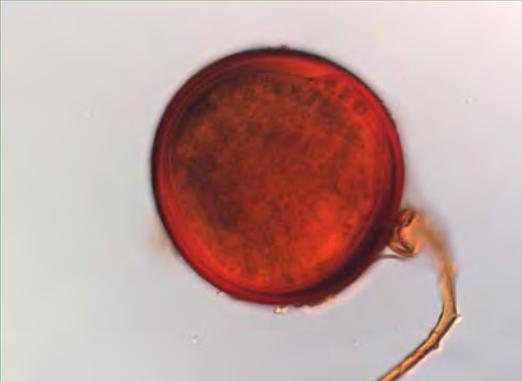


ECOTECNOLOGÍAS PARA LA RESTAURACIÓN ECOLÓGICA: LOS TRATAMIENTOS DE SEMILLAS Y LAS MICORRIZAS

JORGE A. SÁNCHEZ RENDÓN y EDUARDO FURRAZOLA GÓMEZ
(EDITORES)



FONDO DE ADAPTACIÓN



Asociación
de las personas
y los pueblos

ECOTECNOLOGÍAS PARA LA RESTAURACIÓN ECOLÓGICA: LOS TRATAMIENTOS DE SEMILLAS Y LAS MICORRIZAS

Jorge A. Sánchez Rendón y Eduardo Furrázola Gómez
(Editores)



INSTITUTO DE ECOLOGÍA Y SISTEMÁTICA
LA HABANA

2018

Este libro es producido por el proyecto “Reducción de la vulnerabilidad a las inundaciones costeras mediante adaptación basada en ecosistema en el sur de las provincias de Artemisa y Mayabeque” financiado por el Fondo para el Medio Ambiente Mundial (GEF) e implementado por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD).



La información reflejada en este libro es solo responsabilidad de sus autores y no representa, necesariamente, los puntos de vistas del PNUD ni del sistema de Naciones Unidas. Los textos pueden ser utilizados total o parcialmente citando la fuente original.

®Derechos reservados

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra sin la autorización escrita del Instituto de Ecología y Sistemática (CITMA, República de Cuba) y de sus autores.

©Instituto de Ecología y Sistemática

© Jorge A. Sánchez Rendón

© Eduardo Furrázola Gómez

Citación recomendada para el libro:

Sánchez JA & E Furrázola. 2018. *Ecotecnologías para la restauración ecológica: los tratamientos de semillas y las micorrizas*. Editorial Academia, La Habana, 119 pp.

Diseño y Maquetación: Carlos A. Mancina

ISBN: 978-959-270-384-1 (Impreso)

ISBN: 978-959-270-385-8 (Digital)



A nuestro colega, maestro y amigo Dr.C. Ricardo Antonio
Herrera-Peraza, el iniciador de la implementación de las
ecotecnologías en Cuba



Cedrela odorata

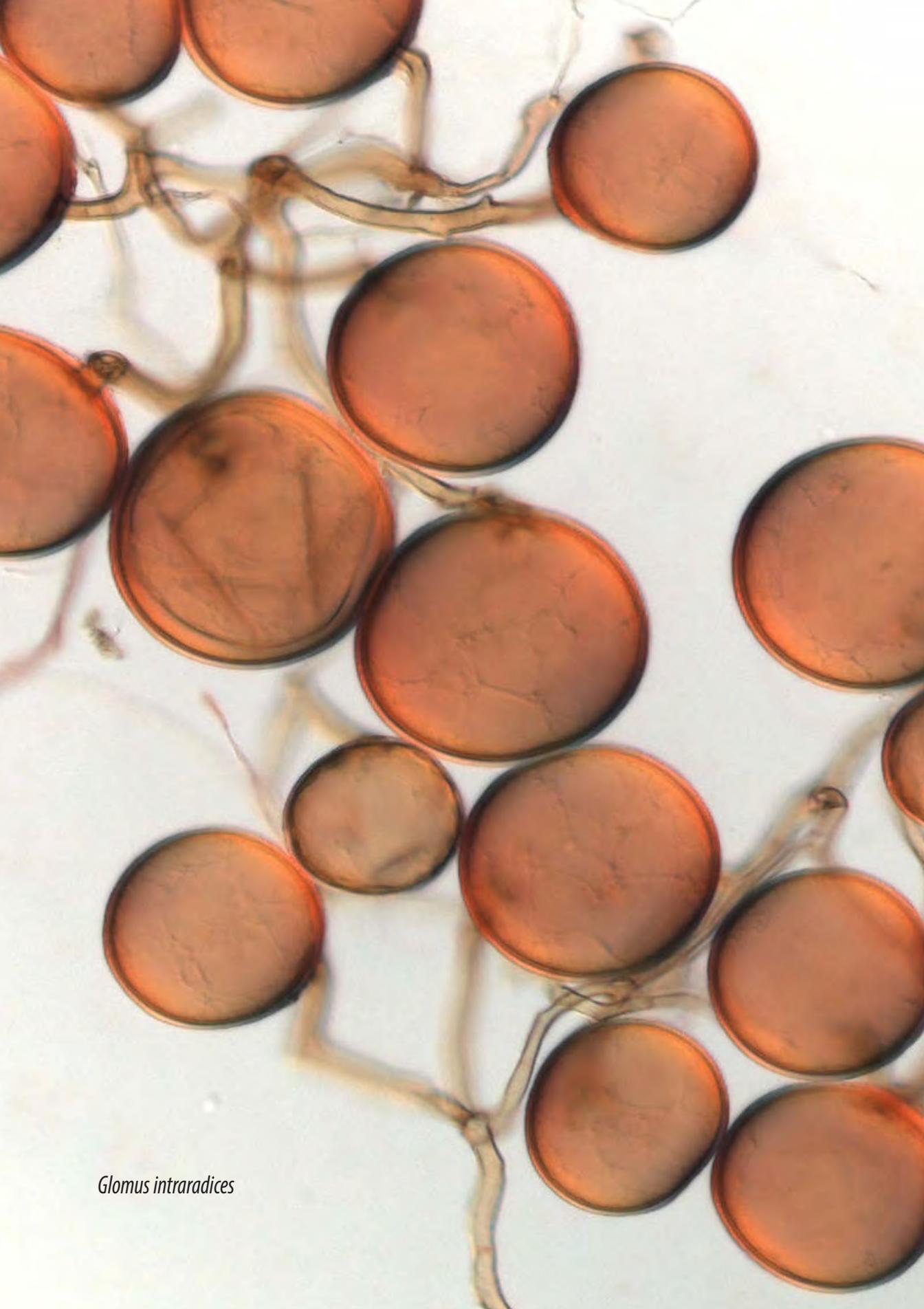
PRÓLOGO

El libro *Ecotecnologías para la restauración ecológica: los tratamientos de semillas y las micorrizas*, de Jorge A. Sánchez, Eduardo Furrázola, Mayté Pernús y Yamir Torres-Arias, presenta las experiencias acumuladas por más de 20 años en el Instituto de Ecología y Sistemática en las temáticas de tratamientos pregerminativos de semillas y biofertilizantes micorrízicos. Las ecotecnologías de referencia permiten desarrollar proyectos de recuperación de paisajes tropicales sometidos a distintas presiones ambientales, o bien conservar o recuperar bancos de germoplasmas. Ambas tecnologías ecológicas pueden contribuir a la seguridad alimentaria de países en vías de desarrollo, a la conservación de la diversidad biológica y a la restauración ecológica bajo múltiples condiciones de estrés; tal como sucede en los posibles escenarios ambientales inducidos por el cambio climático antropogénico.

Se presenta un actualizado y detallado recorrido por el estado del conocimiento en ambas temáticas a nivel mundial. La primera parte está dedicada a las semillas y en ella encontramos un análisis pormenorizado de los diferentes tratamientos seminales de acuerdo con sus objetivos. La segunda parte aborda de forma exhaustiva el papel ecofisiológico de la simbiosis micorrízica y las experiencias de Cuba y la región del Caribe en la producción de inóculos micorrízicos. En ambos casos se describen aspectos básicos a seguir para la implementación de estas tecnologías y sus limitaciones, mostrando gráficos y fotos que ayudan a la comprensión del texto. Por último, se presenta una síntesis y perspectivas de aplicación de ambas ecotecnologías, además de un glosario de términos.

La obra posee elevado rigor científico y propone soluciones prácticas que pueden ser implementadas para mejorar la germinación y establecimiento de especies agrícolas y forestales sometidas a estrés ambiental, de referencia para especialistas cubanos vinculados con la introducción de resultados a la práctica social, así como para hispanoparlantes de países del área. Constituye un homenaje a la memoria del Dr. C. Ricardo A. Herrera Peraza, iniciador del desarrollo de la introducción de las ecotecnologías en Cuba.

Prof. Dr. C. René P. Capote López
Investigador y Profesor Titular
Académico de Mérito



Glomus intraradices

PRESENTACIÓN

Los ciclos de hidratación-deshidratación (HD) que sufren las semillas en el suelo y las simbiosis de los hongos micorrizógenos con las raíces son procesos biológicos que pueden ser implementados como ecotecnologías para mejorar el funcionamiento de las plantas. De hecho, se emplean ampliamente como tratamientos pregerminativos de HD e inóculos micorrizógenos para perfeccionar el comportamiento agronómico (germinación, establecimiento, floración y rendimientos) de una gran diversidad de plantas cultivadas. Sin embargo, en especies silvestres nativas estas tecnologías ecológicas han sido escasamente aplicadas, aunque también han probado su efectividad para mejorar el establecimiento de dichas plantas en distintos escenarios ambientales (estrés hídrico, calórico, salinidad y acidez del suelo); aspectos que son de gran interés para la repoblación forestal y la restauración ecológica.

