 2019 (Tamuín, San Luis Potosí; 2 años almacenada); *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth; *Prosopis glandulosa* Torr; *Prosopis laevigata* (Humb. y Bonpl. ex Willd.) M.C.Johnst; *Erythrina coralloides* DC.

1825; *Vachellia farnesiana* (L.) Willd. y Arn; *Vachellia schaffneri* (S. Watson) Seigler y Ebinger; *Vachellia pennatula* (Schltdl. y Cham.) Benth; *Ebenopsis ebano* (Berl.) Britton y Rose; *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf; *Mucuna sp.* *Lupinus sp.*; y *Lupinus montanus* Kunth. Ya se contaba imágenes del MEB de esta última especie al momento de la realización de la presente investigación.

Para la obtención de las muestras de cubierta seminal se usó un método destructivo, debido a su dureza, con una pinza de presión se buscó fracturar (para conserva la estructura de la muestra) la cubierta, para que en la observación se lograran apreciar las diferentes capas celulares de la cubierta seminal sin alteración. Muestras de cubierta seminal de 0.5-1.0 cm fueron colocadas en un recipiente de muestra etiquetado y entregada al laboratorio, este proceso se repitió con las 14 especies. El procesamiento de las muestras para su observación fue el siguiente:

Fijación: sobre el stub (latón) fue colocado un trozo redondo de cinta adhesiva de carbón del tamaño de este, y con el apoyo de un microscopio y una su pinza de disección se fijó la muestra sobre el stub.

Recubrimiento: los stubs con muestras fijadas fueron colocadas en el Sputter (Modelo: FINE COAT ION SPUTTER JFC-1100) para ser recubiertas con oro-paladio (50-50%). Terminado el recubrimiento los stubs son retirados y colocados en una caja Petri previamente arreglada con cintas adhesivas doble cara para evitar que se muevan al momento de llevarlas de un sitio a otro.

Observación: la observación fue realizada con el apoyo de una computadora de escritorio (Modelo: NEC MultySync LCD2090UXi) enlazada al MEB (Modelo: JEOL JSM-6390 Scanning Electron Microscope) mediante el software JEOL Scanning Electron Microscope.

Análisis proximal

El análisis proximal fue realizado a la cubierta seminal y cotiledones de la semilla de *E. cyclocarpum* recolectadas en Tamuin, San Luis Potosí en el año 2019. Este análisis se hizo en el Laboratorio de Nutrición Animal del Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Se analizó la muestra por triplicado. Se rompió el equivalente a 106.515 g de semillas completas, se entregaron al laboratorio 54.103 g de cotiledones y

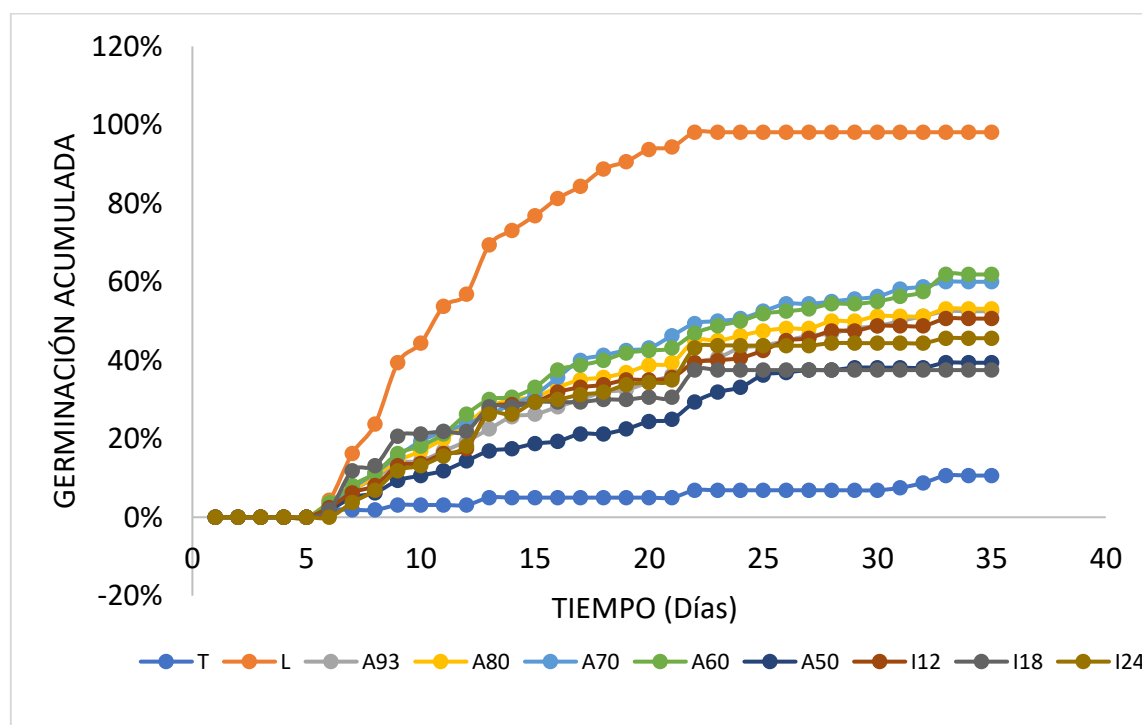
45.989 g de cubierta seminal, ambas muestras deshidratadas, con un total de 100.092 g de semilla seca.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación

Los resultados del análisis de varianza muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$) y bloques. La prueba de Tukey arrojó que el tratamiento de lijado (L), fue superior con 98.1% de germinación, los tratamientos A60, A70, A80, A93 e I35 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, pero fueron superiores al resto de tratamientos (I60, A50, I45 y T), con una germinación de 45.6, 39.4, 37.5 y 10.6% respectivamente (Figura 1, Cuadro 1).

Figura 1. Germinación acumulada de los tratamientos: control (T), lijado (L), inmersión en agua hirviendo (93°C) (A93), inmersión en agua a temperaturas de 80 °C (A80), 70 °C (A70), 60 °C (A60), 50 °C (A50), inmersión en NaOH por 12 h (I12), 18 h (I18) y 24 h (I24).



Cuadro 1. ANOVA de capacidad germinativa de *E. cyclocarpum*

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Tratamientos	9	35226.56	3914.06	83.99	<0.0001
Bloques	7	592.19	84.59	1.82	0.0998
Error	63	2935.94	46.60		
Total corregido	79	38754.69			

Cuadro 2. Comparación de medias (Prueba Tukey) de la capacidad germinativa de *E. cyclocarpum*.

Tratamiento	Media (%) *
L	98.1 a
A60	61.9 b
A70	60.0 cb
A80	53.1 cbd
A93	52.5 cbd
I35	50.6 cd
I60	45.6 ed
A50	39.4 e
I45	37.5 e
T	10.6 f

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

El tratamiento de lijado obtuvo germinación de 98.13% y como energía germinativa tardó 13 días para llegar al 70% de la germinación final. Por otro lado, el testigo que tuvo la germinación más baja, 10.63%, y tuvo una energía germinativa de 19 días.

Cuadro 3. ANOVA de energía germinativa de *E. cyclocarpum*.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	9	297.200	33.0222	0.85	0.5761
Bloques	7	173.600	24.8000	10.64	0.7241
Error	63	2455.5000	38.974		
Total corregido	79	2926.2000			

Cuadro 419. Comparación de medias (Tukey) de energía germinativa de *E. cyclocarpum*.

Tratamiento	Media (días)*
A93	19.4a
T	19.4 a
A60	19.3 a
I12	19.1 a
A50	19.0 a
A80	18.4 a
A70	18.0 a
I24	16.8 a
I18	16.3 a
L	13.0 a

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

La semilla de *Enterolobium cyclocarpum* presentó una buena germinación, el tratamiento de lijado (L), se obtuvo 98.3%, los tratamientos A60, A70, A80, A93 e I35 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, pero fueron superiores al resto de tratamientos y el control (I60, A50, I45 y T) con una germinación de 45.6, 39.4, 37.5 y 10.6%, respectivamente. A las especies tropicales, como *E. cyclocarpum*, se le considera una especie ruderal de sucesión secundaria con semillas recalcitrantes, pero los resultados obtenidos demuestran lo contrario, que se trata de una semilla ortodoxa gracias a su latencia física. Una evidencia de la variabilidad de la latencia física en esta especie, la dan Arreola *et al.* (2021), quienes refieren que semilla de esta especie, recolectada de Michoacán, germinó a 100 y 98% al ser lijada y tratada con agua hirviendo por 24 h, respectivamente. El efecto del primer tratamiento fue el mismo para dicho estudio y para el presente trabajo, pero el remojo en agua hirviendo para dejar en remojo 24 h, mostró diferencias, lo que marca a su vez distintas intensidades en la latencia de ambas procedencias (y épocas de recolección posiblemente también) de la semilla de esta especie.

Anatomía cubierta seminal

De las 13 especies de leguminosas observadas en el MEB, tuvieron presentes en la cubierta seminal de cuatro a ocho capas celulares; nueve presentaron de una a tres capas de osteoesclereidas, el resto de especies de leguminosas que no presentan dicha capa pertenecen a los géneros *Vachellia* y *Erythrina*, la existencia de osteoesclereidas posiblemente hace posible que la latencia física sea mayor. Lo anterior se pudo observar al momento de obtener

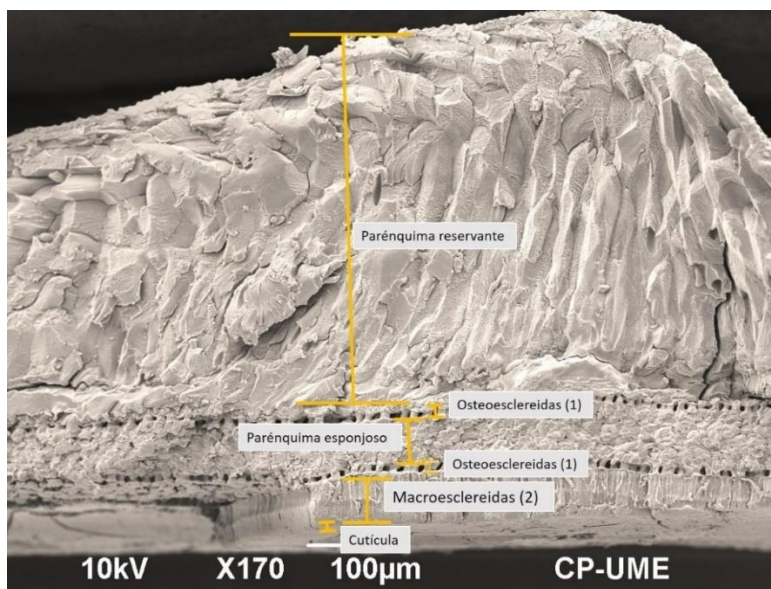
la muestra del laboratorio, pues semillas como *E. cyclocarpum*, *Ebenopsis ebano*, *Delonix regia* estaban muy duras y fue más complicado obtener sus muestras. La dureza de la semilla de *Stylosanthes hamata* (L.) Taub., está relacionada con la presencia de un micropilo y un hilo sellados, una epidermis compuesta por macroesclereidas en empalizada (Castillo y Guenni, 2001).