En la presente publicación se brindan los elementos necesarios, tanto teóricos como prácticos, para implementar dichas ecotecnologías en proyectos de recuperación de paisajes tropicales que se encuentran sometidos a distintas presiones ambientales, o bien para conservar o recuperar bancos de germoplasmas. También se ofrece información sobre el significado ecológico de cada proceso biológico y cómo pueden aplicarse dichas ecotecnologías de forma rápida y sencilla con bajos insumos. Ambas tecnologías ecológicas contribuyen a la seguridad alimentaria de países en vías de desarrollo, a la conservación de la diversidad biológica y a la restauración ecológica bajo múltiples condiciones de estrés; tal como sucede en el presente ambiente cubano y en los posibles ambientes inducidos por el cambio climático antropogénico.

Finalmente, el estado del conocimiento actual sobre los tratamientos pregerminativos de HD y las micorrizas a nivel internacional acumula suficientes evidencias de la efectividad de los mismos para mejorar el funcionamiento de las plantas. De este modo, esperamos que la obra sirva para la introducción de estas ecotecnologías en la agricultura tradicional y en proyectos de reforestación y de restauración ecológica. El libro va dirigido a especialistas cubanos (biólogos, agrónomos y forestales) vinculados con la introducción de resultados científico-técnicos a la práctica social, y también a hispanohablantes de países de América del Sur, Centroamérica y el Caribe. De ahí, que la información se presentó con adecuado rigor científico. También podrá ser utilizado por estudiantes, técnicos y productores relacionados con la conservación del patrimonio vegetal y el desarrollo de sistemas agroecológicos.

TÉRMINOS DE REFERENCIAS: Agroecología, Biodiversidad, Cambio Climático, Ecofisiología Vegetal, Micorrizas Arbusculares, Restauración Ecológica, Seguridad Alimentaria, Semillas, Tecnologías Ecológicas, Tratamientos de Hidratación-Deshidratación.



AGRADECIMIENTOS

La obra científica fue resultado de la subvención de varios proyectos de Investigación-Desarrollo por la Agencia de Medio Ambiente (AMA) del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA). Igualmente parte de los fondos para las investigaciones fueron financiados por la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS, Suecia), por el Comité del MAB (UNESCO, Francia) y por proyectos regionales establecidos con universidades e instituciones de países de Latinoamérica, como Brasil, Ecuador, México y Venezuela.

Esta obra se publica gracias al apoyo financiero total del Proyecto “Reducción de la vulnerabilidad a las inundaciones costeras mediante adaptación basada en ecosistema en el sur de las provincias de Artemisa y Mayabeque”, conocido como “Manglar Vivo”, que es financiado por el Fondo de Adaptación al Cambio Climático e implementado por la Agencia de Medio Ambiente y la oficina del PNUD en Cuba. También este libro fue desarrollado en su última etapa como parte del proyecto “Conservación y uso sostenible de los componentes de la diversidad biológica en los ecosistemas montañosos Guamuaya y Guaniguanico bajo un enfoque paisajístico”.

Los autores agradecen al Dr.C. Carlos A. Mancina por la revisión inicial del manuscrito, así como por habernos entregado parte de su limitado tiempo para diseñar y hacer la composición digital de la presente obra. También se agradece al Consejo Científico del Instituto de Ecología y Sistemática, en particular al Dr. C. René Pablo Capote y al M.Sc. Hermen Ferrás Álvarez, por la revisión crítica del manuscrito y a colegas de diversas instituciones que participaron en muchas de las experiencias que contribuyeron a la presente publicación. Agradecemos a la M.Sc. Guadalupe Bridón Calzado por su certera ayuda en el proceso editorial. Por último, reconocemos con afecto a nuestras familias por su apoyo y comprensión.



TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN/1

PARTE I. TRATAMIENTOS DE SEMILLAS/5

GENERALIDADES DE LOS TRATAMIENTOS PREGERMINATIVOS/5

ANTECEDENTES DE LOS TRATAMIENTOS DE HIDRATACIÓN-DESHIDRATACIÓN (HD)/10

PATRÓN DE IMBIBICIÓN Y SU RELACIÓN CON LOS TRATAMIENTOS DE HD/13

TECNOLOGÍAS EMPLEADAS EN LOS TRATAMIENTOS DE HD/16

SOLUCIONES UTILIZADAS EN LOS TRATAMIENTOS HÍDRICOS/25

TERMINOLOGÍAS DE LOS TRATAMIENTOS DE HD/27

FACTORES QUE AFECTAN A LOS TRATAMIENTOS DE HD/30

UTILIDAD DE LOS TRATAMIENTOS DE HD EN LA PRÁCTICA AGRÍCOLA/34

COMBINACIÓN DE TRATAMIENTOS DE SEMILLAS/46

SIGNIFICADO ECOLÓGICO DE LOS CICLOS DE HD/49

APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS DE HD DE FORMA RÁPIDA Y SENCILLA/51

PARTE II. LAS MICORRIZAS/55

GENERALIDADES DE LAS MICORRIZAS/55

ECTOMICORRIZAS/56

MICORRIZAS ARBUSCULARES (MA)/58

LAS MICORRIZAS Y LA SUCESIÓN VEGETAL/64

EXPERIENCIAS EN CUBA EN LA PRODUCCIÓN DE INÓCULOS MICORRÍZICOS/68

EXPERIENCIAS EN LA REGIÓN DEL CARIBE SOBRE EL ESTUDIO Y EMPLEO DE LA MA/71

MICORRIZAS EN VIVEROS FORESTALES/79

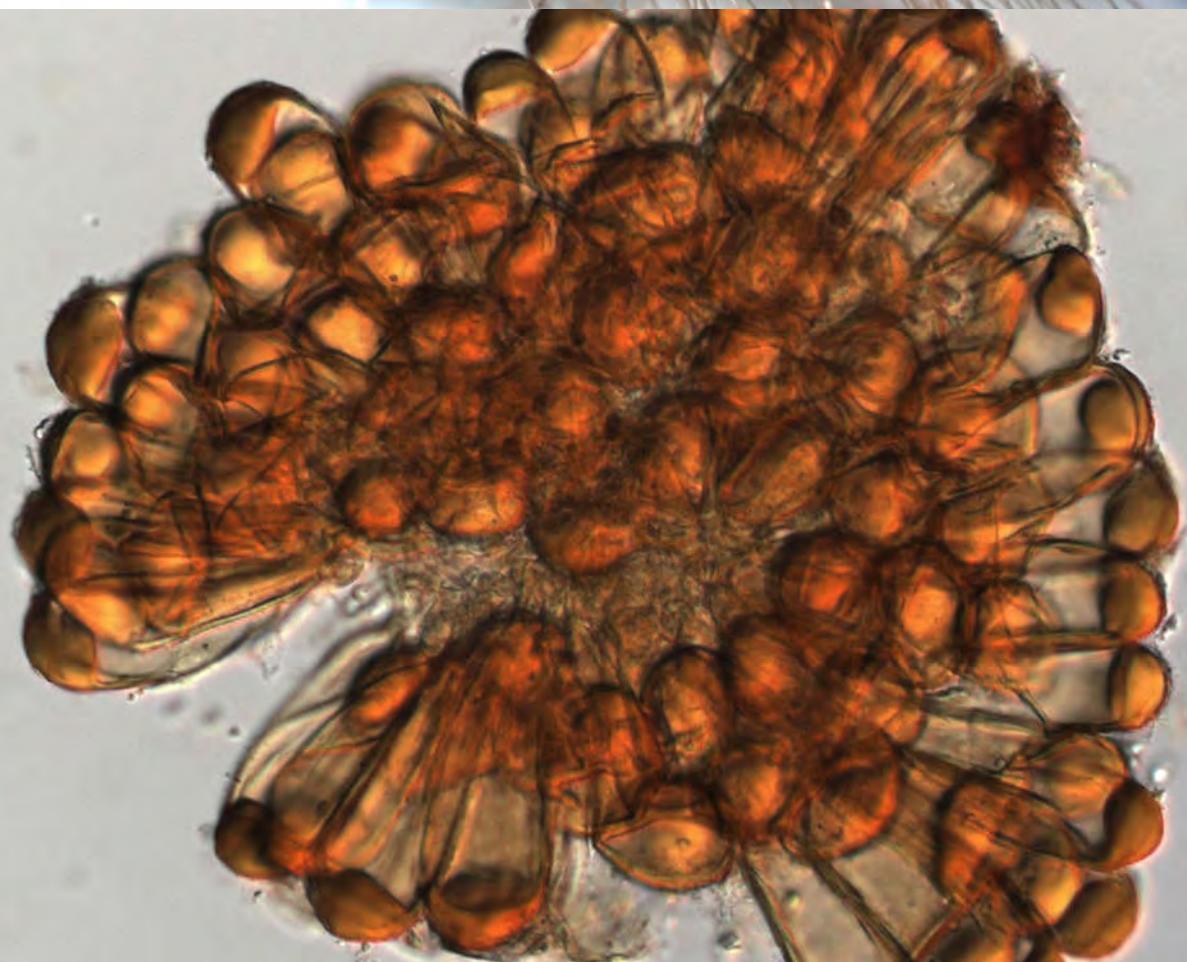
COMBINACIÓN DE BIOFERTILIZANTES/82

APLICACIÓN DE MICORRIZAS DE FORMA RÁPIDA Y SENCILLA/85

PARTE III. SÍNTESIS Y PERSPECTIVAS/93

GLOSARIO DE TÉRMINOS/97

LITERATURA CITADA/101



INTRODUCCIÓN

Jorge A. Sánchez y Eduardo Furrázola

La pérdida de los bosques tropicales se debe principalmente, en países en vías de desarrollo, al círculo vicioso del crecimiento poblacional y la pobreza persistente. También como agravante de la deforestación, desde hace algunos años, se reconoce el papel de la fragmentación y la degradación del hábitat como actores principales de los cambios en la estructura y función de los ecosistemas. En América Latina y el Caribe los suelos que sostienen las formaciones boscosas continúan disminuyendo, con la consiguiente pérdida de la biodiversidad y de los servicios ecosistémicos (FAO 2011); siendo las causas fundamentales de la deforestación el cambio de uso de la tierra (para fines agrícolas, la siembra de pastos, etc.) y la acelerada urbanización. La mayor pérdida de la cobertura vegetal en esta región tiene lugar en América Central, y se reconoce un incremento de las áreas boscosas en Chile, Costa Rica y Uruguay (FAO 2011).

En Latinoamérica además, existe un divorcio entre los fisiólogos y los forestales. Muchos investigadores que realizan estudios fisiológicos en los sistemas tropicales no tienen una formación adecuada para interpretar los datos (Andrade 2005); por lo que se hace necesario que se establezcan grupos multidisciplinarios de investigadores para dar una interpretación apropiada del estado del bosque. Tampoco se ha discutido mucho sobre la vulnerabilidad de los mecanismos de regeneración de las plantas a la variabilidad ambiental, principalmente climática, aunque se reconoce que el cambio climático antropogénico y la fragmentación del hábitat están entre

las principales amenazas para la diversidad biológica tropical. Por otra parte, la información que existe en el Neotrópico sobre los mecanismos de regeneración de las plantas nativas es muy escasa y en muchos casos, la que consta es extremadamente elemental (Baskin & Baskin 2014; Sánchez *et al.* 2015). Esto último, sin dudas, compromete la permanencia de las floras autóctonas de los ecosistemas tropicales, debido a que no existe una valoración cualitativa/cuantitativa sobre su capacidad de regeneración diferencial frente al estrés y en los posibles escenarios ambientales inducidos por el cambio climático (Meli 2003). Todo esto aumenta la fragilidad de muchas especies de animales y plantas a condiciones ambientales adversas; pero también crea condiciones favorables (es decir, nuevos hábitats) para la expansión de las especies exóticas invasoras (Cayuela 2006).

La falta de conocimiento sobre biología de la semilla de las especies autóctonas, también explica por qué en muchos sitios tropicales los proyectos de reforestación y de restauración con especies nativas fracasan. Esta situación es muy común en los viveros forestales de los llamados países del Tercer Mundo o subdesarrollados, donde los recursos materiales son muy limitados, tanto para las investigaciones ecológicas y forestales, como para la realización de atenciones silviculturales en las nuevas plantaciones. La gran mortalidad de plántulas se hace evidente durante la siembra directa de las semillas en el campo y también cuando las plántulas jóvenes son trasplantadas con previo endurecimiento

en vivero; aunque esto depende considerablemente de la selección de las especies y sitios a reforestar. De hecho, muchos autores proponen la siembra de árboles pioneros u otras especies nodrizas similares (o plantas facilitadoras), que con su crecimiento más acelerado y características funcionales únicas mejoran la calidad del terreno y protegen a las plántulas de especies de estadios más avanzados de la sucesión (Herrera *et al.* 1997; 2016; Rodrigues *et al.* 2009; Meli *et al.* 2014). Estas especies además, reducen los costos de mantenimiento de las plantaciones por su alta capacidad de establecimiento en sitios perturbados.

Por tanto, se hace necesario profundizar en dos líneas ecofisiológicas fundamentales para obtener mayores logros en la reconstrucción de los paisajes tropicales. La primera de ellas debe ir dirigida a aumentar los estudios relacionados con la Ecofisiología de la Germinación; este conocimiento es una herramienta clave para conocer la biología de la semilla de las especies nativas y con ello lograr plantaciones de calidad en el cultivo de los árboles en vivero y en condiciones de campo. La hipótesis de partida para llevar a cabo estos estudios es que cada especie tiene su propio mecanismo de reproducción o nicho de regeneración, aunque también existen patrones de regeneración asociados a grupos funcionales, estacionalidad climática, historia filogenética, etc. En segundo lugar, se deben implementar ecotecnologías o tecnologías ecológicas de bajos insumos que contribuyan de manera significativa a mejorar el funcionamiento de semillas y plantas en condiciones de vivero y de campo; sobre todo frente a condiciones ambientales adversas (por ejemplo, estrés calórico, hídrico, lumínico).

En este sentido, el conocimiento de la Ecofisiología Vegetal no solo nos

permite entender el funcionamiento de las plantas y sus posibles respuestas ante diferentes condiciones ambientales, sino que además sobre la base de este conocimiento se fundamentan muchas de las Ecotecnologías propuestas para la ecorestauración de los paisajes tropicales. Ellas siguen los pasos de la naturaleza, solo que a mayor velocidad, permitiendo de esta forma la reparación acelerada de los ecosistemas y de los servicios que prestan a la salud del medio ambiente y del hombre (Piñeiro *et al.* 2013).

El empleo de ecotecnologías en los planes de restauración ecológica también contribuirá de forma importante a mitigar los efectos del cambio climático global (Herrera *et al.* 1997). Sin embargo, la utilización de tecnologías ecológicas en proyectos de revegetación de sitios del Neotrópico es muy escasa y solo existen algunos reportes en países como Brasil, que muestran una alta tasa de reforestación en algunas regiones del país (Rodrigues *et al.* 2009); pero al mismo tiempo exhiben cierto grado de desarrollo industrial, que acelera la destrucción de los ecosistemas forestales.

Por definición, las ecotecnologías son el uso de medios tecnológicos para el manejo de los organismos y ecosistemas, basados en un conocimiento profundo de los principios en los cuales se fundamentan los sistemas ecológicos naturales y la transferencia de este conocimiento hacia el manejo de los mismos en forma tal que los daños causados al ambiente sean minimizados (Straskraba 1998; Piñeiro *et al.* 2013). Por consiguiente, muchas de las ecotecnologías se especializan en la aplicación de procesos biológicos para la protección y restauración de la calidad del ambiente. Estas ecotecnologías se caracterizan además, por crear procesos, productos y

servicios menos contaminantes y más seguros (es decir, con alta ecoeficiencia).

En general, existe una alta diversidad de ecotecnologías o tecnologías ambientales, que no solo se refieren a técnicas ecológicas que descansan su diseño en los ecosistemas naturales, sino también abarcan toda la cadena de producción-consumo del hombre. Hay tecnologías ecológicas concebidas para el control de la contaminación ambiental, la regeneración de energía limpia, la conservación del agua, la creación de energías renovables, el transporte por carretera, y para incrementar la eficiencia ecológica, entre otras (Moreno *et al.* 1998). Todos estas ecotecnologías tienden a acarrear consecuencias socioeconómicas graves que no siempre están presentes en los debates públicos y políticos. Según Weber (2009), se han subrayado cuatro retos principales que necesitan ser abordados en las próximas dos décadas. Se supone que las tecnologías ambientales van a mitigar el cambio global y el agotamiento de los recursos; a la par, deben favorecer vivir en un ambiente sano y optimizar la competitividad y el crecimiento de las empresas.

Por otra parte, no hay duda que el desarrollo silvícola actual necesario para contrarrestar los cambios globales deberá depender del uso de ecotecnologías que garanticen la restauración acelerada de los paisajes tropicales/subtropicales y con esto la producción maderera sostenida y de otros servicios ecosistémicos. En este camino, diversos autores han señalado la importancia del uso de diferentes tecnologías ecológicas y del conocimiento ecofisiológico para estabilizar y recuperar los ecosistemas boscosos y contrarrestar el cambio climático (Herrera *et al.* 1997; Meli 2003; Sánchez *et al.* 2011). Muchas de estas

tecnologías se han desarrollado inicialmente en un contexto agrícola y otras son específicas para sistemas naturales; pero todas tienen como fin facilitar el establecimiento de los plantones en diferentes condiciones ambientales. El establecimiento de las especies leñosas depende de una variada gama de factores bióticos y abióticos; por tanto, existe una gran diversidad de técnicas ecotecnológicas aptas para este fin, incluyendo tubos protectores, geles hidrofílicos, enmiendas orgánicas e inorgánicas, inóculos de hongos micorrízicos, bacterias solubilizadoras de fósforo, tratamientos de semillas, técnicas de reforestación sucesional, biotecnología ambiental, ecoingeniería, etc. La evolución de estas técnicas representa una buena oportunidad para mejorar nuestros conocimientos ecofisiológicos en las especies seleccionadas y también son una plataforma ideal para el desarrollo y la innovación tecnológica ambiental.

Entre estas ecotecnologías se destacan por su uso a nivel mundial, en sistemas agrícolas, la aplicación de tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación y de inóculos micorrízicos (Herrera *et al.* 1997; 2011; Sánchez *et al.* 2001a; Piñeiro *et al.* 2013; Paparella *et al.* 2015; Ibrahim 2016). Sin embargo, su uso en especies de interés en proyectos de restauración ecológica tropical se ha restringido fundamentalmente al ámbito experimental y académico, siendo raramente utilizadas en la gestión de viveros y siembras en campo.

Por tal motivo, los objetivos del presente texto fueron brindarle al lector las herramientas teóricas y prácticas necesarias para la extensión de dichas ecotecnologías en proyectos de restauración tropical. Se abordarán aspectos generales de ambas ecotecnologías

relacionados con las metodologías de aplicación y efectos de los referidos procedimientos sobre el establecimiento y producción de las plantas. También se ofrece información de cómo podrían combinarse ambas ecotecnologías entre sí y con otras empleadas en proyectos de reforestación. Debe señalarse que estas tecnologías ecológicas han sido muy poco utilizadas en países en vías de desarrollo, tanto en plantas cultivadas como en silvestres tropicales útiles para proyectos de restauración, aunque se destacan los resultados obtenidos en Brasil, Colombia, Cuba, México y Venezuela. También las dos ecotecnologías se han empleado en diversas investigaciones en el contexto de proyectos de Investigación-Desarrollo de Latinoamérica, que van dirigidos a crear

estrategias comunes para contribuir a la restauración ecológica del Neotrópico.

Por último, es válido aclarar que muchos de los resultados que se presentan se fundamentan en experiencias realizadas en especies cultivadas. No obstante, los efectos se pueden extrapolar para diferentes formas de vida (por ejemplo, árboles, arbustos, lianas) útiles en proyectos de restauración. Además, compilando la información obtenida en plantas cosechadas igualmente contribuimos a mejorar los sistemas agrícolas, agroforestales y silvopastoriles de países subdesarrollados, y con esto a incrementar su seguridad alimentaria y ambiental con base a ecotecnologías de bajos insumos.