Enterolobium cyclocarpum recolectado en 1983 y *Delonix regia* son las especies que tienen ocho capas de tejidos y de estas capas tres son de osteoesclereidas. *Enterolobium cyclocarpum* recolectado en 2016, *Ebenopsis ebano*, *Prosopis glandulosa* y *Prosopis laevigata* presentaron siete capas de tejidos. *Vachellia farnesiana* y *Vachellia pennatula* tuvieron seis capas de tejidos. *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Vachellia schaffneri* y *Lupinus* sp., exhibieron cinco capas. *Erythrina coralloides*, *Mucuna* sp., *Lupinus montanus*, *Sapindus* sp., presentaron cuatro capas.

Es notorio que las especies de *Vachellia* (tribu Acacieae) estudiadas carecen de osteoesclerénquima y es conveniente verificar si otras especies de dicho género lo presentan. En cambio, en los géneros *Mucuna* y *Erythrina* (ambas de la misma tribu, Phaseolae), dicho tejido aparece en la primera, pero no en la segunda. Asimismo, el parénquima en empalizada solo se observó en *Enterolobium*, *Ebenopsis* y *Vachellia* (las dos primeras de la tribu Ingeae, la tercera Acacieae). De igual forma es conveniente comprobar, en estudios futuros, si este último tejido se observa en más especies de los géneros referidos y no en las otras, de modo que estas características puedan considerarse como típicas de las especies y tribus. Desde luego, también cabe la posibilidad de variación en grosor y en capas existentes en diferentes partes de la semilla y de variabilidad intraespecífica. La cubierta representa un carácter sujeto a la variabilidad genética, de ahí la variabilidad observada entre especies y dentro de *E. cyclocarpum*, además de la variabilidad relativa a las partes de la semilla (Niembro, 1988) donde se logró obtener la muestra para el análisis microscópico.

A continuación, se presentan imágenes con una breve descripción de cada capa celular presente en la cubierta seminal, analizadas y obtenidas del MEB, un ejemplo representativo de cada tribu:

Figura 2. Capas celulares de cubierta seminal de *Prosopis glandulosa*



Cutícula: tiene una superficie con textura que parece de “palomitas de maíz” y presenta agrietamientos longitudinales, transversales y de esquina, es la capa celular más delgada.

Macroesclereidas: líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, es posible apreciar dos niveles de estas células empalmadas, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, aunque sea una capa compacta se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la tercera capa de mayor grosor presente en la cubierta seminal de esta especie.

Osteoesclereidas: una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la cuarta capa más gruesa observada.

Parénquima esponjoso: es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a una “esponja” pero en esta especie se presenta compacta.

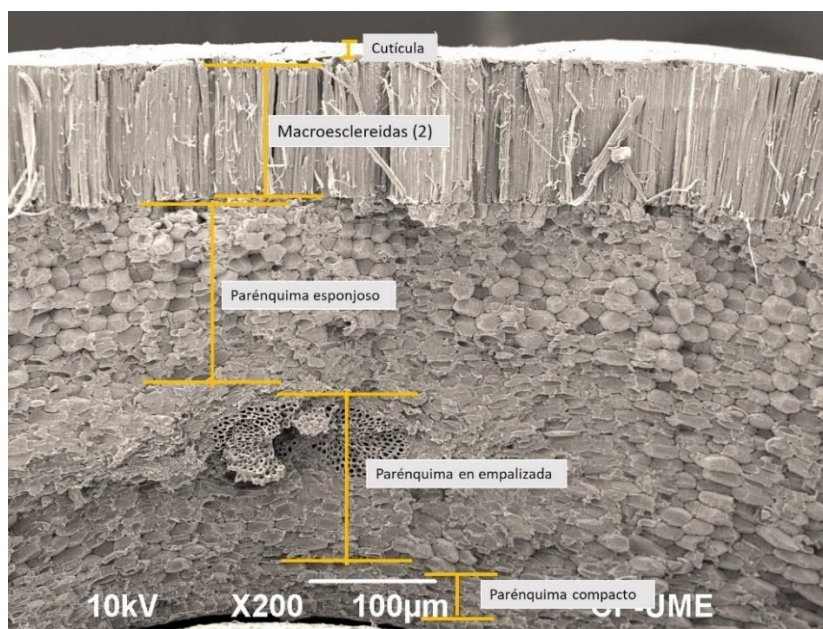
Osteoesclereidas: una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la cuarta capa más gruesa que presenta la especie. Esta especie cuenta con un total de dos capas de osteoesclereidas.