PARTE I

TRATAMIENTOS DE SEMILLAS

Jorge A. Sánchez y Mayté Pernús

GENERALIDADES DE LOS TRATAMIENTOS PREGERMINATIVOS

La alta competitividad del mercado, unida a la búsqueda de cultivos cada vez más rentables, ha propiciado que en la actualidad existan un gran número de técnicas para mejorar el comportamiento de las semillas en el campo y proteger a las plántulas contra una amplia variabilidad de factores abióticos y bióticos (Paparella *et al.* 2015). Así, la práctica de los tratamientos que mejoran el funcionamiento de las semillas ha alcanzado en los últimos años un importante

desarrollo; convirtiéndose para muchas especies en un procedimiento casi normal dentro del conjunto de operaciones de manipulación de las semillas. Si lo anterior es verdadero para las especies agrícolas, mayor importancia deberá adquirir cuando se trabaje con plantas silvestres tropicales, que producen frutos y semillas con una amplia diversidad morfofisiológica y funcional (Fig. 1). Por ejemplo, en cuanto a colores, masas, formas, estructuras de dispersión, composición química, contenido de agua, naturaleza de las reservas, mecanismos de dormancia/germinación



Figura 1. Diásporas (semillas/frutos) de especies arbóreas nativas cubanas. A. *Andira inermis*, B. *Diospyros halesioides*, C. *Espadaea amoena*, D. *Schoepfia didyma*, E. *Erythrina poeppigiana*, F. *Cordia alba*, G. *Clerodendrum grandiflorum*, H. *Hibiscus elatus*, I. *Swietenia mahagoni*.

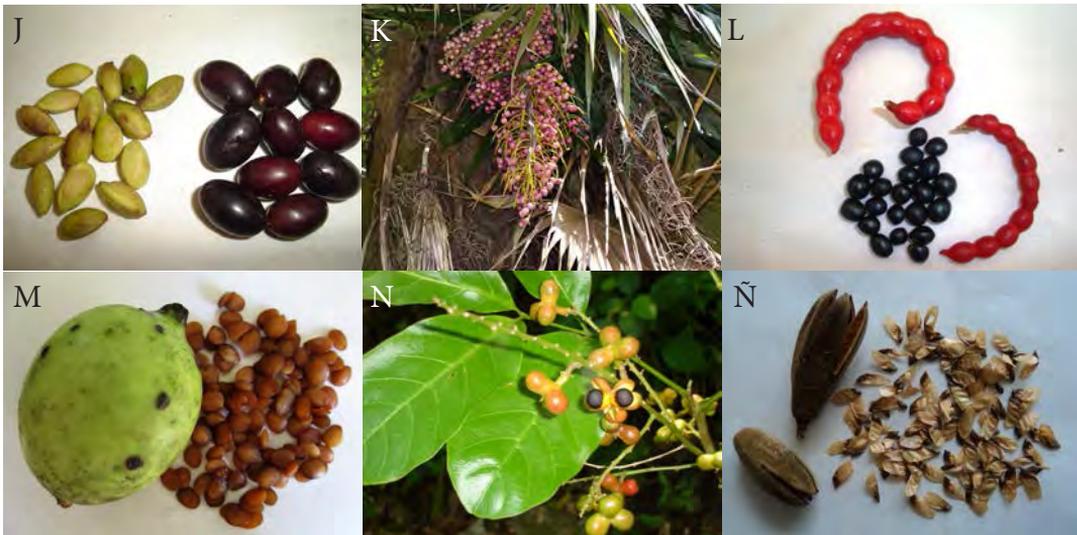


Figura 1. Diásporas (semillas/frutos) de especies arbóreas nativas cubanas (continuación). J. *Simaruba laevis*, K. *Coccothrinax crinita*, L. *Cojoba arborea*, M. *Casasia clusiaefolia*, N. *Cupania americana*, Ñ. *Luehea speciosa*. Fotos: Jorge A. Sánchez.

y longevidad seminal (Vázquez-Yanes & Orozco-Segovia 1993; Sánchez *et al.* 2009a; Montejo *et al.* 2015; Romero Saritama & Pérez-Rúiz 2016).

Esta variabilidad seminal para algunas especies tropicales no representa un impedimento para su reproducción en condiciones artificiales. Sin embargo, muchas especies arbóreas y arbustivas tienen mecanismos de reproducción que aún no han podido ser domesticados por su complejidad (por ejemplo, diferentes clases, niveles y tipos de dormancia seminal, ver **Tabla 1**), lo cual dificulta su germinación en condiciones de vivero y de campo. Agréguese a lo anterior, que en los proyectos de restauración ecológica la propagación mediante semillas es el método que, en general, resulta más económico y eficiente para la recuperación de la vegetación nativa, además de mantener la alta diversidad genética.

En la práctica agrícola los tratamientos dirigidos a las semillas persiguen diferentes objetivos; aunque en ocasiones,

el tratamiento suele tener efectos colaterales distintos del objetivo previsto. Según Heydecker & Coolbear (1977), los propósitos agrícolas de los tratamientos de las simientes son: 1) selección de semillas; 2) mejora de la higiene y propiedades mecánicas de las semillas; 3) ruptura de la dormancia/latencia; 4) incremento y sincronización de la germinación; 5) aplicación de nutrientes y 6) aumento de tolerancia al estrés. Posteriormente, Halmer (2000) propuso que las tecnologías empleadas en la industria semillera podían dividirse en cuatro categorías según sus propósitos; estas tecnologías o tratamientos se definen como siguen:

Acondicionadores de semillas o de procesamiento. Tratamientos dirigidos a limpiar, purificar y fraccionar las semillas, utilizando técnicas mecánicas como gradientes de tamaño y de densidad, de limpieza, de clasificación por color y también de escarificación.

Protectores de semillas. Con fines sanitarios, buscan proteger a las semillas por

Tabla 1. Clasificación jerárquica de la dormancia seminal según Baskin & Baskin (2014).

Clases	Nivel y Tipos
Dormancia Fisiológica (PD)	No profunda (tipos del 1 al 5) Intermedia (tipos 1 y 2) Profunda (tipos 1 y 2)
Dormancia Morfológica (MD)	Una sola categoría
Dormancia Morfofisiológica (MPD)	No profunda simple (tipos 1 y 2) Intermedia simple Profunda simple No profunda simple del epicótilo (tipos del 1 al 4) Profunda simple del epicótilo (tipos del 1 al 4) Profunda simple doble (tipos 1 y 2) No profunda compleja Intermedia compleja Profunda compleja
Dormancia Física (PY)	Probablemente requerirá ser subdividida
Dormancia Combinada (PY + PD)	No profunda (tipos 1 y 2) Intermedia (tipos 1 y 2) Profunda (tipos 1 y 2)

aplicación de fungicidas, insecticidas y bactericidas.

Mejoramiento fisiológico de semillas o de vigorización. Técnicas de hidratación parcial de las semillas o de forma controlada, que permitan avanzar en el metabolismo pregerminativo, pero que eviten la emergencia de la radícula. También incluye aplicación de sustancias activas como los reguladores de crecimiento.

Recubrimiento de semillas. Técnicas de peletización o de revestimiento de semillas para facilitar su manejo (incrementar su peso) y recubrirlas con fungicidas, insecticidas, herbicidas, nutrientes, etc.

Posteriormente, Ponnusamy & Ramanadame (2006) agruparon los tratamientos que mejoran las semillas y la productividad de las plantas en diversos procedimientos fisiológicos. Estos

abarcaban tratamientos de fortificación de simientes (con micronutrientes, reguladores de crecimiento, vitaminas, etc.), de hidratación-deshidratación (en agua, soluciones osmóticas, productos naturales, etc.) hasta tratamientos de peletización seminal en combinación con diferentes inóculos, fungicidas, pesticidas, rodenticidas, micronutrientes y macronutrientes.

Sin embargo, cabe señalar que muchos tratamientos pregerminativos que en el presente se aplican a las semillas de especies forestales, para incrementar su germinación, no están contenidos en las clases de tratamientos seminales propuestos por Halmer (2004) y Ponnusamy & Ramanadame (2006). Quizás una división en dos categorías de tratamientos dirigidos a las semillas resulte más sencilla y práctica. De este modo, podrían reconocerse los siguientes tratamientos: 1) los de aplicación

externa, que pueden ser practicados a cualquier tipo de semillas y 2) los que afectan al metabolismo de las mismas.

El primer caso se puede ejemplificar con el empleo de tratamientos de recubrimiento de semillas, los tratamientos fitosanitarios (fungicidas, insecticidas, bactericidas, etc.) y la inoculación con microorganismos (rhizobium, micorrizas, etc.) cuya asociación simbiótica a través del sistema radicular de la joven plántula beneficiará el establecimiento de las plantas y su producción. Dentro del grupo de los tratamientos que afectan el metabolismo interno de las semillas son bien conocidos los tratamientos de escarificación (mecánica, térmica y ácida), la estratificación (fría, caliente y/o fría/caliente) y los tratamientos revigorizadores/acondicionadores de las semillas (la hidratación parcial, la infiltración de sustancias útiles para la germinación, o la aplicación de diferentes tipos de radiaciones, desde infrarrojas a rayos gamma), entre otros. Todos ellos van dirigidos en primer lugar a mejorar la germinación; pero de igual forma muchos influyen positivamente en el establecimiento de la planta y en la posterior evolución de los cultivos (por ejemplo, incrementan significativamente los rendimientos).

Por ende, tanto los tratamientos de aplicación externa como los que afectan el metabolismo de las semillas podrían agruparse bajo la terminología de tratamientos preacondicionadores de semillas. De hecho, esta terminología fue propuesta inicialmente por Heydecker *et al.* (1973) y Khan *et al.* (1979) para agrupar tratamientos preacondicionadores de semillas de tipo químico, físico y/o fisiológico. Posteriormente, esta nomenclatura fue empleada por Sánchez & Muñoz (2003) para agrupar a los

tratamientos fisiológicos que se aplican a las semillas.

También Taylor *et al.* (1998), en una excelente revisión sobre los tratamientos que se le aplican a las simientes, hablan de tres métodos generales para mejorar el funcionamiento de las semillas. El primero se refiere a los procedimientos de selección física de las semillas (tamizados, etc.), que es lo que llaman *seed conditioning*, y los otros dos son las tecnologías de recubrimiento de semillas o *seed coating technologies* y los tratamientos de hidratación previa a la siembra (con o sin secado), a los que asignan los términos de *pre-sowing hydration techniques* o *seed priming*. Ellos además proponen la combinación de estas tecnologías; pero advierten que pueden tener efectos positivos y también contrapuestos sobre la germinación, por lo que sugieren investigar las combinaciones de tecnologías antes de su puesta en marcha, sobre todo en cultivos de alto valor económico.

Los tratamientos encaminados en la modificación del comportamiento germinativo de las semillas (*i.e.*, los tratamientos pregerminativos o que afectan el metabolismo interno de las semillas) pueden dividirse en varios grupos de acuerdo a sus objetivos. Los de escarificación (por ejemplo, corte o lijado de las cubiertas, inmersión en agua caliente y en ácido sulfúrico) se emplean para ablandar las envolturas seminales y facilitar la penetración del agua y del oxígeno a las semillas. Las referencias al uso de estas técnicas son numerosas y se incluyen en las normas internacionales para trabajar con semillas como procedimientos para eliminar dureza seminal o dormancia física. Otro objetivo puede ser la eliminación de dormancia fisiológica o morfofisiológica de las semillas

mediante la estratificación, la escarificación mecánica total, la aplicación de hormonas, o un simple remojo en agua de las simientes para eliminar inhibidores hidrosolubles de la germinación.

Finalmente, el objetivo del tratamiento pregerminativo puede ser un avance de la germinación en condiciones controladas, para luego acelerar y sincronizar la germinación en condiciones de vivero y de campo. Este tratamiento se realiza con diferentes soluciones químicas y en principio está dirigido a semillas que presentan un comportamiento aceptable de la germinación; pero se ha implementado en un gran número de especies/cultivares con un grado elevado de deterioro o envejecimiento seminal, y también para mejorar el funcionamiento de las plantas bajo condiciones de estrés biótico/abiótico (Jisha *et al.* 2013; Paparella *et al.* 2015). Dentro de los tratamientos propuestos por Taylor *et al.* (1998), dichos procedimientos caen en la categoría de tratamientos de hidratación previa a la siembra y en la clasificación de Halmer (2000) se corresponden con los tratamientos fisiológicos de las semillas o de vigorización. En la presente contribución nuestra atención va dirigida fundamentalmente a dichos tratamientos.

De acuerdo con Bradford (1986), la tecnología de hidratación parcial de las semillas se basa en el principio del control de la imbibición de las semillas a un nivel tal que permita avanzar en el metabolismo pregerminativo, pero que evite la emergencia de la radícula por limitaciones hídricas. Cuando las semillas se rehidratan, ellas imbiben en forma acelerada y su radícula emerge rápida y casi simultáneamente. Esencialmente, estas serían las causas por las cuales las semillas pre-hidratadas germinan mejor; sin embargo, muchos investigadores han

demostrado que los beneficios reportados no solo se deben a la activación de aquellos procesos celulares relacionados con la germinación, sino también a que activan numerosos mecanismos de tolerancia al estrés y de reparación de daños celulares (Sánchez *et al.* 2001a; McDonald 2000; Vanangamudi *et al.* 2006; Paparella *et al.* 2015; Pernús & Sánchez 2015; Ibrahim 2016).

Los tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación (HD) de las semillas representan una técnica de vanguardia en lo que a tecnología de semillas se refiere. Como consecuencia, han recibido una considerable atención en las investigaciones sobre fisiología vegetal y en la industria agrícola, hasta el punto de ser una tecnología altamente comercializada, sobre todo en países del primer mundo con gran desarrollo en la industria semillera (por ejemplo, Estados Unidos de América, Inglaterra y Japón) (Halmer 2004). De hecho, existen diversas patentes para el acondicionamiento de semillas de especies cultivadas (Paparella *et al.* 2015).

Sin embargo, la utilización de los mismos en la práctica agrícola internacional se ve limitada fundamentalmente por las siguientes causas: 1) la falta de estandarización u optimización de los tratamientos en cada especie, variedad o lote en particular; 2) por el coste que resulta la aplicación de los referidos métodos a grandes volúmenes de semillas, fundamentalmente con soluciones osmóticas; 3) por la gran diversidad de metodologías que existe para tratar a las semillas y 4) por la inadecuada extensión y divulgación en el medio rural y agronómico de los resultados obtenidos en especies de interés agroforestal. Esta última limitación es muy evidente en países de América Tropical; aunque en otras regiones del mundo, como en

el continente Asiático, los tratamientos pregerminativos de HD han tenido una gran difusión entre los campesinos pobres y marginados para mejorar la germinación, el crecimiento y los rendimientos de muchos cultivos en condiciones semiáridas y suelos pobres (Harris 2004; Rakshit & Singh 2018).

ANTECEDENTES DE LOS TRATAMIENTOS DE HIDRATACIÓN-DESHIDRATACIÓN (HD)

El perfeccionamiento de la germinación por la hidratación de las semillas (imbibición previa a la siembra) tiene bastantes precedentes en la cultura tradicional campesina. El tratamiento más sencillo y antiguo, consiste en el remojo de las semillas para asegurar una rápida y completa germinación. Evenari (1984) señaló que el fisiólogo griego Theophrastus (372-287 a.n.e.) no es solo uno de los fundadores de la botánica, entre sus numerosas contribuciones a la fisiología vegetal también aparecen referencias acerca del papel de la imbibición de las semillas en agua y leche sobre la velocidad de germinación del pepino (*Cucumis sativus*). Según Evenari (1984), Theophrastus puede considerarse el padre de la fisiología de las semillas por sus aportes en este campo; sin embargo, este mismo autor reconoce que Democritus (500 a.n.e.) y Mago (400-300 a.n.e.) ya recomendaban el remojo de todas las semillas antes de la siembra en soluciones de savia de las plantas, o bien en agua endulzada con miel. También los tratamientos de hidratación parcial de las semillas llamaron la atención de Charles Darwin (1809-1882). De hecho, este autor logró incrementar la germinación de diversos cultivos cuando hidrató las semillas en agua de mar (Darwin 1855).

De acuerdo a Welbaum *et al.* (1998), las ventajas de estos tratamientos de

hidratación de pre siembra se deben al simple hecho de que las semillas tratadas alcanzan la primera fase de la germinación antes de ser sembradas. Estos procedimientos no involucran un avance fisiológico significativo en las semillas y tampoco deshidratación previa a la plantación; por lo que no son considerados por algunos autores como verdaderos tratamientos de precondicionamiento fisiológico de las semillas.

Por su parte, Kidd & West (1918; 1919) revisaron las experiencias concernientes a la preimbibición de las semillas en el siglo XIX y concluyeron que: “*Las semillas remojadas en un mínimo de agua y después secadas lentamente a temperaturas ambiente, imbiben y germinan más rápido que las no tratadas*”. Enunciaron además, las condiciones mínimas en las que se realizaron dichos tratamientos, tales como: cantidad adecuada de agua, duración y temperatura óptima del proceso de imbibición. De igual forma, Chippindale (1934) investigó los efectos de los tratamientos de humedecimiento/desección sobre las semillas de gramíneas, y señaló que estos eran frecuentemente llevados a cabo por los campesinos; pero que en la agricultura moderna no se utilizaban. Él concluyó además, que los efectos encontrados no podrían generalizarse aún para especies y/o variedades muy cercanas taxonómicamente.

Seguidamente, Levitt & Hamm (1943) aplicaron por primera vez soluciones salinas en los tratamientos pregerminativos de hidratación parcial y lograron acelerar el proceso de postmaduración de las semillas de *Taraxacum kok-saghyz*. Asumieron que la imbibición en soluciones osmóticas activa reacciones fisiológicas pregerminativas en las semillas, permitiendo que estas maduren, pero no germinen por limitaciones hídricas.

Esto resulta ventajoso para acelerar la germinación al ser rehidratadas las semillas.

A pesar de todo el intenso trabajo realizado en esta temática, solo algunas décadas después los tratamientos pregerminativos de HD volvieron a ser centro de interés para los científicos occidentales, a partir de la revisión de May *et al.* (1962) acerca de los resultados obtenidos por P. A. Henckel y otros fisiólogos rusos relacionados con la imbibición parcial de las semillas en agua y su comportamiento frente al estrés ambiental (Henckel *et al.* 1964). Estos tratamientos de hidratación parcial fueron desarrollados en Rusia en la década de 1930 y se conocen en la literatura científica internacional por el término de robustecimiento de semillas o *seed hardening* (Henckel 1946, citado por Henckel 1964). Su efectividad ha sido comprobada por muchos investigadores para incrementar la resistencia a la sequía (es decir, deshidratación y sobrecalentamiento) y a la salinidad en diversas plantas cultivadas y procedentes de sistemas naturales (Satarova & Tvorus 1966; Henckel 1970; 1982; Prisco *et al.* 1978; 1992; Vanangamudi *et al.* 2006; 2010; Sánchez *et al.* 2001a; 2003a; 2007).

Según Henckel (1964), este método de presiembra se fundamenta en la posibilidad de utilizar la capacidad adaptativa de las plantas para incrementar la resistencia al estrés ambiental, y en particular en la reorganización fisiológica que sufren las semillas durante la etapa de deshidratación del tratamiento. En la actualidad, también se reconoce que la fase de hidratación de las simientes es una etapa importante para activar procesos bioquímicos-fisiológicos de tolerancia al estrés (Sánchez *et al.* 2001b;

Vanangamudi *et al.* 2006; Varier *et al.* 2010; Ibrahim 2016). Es apropiado señalar, que la génesis de estos tratamientos se atribuye a H. Will (1883) (citado por Bewley & Black 1982), quien informó que repetidos ciclos de HD de las semillas incrementaba la resistencia de las plantas a la sequía y a las heladas.