Parénquima reservante: es la primera capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja “piedra caliza y dura”, puesta de manera vertical y

compactas. Aunque es la capa de mayor grosor, este grosor varió alrededor de los cotiledones, lo cual se debe a la forma de la semilla (Figura 2).

Tribu Acacieae: Vachellia pennatula

Figura 3. Capas celulares de cubierta seminal de *Vachellia pennatula*.



Cutícula: tiene una superficie con textura tipo “palomitas de maíz”, presenta agrietamientos longitudinales, transversales y de esquina, es la capa celular más delgada de la cubierta seminal.

Macroesclereidas: dos niveles de líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, hay un grosor distinto en ambos niveles, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, es compacta y la segunda capa de mayor grosor presente.

Parénquima esponjoso: es la capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “pelotitas compactas”.

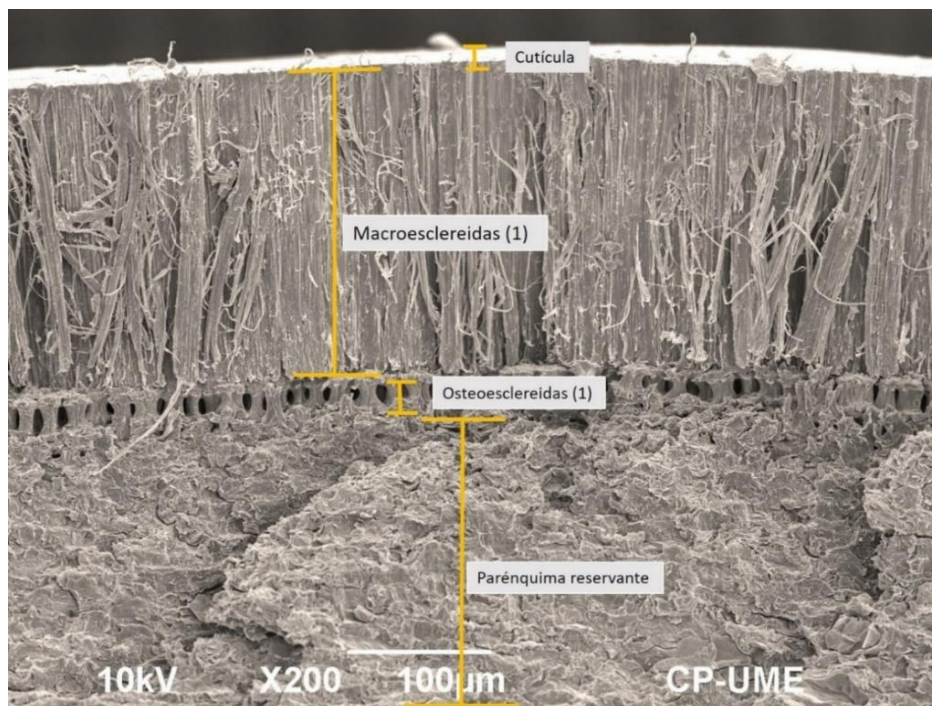
Parénquima en empalizada: tercera capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, con pequeñas formas alargadas y compactas acomodadas horizontalmente como una “pared de ladrillo”.

Parénquima compacto: es la cuarta capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, capa con estructura de “bolitas compactas”, y la que está junto al embrión (Figura 3). La estructura de la cubierta seminal de esta y las demás especies de *Vachellia* y *Prosopis*,

muestra correspondencia con la referida por Illescas *et al.* (en prensa) para muestras de las mismas procedencias.

Tribu Phaseoleae: Mucuna sp.

Figura 4. Capas celulares de cubierta seminal de *Mucuna sp.*



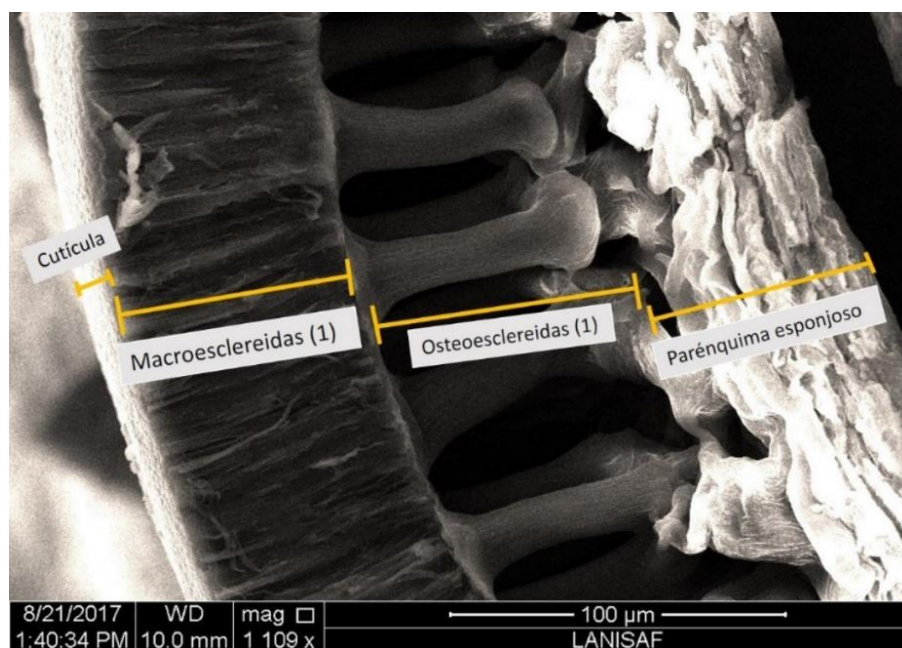
Cutícula: tiene una superficie lisa con textura agrietada y presenta agrietamientos longitudinales, transversales y de esquina, es la capa celular más delgada de la cubierta seminal.