La era moderna de la preimbibición de las semillas, en el siglo pasado, la iniciaron el fisiólogo inglés W. Heydecker y su grupo de investigación. Ellos desarrollaron una técnica simple en concepto pero fisiológicamente compleja, la cual es capaz de acelerar apreciablemente la germinación después de la siembra (Heydecker *et al.* 1973). La misma consiste en la preimbibición de las semillas en soluciones salinas o de un osmótico bioquímicamente inerte (preferentemente polietilenglicol) durante cierto tiempo antes de transferir las mismas al agua, con o sin previa deshidratación. Estos tratamientos se conocen, fundamentalmente, en la terminología científica como acondicionadores de semillas o *seed priming*, revigorizadores de semillas o *seed reinvigoration* y osmoacondicionadores de semillas o *seed osmoconditioning*.

Aún cuando parezca que los tratamientos solo difieren desde el punto de vista terminológico, los objetivos de estos fueron otros desde sus inicios. Los acondicionadores y osmoacondicionadores pretenden básicamente acelerar y uniformar la germinación e incrementar la producción de las plantas (Heydecker & Coolbear 1977; Khan *et al.* 1978). Los tratamientos revigorizadores procuran incrementar la germinación de las semillas envejecidas (Heydecker *et al.* 1975; Burgass & Powell 1984). Por último, los tratamientos robustecedores procuran incrementar la tolerancia de las plantas

resultantes de las semillas tratadas a condiciones adversas del medio como la sequía, las altas temperaturas, la salinidad y otros factores desfavorables del ambiente (Henckel 1964).

Por su parte, Khan *et al.* (1979), Khan (1992), Taylor *et al.* (1998), Welbaum *et al.* (1998), McDonald (2000), Sánchez *et al.* (2001a), Halmer (2004), Vanangamudi *et al.* (2006) y Paparella *et al.* (2015) resumieron el conocimiento existente acerca de la efectividad de los tratamientos de HD o de precondicionamiento de las semillas, incluyendo aquellos que además del agua (acondicionamiento fisiológico), emplean la infiltración de compuestos químicos bioactivos, la peletización o la aplicación combinadas de ellos. Concluyeron que estos tratamientos precondicionadores pueden utilizarse para los siguientes fines prácticos: 1) incrementar la germinación en temperaturas subóptimas y supraóptimas, 2) acelerar y sincronizar la germinación, 3) estimular el sistema radicular, 4) incrementar la resistencia o tolerancia de las plantas en condiciones de estrés biótico y/o abiótico y 5) aumentar la producción los cultivos (rendimientos). También la aplicación de los tratamientos pregerminativos de HD de las semillas en combinación con otros tratamientos robustecedores de tipo fisiológico (choque térmico, ácido, salino) se ha utilizado para mejorar el funcionamiento de las semillas, y como modelo experimental para conocer la capacidad adaptativa de las plantas a condiciones ambientales cambiantes.

En el ámbito internacional, y como ya mencionamos, los tratamientos hídricos se han aplicado en una gran diversidad de especies de interés agrícola para mejorar su comportamiento agronómico. Sin embargo, existen muy

pocas experiencias sobre los efectos de los referidos métodos en semillas de especies arbóreas y arbustivas útiles en proyectos de restauración y de reforestación. De hecho, en las recientes compilaciones sobre tratamientos de HD (Vanangamudi *et al.* 2006; 2010; Rakshit & Singh 2018), apenas existe información sobre especies silvestres. Al parecer, esto no solo se debe a los pocos trabajos de robustecimiento de semillas que existen con especies nativas, sino que además, muchos autores solo reseñan aquellos resultados relacionados con plantas cultivadas; algo que podría ser comprensible, dado el interés que existe por las mismas.

Probablemente las primeras contribuciones con especies arbóreas fueron las realizadas en Suecia en 1976 con semillas de pino escocés (*Pinus sylvestris*) (Simak 1976 citado por Paci 1987). Seguidamente se aplicaron tratamientos de HD a semillas de especies arbóreas con cierto valor maderable (Haridi 1985; Paci 1987; Huang & Zou 1989; López & Piedrahita 1998; Piedrahita 1998); pero es solo hasta principios de la década del 1980 que surgen los primeros reportes en especies de ecosistemas naturales (ver por ejemplo a Baskin & Baskin 1982). Afortunadamente esta situación ha ido cambiando y ya aparecen diversas publicaciones, aunque aún discretas en número, para plantas silvestres en países como Brasil, Cuba, México y Venezuela (Dubrovsky 1996; 1998; González-Zertuche *et al.* 2000; 2001; 2002; Sánchez *et al.* 2003a; 2004; 2006; Gamboa-deBuen *et al.* 2006; Orozco-Segovia *et al.* 2007; Brancalion *et al.* 2008; 2010; Vargas & Ferraz 2008; Bravo *et al.* 2011; Castro-Colina *et al.* 2011). Por su parte, los estudios realizados en Brasil y Cuba con los tratamientos de HD se iniciaron desde las

décadas del 70 y del 80 de la pasada centuria (Capote & Fleites 1978; Prisco *et al.* 1978; Orta *et al.* 1983); por lo que pueden considerarse pioneros, en el tema, para Latinoamérica.

PATRÓN DE IMBIBICIÓN Y SU RELACIÓN CON LOS TRATAMIENTOS DE HD

La mayoría de las semillas no dormantes solo requieren agua, oxígeno y una adecuada temperatura para germinar, siendo el agua el elemento fundamental para disparar la germinación. La toma de agua por las semillas sigue un patrón trifásico de absorción (Fig. 2), que se correlaciona con las variaciones en los componentes del potencial hídrico de las células durante los procesos fisiológicos y bioquímicos preparativos de la emergencia del embrión (Obroucheva & Antipova 1989; Bewley & Black 1994). Diferentes investigadores denominaron estas etapas de absorción de agua por las semillas como: imbibición (I), activación o germinación *sensu stricto* (II) y fase de crecimiento o germinación visible (III). La caracterización de cada una de estas fases de hidratación y la secuencia de eventos bioquímicos-fisiológicos que ocurren durante la imbibición quedaron bien establecidas en semillas frescas de *Vicia faba* (Obroucheva & Antipova 1989).

Sin embargo, posteriormente otros autores (por ejemplo, Bewley 1997a; Obroucheva & Antipova 1997) describieron nuevas secuencias de eventos bioquímicos-fisiológicos relacionados con el patrón trifásico de absorción de agua de las semillas. Aunque en general, todos coinciden que el patrón trifásico de hidratación seminal comienza con una rápida imbibición (fase I), la cual se debe a factores puramente físicos. La fase II es un largo período de absorción de agua (segmento estacionario de la curva)

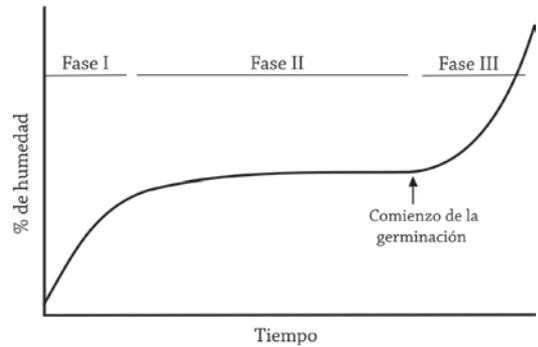


Figura 2. Patrón trifásico de toma del agua en semillas frescas con capacidad germinativa. Modificado de Bewley & Black (1994).

que está asociada con la mayoría de los eventos metabólicos relacionados con la germinación no visible; y la fase III ocurre con un nuevo incremento acelerado del contenido de humedad de las semillas, pero esta vez asociado con la emergencia de la radícula o emergencia embrionaria. Por último, Bewley & Black (1994) plantearon que la duración de cada una de estas fases y la activación de los procesos metabólicos que ocurren en ellas depende de las propiedades intrínsecas de las semillas (contenidos de sustratos hidratables, permeabilidad de las semillas, toma de oxígeno, tamaño de las semillas, etc.) y de las condiciones que prevalezcan durante la hidratación de las mismas (temperatura, contenido de humedad y composición del sustrato, iluminación y disponibilidad de oxígeno).

Es evidente que los tratamientos hídricos se fundamentan en la correlación que se establece entre el contenido de humedad que alcanzan las semillas y la secuencia de eventos bioquímico-fisiológicos que se activan en estas durante la absorción de agua y también mientras se deshidratan (Fig. 3). Esto explica la importancia que tiene conocer la curva (o patrón) de imbibición de las semillas en agua (o en otras soluciones)

para poder aplicar adecuadamente los tratamientos pregerminativos de hidratación parcial.

De este modo se puede mejorar la calidad fisiológica de las semillas sin dañar el embrión y consecuentemente el establecimiento de las plántulas. De hecho, Bradford (1986) señaló que el patrón de imbibición de las semillas es el principio básico en el que se apoyan los tratamientos hídricos, y que debe ser determinado como paso previo a la aplicación de los mismos.

El patrón trifásico se ha obtenido en un gran número de especies cultivadas y silvestres, como cactus mexicanos (Dubrovsky 1996; 1998) y árboles pioneros del Neotrópico (Fig. 4) (Sánchez *et al.* 1998; 2003a; 2004). Su determinación es con base al peso fresco/seco inicial de las semillas y su duración dependerá del día de inicio de la germinación visible para cada lote y de su condición de dormancia. Existe una relación definida entre el tiempo de imbibición y la

cantidad de agua absorbida para cada lote de semillas, aunque no siempre se cumple para todas las especies (Fig. 4).