Macroesclereidas: un nivel de líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, es la capa de mayor grosor presente en la cubierta seminal de esta especie.

Osteoesclereidas: una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la tercera capa más gruesa observada en la especie.

Parénquima reservante: es la capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja “piedra caliza y dura”, puesta de manera vertical y compactas. Aunque este grosor puedes variar alrededor de los cotiledones esto se debe a la forma de la semilla (Figura 4).

Figura 5. Capas celulares de cubierta seminal de *Lupinus montanus*



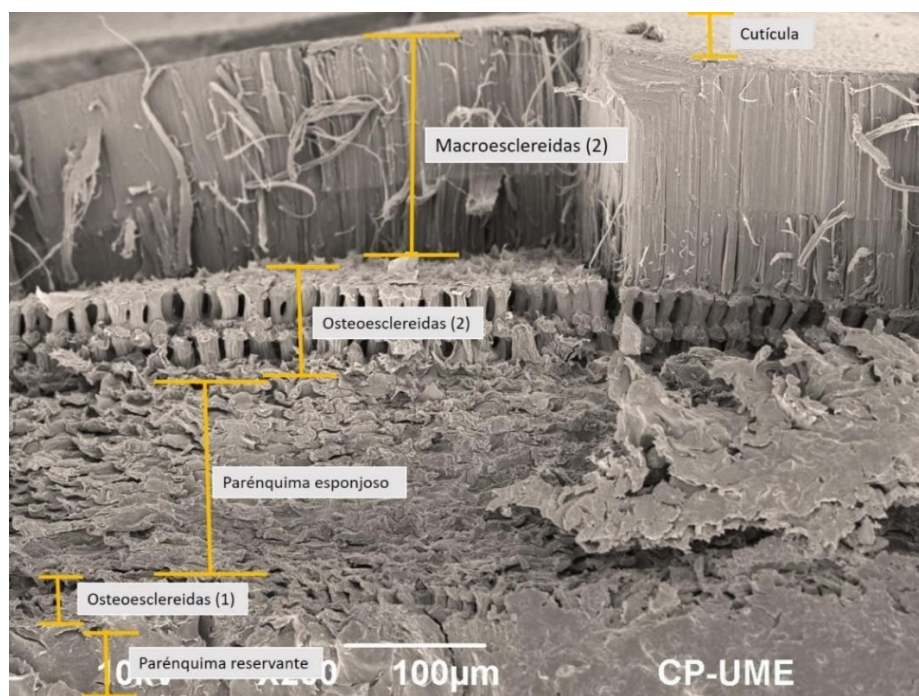
Cutícula: tiene una superficie lisa con pequeñas formas semicirculares aglomeradas, es la capa celular más delgada de la cubierta seminal.

Macroesclereidas: un nivel de líneas de células alargadas y compactas acomodadas verticalmente, al verlas con detalle parecen ser huecas, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne”, es la capa de mayor grosor presente en la cubierta seminal de esta especie.

Osteoesclereidas: una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados los extremos, acomodado en un solo nivel, es la segunda capa de mayor grosor. Que observándolas a detalle en otras imágenes obtenidas también son huecas.

Parénquima esponjoso: es la tercera capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “hojuelas empalmadas” y compactas, que está junto al embrión (Figura 5).

Figura 6. Capas celulares de cubierta seminal de *Delonix regia*



Cutícula: tiene una superficie con textura parecidas a dunas y presenta agrietamientos longitudinales, transversales y de esquina, es la capa celular más delgada de la cubierta seminal.

Macroesclereidas: líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, es posible apreciar dos niveles de estas células empalmadas, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne” compactas. Es la tercera capa de mayor grosor.

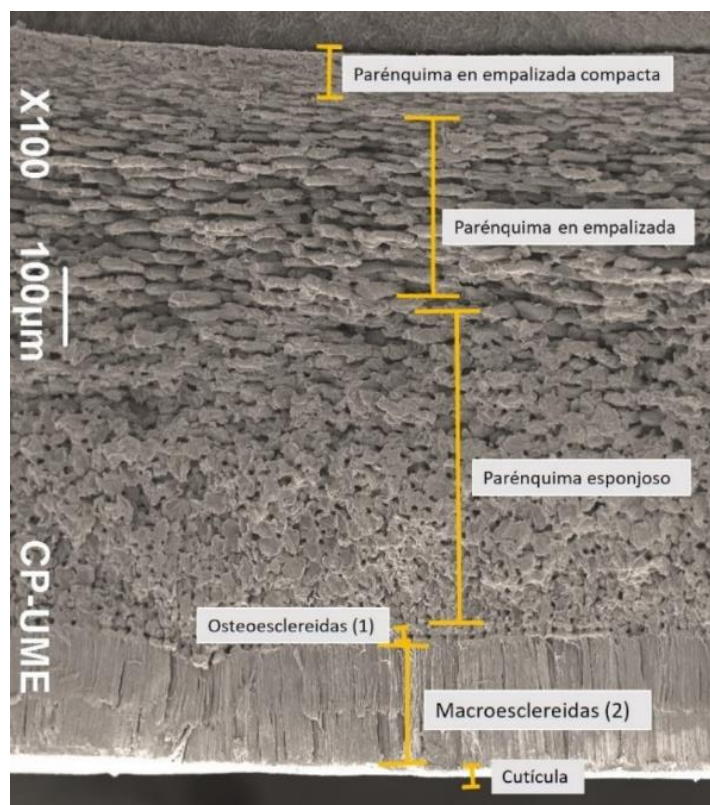
Osteoesclereidas: dos niveles de capas de células columnares en forma de hueso, ensanchados en los extremos; la cuarta de mayor grosor.