También sobre la base de este patrón de imbibición de las semillas y de los eventos bioquímicos-fisiológicos que se activan se diseñaron los tres tratamientos primarios para precondicionar fisiológicamente las semillas, es decir, los tratamientos revigorizadores, acondicionadores y robustecedores (Fig. 5). Esta metodología de aplicación de tratamientos hídricos se reconoce por muchos investigadores, aunque no se haya determinado previamente el patrón de imbibición de la especie (Bradford 1986; Sánchez *et al.* 2001a). De este modo, cuando se quiere revigorizar semillas envejecidas o con bajo poder germinativo inicial se hidratan las mismas hasta el final de la fase I del patrón trifásico. Si se pretende sincronizar y acelerar la germinación se humedecen las semillas hasta la mitad aproximadamente de la fase II; y cuando se pretenden robustecer semillas y plantas se hidratan las simientes

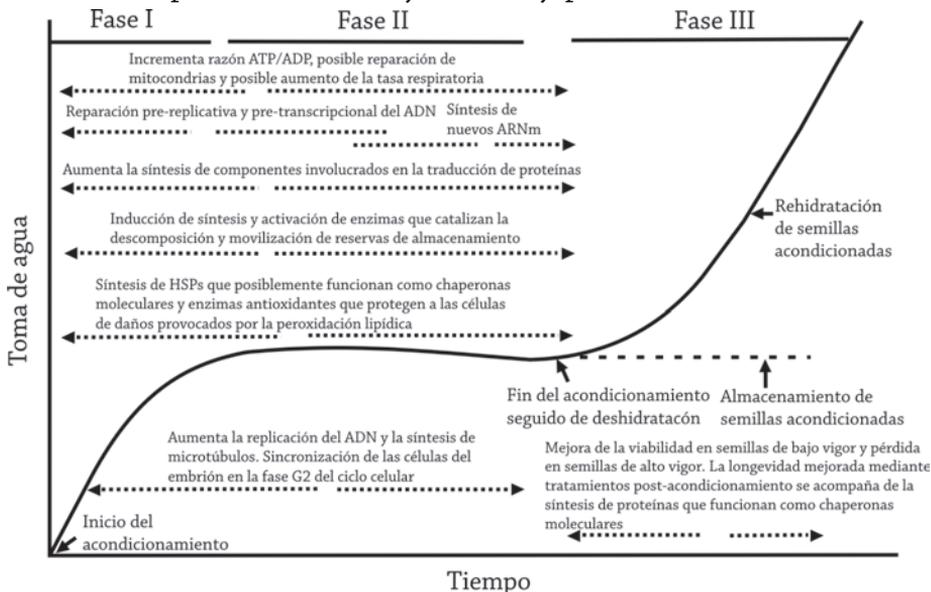


Figura 3. Patrón trifásico de absorción de agua y eventos metabólicos durante el acondicionamiento de semillas. Modificado de Varier *et al.* (2010).

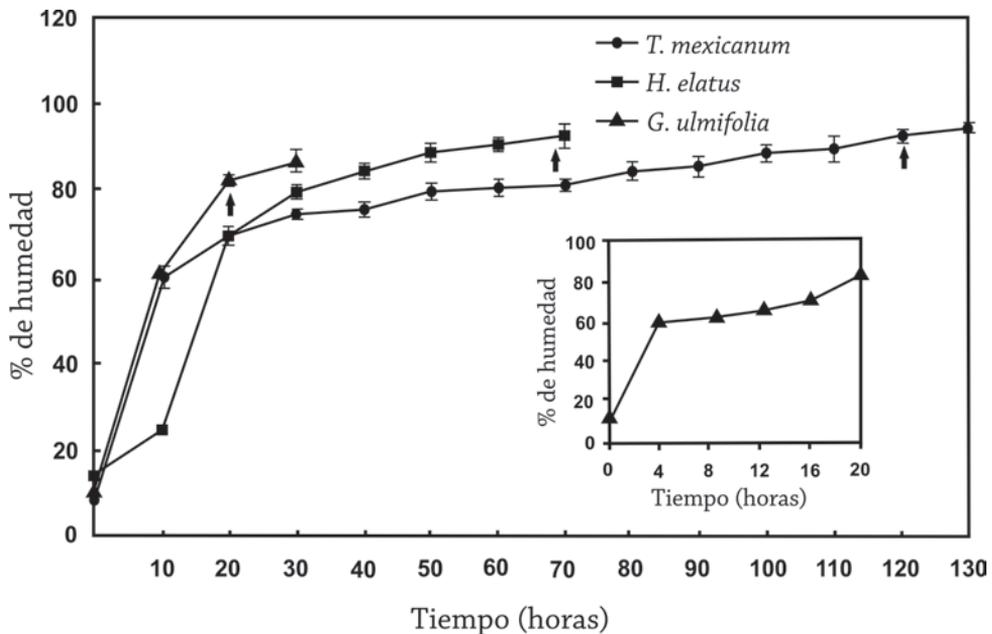


Figura 4. Patrón trifásico de absorción de agua en semillas frescas de árboles tropicales pioneros. Las flechas indican el inicio aproximado de la germinación. La figura adjunta muestra el patrón de absorción de agua en semillas de *Guazuma ulmifolia* determinado en intervalos de cuatro horas. Modificado de Sánchez *et al.* (2004).

hasta el final de la fase II, o bien hasta la emergencia incipiente de la radícula. Es válido aclarar que en ocasiones, con un solo tiempo de hidratación parcial hasta aproximadamente la mitad o final de la fase II de la imbibición se pueden lograr efectos revigorizadores, acondicionadores y robustecedores de semillas.

Por otro lado, el patrón de absorción de agua de las semillas precondicionadas en soluciones osmóticas (*seed priming*) es muy similar al de las semillas germinadas en agua, solo cambia que la toma de agua de las semillas precondicionadas es más lenta y se controla por el potencial osmótico de la solución (Varier *et al.* 2010). En el esquema de precondicionamiento osmótico propuesto inicialmente por Bradford & Bewley (2002) y luego modificado por Leubner (2006) se aprecia perfectamente lo anterior comentado (Fig. 6); pero también se evidencia que en las semillas tratadas

con solución osmótica, nunca se alcanza el nivel de humedad que logran las semillas hidratadas solo en agua. Las semillas tratadas generalmente no pasan de la fase II del patrón trifásico de imbibición; pero al rehidratarse, los eventos metabólicos de germinación ya están activados, por lo que su germinación es significativamente más rápida.

Otro aspecto importante que debemos señalar, es que diferentes lotes de semillas de una misma especie pueden presentar curvas de imbibición distintas bajo similares condiciones ambientales; siendo más evidente cuando la curva de imbibición se realiza con agua. Cada semilla tiene un grado de maduración fisiológica desigual y por tanto un ritmo individual de imbibición, por lo que en un tiempo dado cada una de ellas puede tener un contenido de humedad distinto; y como consecuencia diferentes grados de evolución durante

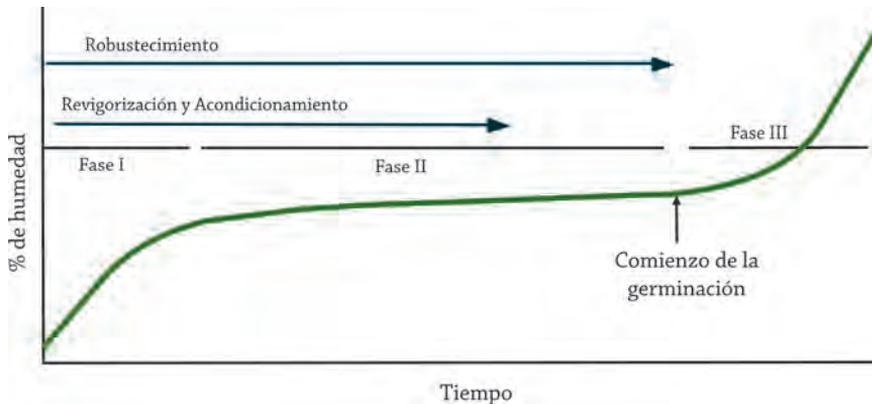


Figura 5. Patrón trifásico de absorción de agua de semillas frescas y su relación con los tratamientos pregerminativos de hidratación parcial.

la imbibición, germinación y respuestas a los tratamientos pregerminativos (Henckel 1964; McDonald 2000; Sánchez *et al.* 2001a). Lo anterior evidencia que por lo general, cuando las semillas están en contacto libremente con el agua, lo que se alcanza (en el lote) es un nivel de humedad medio o poblacional. También es importante mencionar, que las semillas dormantes o muertas tienen una cinética de toma de agua muy similar a las semillas no dormantes, solo que en las primeras nunca se alcanza la fase III, por lo que se quedan indefinidamente en la fase II (Bradford 1995).

TECNOLOGÍAS EMPLEADAS EN LOS TRATAMIENTOS DE HD

Hegarty (1978) y Halmer (2004) plantearon que los efectos de los tratamientos pregerminativos de hidratación parcial de las semillas dependen fundamentalmente de: 1) grado de hidratación que alcancen las semillas; 2) temperatura y duración del tratamiento; 3) nivel de aireación del medio; 4) cantidad de semillas y 5) proceso de deshidratación. Por tanto, cada tecnología que se desarrolle deberá tener en cuenta estos aspectos, que serán modificados de

acuerdo a los objetivos de los investigadores y a las características de los lotes de semillas empleados.

Los procedimientos de hidratación parcial o preacondicionadores de semillas se agrupan en dos categorías dependiendo si el suministro de agua a las simientes es controlado o no (Taylor *et al.* 1998). Las técnicas que limitan la toma de agua por las semillas son aquellas que emplean soluciones osmóticas, partículas sólidas o controlan la hidratación por añadir cantidades limitadas de agua a volúmenes exactos de semillas. Los métodos de imbibición parcial creados por Heydecker *et al.* (1973) y Khan *et al.* (1978) se basan fundamentalmente en la utilización de soluciones osmóticas, que permiten la hidratación de las semillas, en función del equilibrio de potenciales hídricos que se establece en el sistema solución-semilla. La técnica mantiene un nivel de humedad que desencadena una serie de eventos bioquímicos fisiológicos asociados con el proceso de pregerminación, pero no permite la emergencia de la radícula por limitaciones hídricas.