Parénquima esponjoso: es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “hojuelas”, acomodadas horizontalmente y compactas.

Osteoesclereidas: un nivel de capas de células columnares en forma de hueso, ensanchados en los extremos, es la quinta capa de mayor grosor.

Parénquima reservante: es la capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a “madera rasgada” y compacta, aunque es la capa de mayor grosor, este varía alrededor de los cotiledones, lo cual se debe a la forma de la semilla (Figura 6).

Figura 7. Estructuras de la cubierta seminal de *Enterolobium cyclocarpum* recolectada en 2019



La siguiente descripción es de la semilla recolectada en 2019.

Cutícula: tiene una superficie de textura rugosa y presenta agrietamiento tipo “piel de cocodrilo”, aunque también se aprecian agrietamiento transversal y de esquina, es la capa más delgada.

Macroesclereidas: líneas de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, es posible apreciar dos niveles de estas células empalmadas, la textura de esta capa compacta se asemeja a “hebras de carne”; es la tercera capa de mayor grosor presente.

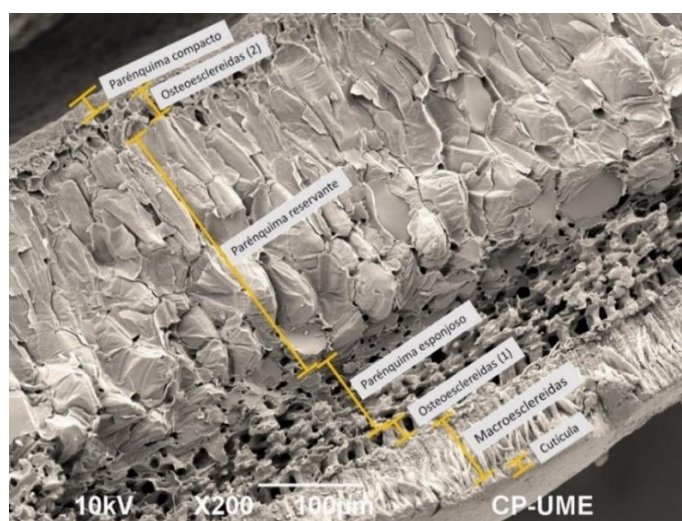
Osteoesclereidas: una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la quinta capa en grosor.

Parénquima esponjoso: capa más gruesa de la cubierta, su estructura semeja una “esponja porosa”.

Parénquima en empalizada: segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, con pequeñas formas alargadas acomodadas horizontalmente como una “pared de ladrillo”.

Parénquima en empalizada compacto: es la cuarta capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, con pequeñas formas alargadas semejantes a un “grano de arroz” acomodadas horizontalmente como una “pared de ladrillo”, es una capa compacta, y la que está más interiormente junto al embrión (Figura 7).

Figura 8. Estructuras de la cubierta seminal de *Enterolobium cyclocarpum* recolectada en 1983.



La descripción que sigue, se refiere a la semilla recolectada en 1983.

Cutícula: tiene una superficie lisa y con leves hundimientos similar a la superficie de una papa, es la capa celular más delgada de la cubierta seminal.

Macroescleridas: un nivel de células alargadas, gruesas y compactas acomodadas verticalmente, la textura de esta capa se asemeja a “hebras de carne” se logran apreciar pequeños espacios vacíos, es la tercera capa en grosor.

Osteoescleridas: una capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, acomodado en un solo nivel, es la quinta capa más gruesa.

Parénquima esponjoso: es la segunda capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja a una “galería de hormigas”.

Parénquima reservante: capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, su estructura se asemeja “hojuelas empalmadas”, acomodadas de manera vertical y compactas.

Osteoesclereidas: son dos niveles de capa de células columnares en forma de hueso, ensanchados en las bases, es la segunda capa más cercana al embrión. Esta especie en total presenta tres capas de osteoesclereidas.

Parénquima compacto: es la sexta capa de mayor grosor de la cubierta seminal de esta especie, con textura ondulada con superficie lisa y compacta, es la que está más cerca del embrión (Figura 8).

Al observar las **Figuras 7 y 8**, es notoria la diferencia que presenta la cubierta seminal de ambas muestras de semilla de la misma especie, esto se debe a que son especies de distinta procedencia y años de recolección. Para *Enterolobium cyclocarpum* recolectada en 1983 en Chiapas, la estructura y diferenciación de capas celulares con alta probabilidad está ligada el tiempo que estuvo almacenada (37 años) es inminente la deshidratación de la cubierta seminal, al momento de la obtención de la muestra se observaron los cotiledones húmedos, probablemente fue una semilla con viabilidad después de tanto tiempo. Para *Enterolobium cyclocarpum* recolectada en 2019, no se aprecia esa marcada diferenciación entre capas esto debido a que el tiempo de recolección es corto y posiblemente conservara humedad. Los organismos de una misma especie muestran variación en sus distintos caracteres, entre sitios y a veces entre años, conforme a las condiciones climatológicas imperantes, entre otros factores. Es posible que las diferencias observadas en esta especie obedezcan a dicha variabilidad, relacionada con recolección en distintas procedencias y años. En el **Cuadro 5**, se resumen las capas celulares presentes en la cubierta seminal de cada una de las especies observadas y comparadas con *E. cyclocarpum*.

Cuadro 520. Tejidos vegetales presentes en la cubierta seminal de las especies analizadas

ESPECIE	Cutícula	Macroesclereidas	Osteoesclereidas	Parénquima esponjoso	Parénquima en empalizada	Parénquima en empalizada compacta	Parénquima reservante	Parénquima compacto	Capas presentes en cubierta seminal
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (2016)	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓			7
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (1983)	✓	✓	✓✓✓	✓			✓	✓	8
<i>Ebenopsis ebano</i>	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓			7
<i>Prosopis glandulosa</i>	✓	✓✓	✓✓	✓			✓		7
<i>Prosopis laevigata</i>	✓	✓✓	✓✓	✓			✓		7
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	✓	✓✓	✓				✓		5
<i>Vachellia farnesiana</i>	✓	✓✓		✓	✓			✓	6
<i>Vachellia schaffneri</i>	✓	✓		✓	✓			✓	5
<i>Vachellia pennatula</i>	✓	✓✓		✓	✓			✓	6
<i>Erythrina coralloides</i>	✓	✓		✓				✓	4
<i>Mucuna</i> sp.	✓	✓	✓				✓		4
<i>Lupinus montanus</i>	✓	✓	✓	✓					4
<i>Lupinus</i> sp.	✓	✓✓	✓				✓		5
<i>Delonix regia</i>	✓	✓✓	✓✓✓	✓			✓		8

✓ Capa de tejido vegetal presente en la cubierta seminal.

Análisis proximal

El análisis proximal (**Cuadro 6**) se realizó principalmente para explorar la presencia del porcentaje lignina en la cubierta seminal, que es la estructura de la semilla a la cual se enfocó más este estudio. El análisis realizado fue por separado para cubierta seminal y cotiledones. En cotiledones la presencia de lignina es muy baja en base seca y base húmeda, de 1.30 y 1.21%, respectivamente. Sin embargo, en la cubierta seminal se aprecian valores para la lignina de 21.00 y 18.90% en base seca y base húmeda, respectivamente. Es de notarse que variables como fibra cruda (BS: 28.67%; BH: 25.81%), fibra detergente Neutro (BS: 65.54%; BH: 58.98%) y Fibra Detergente Ácido (BS: 46.08%; BH: 41.47%), tanto en base húmeda como seca, superan notablemente a los resultados obtenidos para los cotiledones.

Cuadro 6. Resultado de análisis proximal de cotiledones y cubierta seminal de *E. cyclocarpum*.

	Cotiledones		Cubierta seminal	
	Base		Base	
	Seca (%)	Húmeda (%)	Seca (%)	Húmeda (%)
Humedad (H)	0.00	6.32	0.00	10.00
Materia seca (MS)	100.00	93.68	100.00	90.00
Cenizas (Cen)	3.36	3.15	5.23	4.71
Materia orgánica (MO)	96.64	90.52	94.77	85.29
Proteína cruda (PC)	26.08	24.43	3.74	3.37
Extracto etéreo (EE)	1.84	1.73	2.49	2.24
Fibra cruda (FC)	2.66	2.49	28.67	25.81
Extracto libre de nitrógeno (ELN)	45.24	42.38	23.00	20.70
Fibra detergente neutro (FDN)	23.47	21.98	65.54	58.98
Fibra detergente ácido (FDA)	4.63	4.34	46.08	41.47
Lignina (L)	1.30	1.21	21.00	18.90

Las partes digeribles de un alimento por los rumiantes son la celulosa y hemicelulosa de la pared celular no unidas a la lignina (Mejía-Delgadillo *et al.*, 2011). Cuando un rumiante ingiere este tipo de semillas normalmente no pueden ser digeridas del todo a causa de la lignina y el paso por los jugos gástricos del tracto digestivo del animal representa un

tratamiento escarificador natural. La lignina está involucrada directamente con la dureza de una semilla, con su latencia física. De forma similar, un análisis histoquímico realizado en semillas de *Sophora tomentosa* y *Eythrina speciosa* demostró que en la región hiliar de ambas especies se encuentra principalmente compuesta de lignina en la parte superior de estas células (Delgado-Luzia, 2015). Entre las capas celulares de la cubierta seminal detectadas en ambas especies de *E. cyclocarpum* se encuentran capas de osteoesclereidas semejantes a columnas ensanchadas en los extremos; probablemente en los extremos de las osteoesclereidas es donde se concentraba parte de la lignina que fue determinada por el análisis proximal. Desde el punto de vista fisiológico y químico, el mecanismo de latencia física por la cubierta seminal, se explica por la mayor cantidad de componentes con características que repelen el agua y son cementantes, tales como polifenoles, ligninas, taninos condensados y sustancias pécticas y menor proporción de celulosa y hemicelulosa (Galussi *et al.*, 2015). Sin embargo, debe considerarse que la lignina se encuentra distribuida en las diferentes capas celulares de la cubierta.

CONCLUSIONES

Se observó variabilidad en el número y tipo de capas presentes en la cubierta seminal de las 13 especies estudiadas y también en la de dos procedencias y diferentes años de recolección de *E. cyclocarpum*. Esta evidencia más la variabilidad en la efectividad del tratamiento escarificador de inmersión en agua hirviendo y remojo por 24 horas de la semilla del presente estudio con respecto a otra investigación, revelan que hay variabilidad en las características de la cubierta seminal y en la intensidad de la latencia física de estas leguminosas estudiadas, pues finalmente la cubierta seminal y la intensidad de su latencia física, son un carácter que varía con la variabilidad que también exhibe el ambiente en espacio y tiempo. El análisis químico reveló abundancia de lignina, que sin duda contribuye también a conferir dureza a los tejidos de la cubierta seminal.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca para la realización de la Maestría en Ciencia y las becas de Apoyos Complementarios para mujeres indígenas otorgada para la realización de este estudio. A la dirección General de Investigación y Posgrado (DGIP), y la Maestría en Conciencia en Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo, por el apoyo otorgado durante el desarrollo de este proyecto.

REFERENCIAS

- Affonso-Sampaio, D., Dos Santos-Abreu, H., Silveira-Augusto, L. D., Da Silva, B., y Marcela-Ibanez, C. (2016). Perfil lignoídico del tegumento de semillas de *Araucaria angustifolia*. *Bosque*, 37(3), 549–555. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002016000300012>
- Bonawitz, N.D., y Chapple C. (2010). The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetic* 44:337-63. doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163508. PMID: 20809799
- Castillo, R., y Guenni, O. (2001). Latencia en semillas de *Stylosanthes hamata* (Leguminosae) y su relación con la morfología de la cubierta seminal. *Revista de Biología Tropical*, 49(1), 287–299. Recuperado de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/16929/16386>
- Delgado-Luzia, C. M., de Paula-Souza, A., Santos, M., y Paulilo-Silveira, M. T. (2015). Dormancy-breaking requirements of *Sophora tomentosa* and *Erythrina speciosa* (Fabaceae) seeds. *Revista de Biología Tropical*, 63(1), 285–294. <https://doi.org/10.15517/rbt.v63i1.13903>
- Galussi, A. A., Argüello, J. A., Cerana, M. M., Maximino, M., y Moya, M. E. (2015). Características anatómicas y químicas del tegumento seminal de *Medicago sativa* L. (alfalfa) cv. Baralfa 85 y su asociación con la dormición. *Phyton*, 84(1), 163–175. Recuperado de: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/38236/CONICET_Digital_Nro.a09261b9-a7f6-438e-97d5-a3998b4e1832_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Grabber J.H. (2005). How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. *Crop Science*. 45:820-81 <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2004.0191>
- Lagunes-Fortiz, E., y Zavaleta-Mejía, E. (2016). Función de la Lignina en la Interacción Planta-Nematodos Endoparásitos Sedentarios. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 43–63. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1506-7>

- Leython, S., y Jáuregui, D. (2008). Morfología de la semilla y anatomía de la cubierta seminal de cinco especies de *Calliandra* (Leguminosae-Mimosoideae) de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 56(3), 1075–1086. Recuperado de: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v56n3/art09v56n3.pdf>
- Mejía-Delgadillo, M. A., Álvarez-Almora, E. G., Pinos-Rodríguez, J. M., Ponce-Medina, J. F., Plascencia-Jorquera, A., Escoboza-García, L. F., y Rodríguez-García, J. (2011). Digestion of wheat hay as compared to alfalfa and ryegrass in steers. *Agrociencia* 45, 13–21.
- Niembro R., A. (1988). Semillas de Árboles y Arbustos. México: Limusa.
- Pérez-Cortéz, S., Escala, M., y Tillett, S. (2005). Anatomía de la cubierta seminal de ocho especies de *Passiflora* L., subgénero *Passiflora*. *Acta Botanica Venezuelica*, 28(2), 337–348. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/862/86228210.pdf>
- Pita-Villamil, J. M., y Perez-García, F. (1998). Germinación de semillas. Hojas Divulgadoras. Núm. 2090-HD. Ministro de Agricultura Pesca y alimentación, Madrid, 20 pp. Recuperado en: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1998_2090.pdf
- SAS Institute Inc (2011). The SAS System, Version 9.0. Recuperado de https://www.sas.com/es_mx/software/stat.html
- Silva-Silva, B. M., Oliveira-Silva, C., Vitti-Moro, F., Daiton-Vieira, R. (2018). Seed anatomy and water uptake and their relation to seed dormancy of *Ormosia paraensis* Ducke. *Journal of Seed Science*, 40(3), 237-245. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n3177599>
- Vozzo, J. A. (Ed.). (2010). Manual de Semillas de Árboles Tropicales. Missouri: USDA Forest Service. Recuperado de: <https://rngr.net/publications/manual-de-semillas-de-arboles-tropicales>