Estos tratamientos osmóticos u osmoacondicionadores (*osmopríming*) han sido extensivamente aplicados en semillas

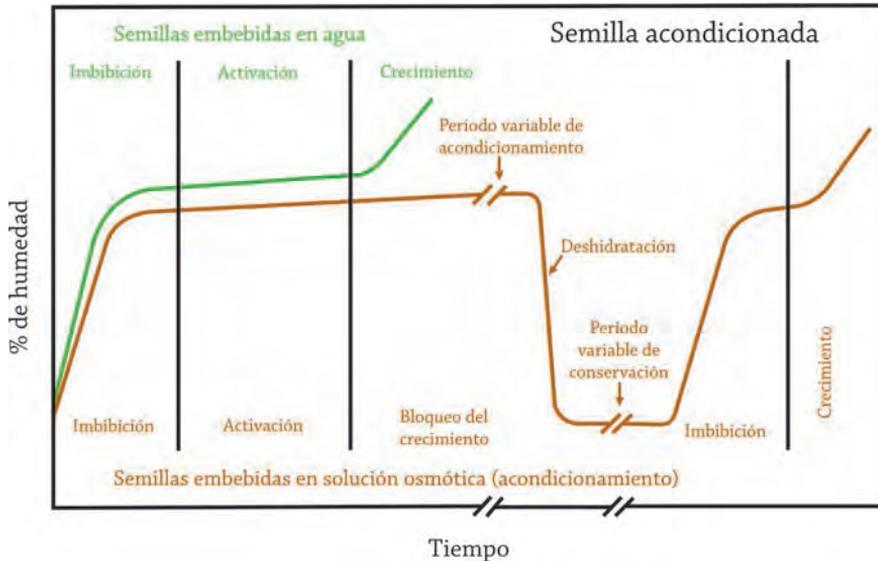


Figura 6. Esquema de preacondicionamiento osmótico de las semillas y proceso de rehidratación. Modificado de Leubner (2006).

pequeñas de flores y también a cultivos como: hortalizas, leguminosas, cereales y frutales (Khan 1992; Parera & Cantliffe 1994; Montejó *et al.* 2002; Rakshit & Singh 2018). La ventaja de esta tecnología con relación a otros métodos de acondicionamiento de semillas es que existe un control bastante estricto del nivel de humedad que alcanzan las semillas y una vez que las semillas son rehidratadas la germinación ocurre más rápida y uniforme, es decir, disminuye la variabilidad en la respuesta germinativa (Fig. 7); efecto que es más evidente cuando se presentan condiciones adversas para la germinación (Bradford 1986; Sánchez *et al.* 2003a; Pernús & Sánchez, 2015; Ibrahim, 2016). Por otra parte, el empleo de soluciones químicas en esta metodología limita su utilidad, pues favorece la contaminación ambiental durante el proceso de lavado de las semillas antes de la siembra (McDonald 2000).

Posteriormente, Dearman *et al.* (1986) y Buljaski *et al.* (1989) desarrollaron tecnologías para el uso comercial de

los procedimientos osmóticos, logrando tratar hasta 10 Kg de semillas. Con la limitante principal que representa el uso de grandes cantidades de osmóticos perfectos (polietilenglicol), sustancias altamente costosas en el mercado internacional (Halmer 2004).

Los procedimientos que utilizan partículas sólidas son usados para incrementar el contenido de humedad de las semillas en un sistema controlado y asociado a un sustrato sólido. Las semillas, las partículas sólidas y el agua son los tres componentes básicos de este procedimiento. Esta técnica se conoce en inglés con las denominaciones *solid matrix priming* o *matriconditioning*, lo que puede traducirse por acondicionamiento en matriz sólida y acondicionamiento matricial. También se llaman en la literatura científica como acondicionamiento mátrico de las semillas o *matric priming seed*. Como medio de soporte sólido se emplean fundamentalmente vermiculita o Micro-Cel E® (un silicato de calcio sintético, de alta capacidad de retención de agua) y también algunas

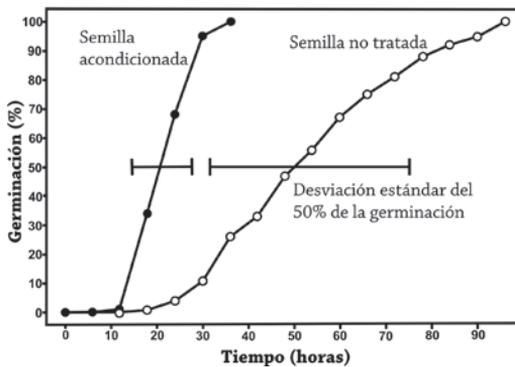


Figura 7. Germinación de las semillas preacondicionadas y no tratadas. Modificado de Leubner (2006).

arcillas expandidas y tierras de diatomeas (Khan 1992; Taylor *et al.* 1998). La idea esencial de esta tecnología es que el sustrato sólido empleado tenga una cantidad limitada de agua, que se entregue a la semilla hasta que el potencial hídrico de la misma (básicamente osmótico) y del medio (fundamentalmente matricial) se igualen. Este procedimiento refleja los procesos naturales de hidratación de las semillas en el suelo, y ha probado su efectividad en semillas pequeñas y grandes de especies cultivadas (McDonald 2000).

Por su parte, Grzesik & Nowak (1998) demostraron que la duración del acondicionamiento mátrico y la proporción en que deben emplearse los componentes de este sistema (semilla: partícula sólida: agua) varían entre especies y lotes de semillas; por lo que las condiciones óptimas para aplicar este método deben determinarse empíricamente. Entre las ventajas del acondicionamiento mátrico se citan la ausencia de toxicidades por contacto de las semillas con agentes osmóticos, la evitación de la lixiviación de iones u otras sustancias de las semillas al no existir remojo, la eliminación de los posibles problemas de falta de oxigenación durante el proceso, la alta capacidad de retención de agua del soporte sólido y la facilidad que

brinda el mismo para removerlo de las semillas una vez terminado el tratamiento (McDonald 2000). También se puede combinar este procedimiento con reguladores de crecimiento, fosfatos y fungicidas para mejorar la germinación y emergencia de las plántulas (Padmanabhan 2006).

La técnica de hidratación parcial de las semillas por adición controlada de agua se basa en la relación que se establece entre volúmenes exactos de agua y semillas (Rowse 1987 citado por Gray *et al.* 1990a). Esta tecnología permite un suministro controlado de agua a las semillas (en un tiempo único o de forma escalonada) suficiente para lograr el acondicionamiento de las mismas, pero no la germinación. La masa o cantidad de agua necesaria para alcanzar un determinado contenido de humedad en las semillas se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$MH_2O = MS (CH_f - CH_i) (100 - CH_i)^{-1}$$

Donde MH_2O , es la masa de agua a adicionar a la masa seca inicial de las semillas (MS); CH_i es el contenido inicial de humedad de la muestra de semillas; y CH_f es el contenido final de humedad que se desea que alcancen las semillas. El tiempo que las semillas están expuestas a esta técnica depende de las características de absorción de cada lote o especies en particular y del nivel de humedad que se desee conseguir (Rowse 1996). Por último, este procedimiento se ha desarrollado a gran escala para acondicionar semillas y se conoce como acondicionamiento no osmótico o *drum priming* (Rowse 1996); con el mismo se obtienen resultados similares a los logrados con los métodos que emplean soluciones osmóticas (Gray *et al.* 1990a). En esencia, las semillas se sitúan desde el inicio del proceso en un tambor rotativo, colocado a su vez sobre

una balanza. El agua se aporta paulatinamente mediante unos difusores de vapor situados en el centro del tambor y se activan periódicamente. El vapor de agua se condensa sobre las semillas y sobre las paredes del tambor, y el agua se absorbe seguidamente. El proceso está automatizado y continúa hasta que se alcanza el peso correspondiente al contenido de humedad deseado en las semillas, que se determina por ensayos previos.

Con el acondicionamiento no osmótico de las semillas lo que se consigue finalmente es un grado de humedad media, aunque el ritmo de imbibición está prefijado (por el programa de liberación de vapor que se establezca) (McDonald 2000). En este procedimiento no es tan efectivo el control de la temperatura, puesto que el aporte de agua en forma de vapor suministra al mismo tiempo un cierto grado de calor a las semillas. El argumento a favor del uso de esta técnica es que no son necesarias sustancias o sustratos caros, que quedan como residuos del proceso (Halmer 2004). Sin embargo, la tecnología que se emplea tampoco es factible para pequeños productores o campesinos pobres.

El método de imbibición que crearon Bruggink *et al.* (1999) tampoco realiza un control efectivo de la imbibición, pero es útil para mejorar la calidad y la longevidad de las semillas tratadas. Con este método, las semillas se colocan en un tambor rotatorio (o tanque mezclador) durante un período de varios días hasta alcanzar el nivel de humedad deseado, así se podría hablar de un preacondicionamiento a humedad más o menos constante durante el tiempo de permanencia en el tambor. Como ya mencionamos, el procedimiento no garantiza una gran homogeneidad en la distribución del agua, además subyace el hecho de que si cada

semilla tiene un ritmo relativamente diferente de absorción del agua, entonces lo que se consigue es una humedad media al igual que el método desarrollado por Rowse (1996), pero con menor precisión que este último.

Las técnicas de hidratación parcial de las semillas por adición controlada de agua también se conocen como acondicionamiento hídrico o hidroacondicionamiento de las semillas o *seed hydropriming* o *hydropriming*, que han sido empleadas con éxito en un gran número de cultivos (Fujikura *et al.* 1993; McDonald 2000). Sin embargo, esta última terminología también agrupa aquellos tratamientos de hidratación parcial de las semillas que limitan la imbibición por el tiempo de hidratación en agua y por exposición de las semillas a bajas temperaturas (Burgass & Powell 1984). De este modo, el remojo de las semillas por un largo tiempo seguido por su deshidratación hasta su contenido inicial de humedad es considerado como un tratamiento de hidroacondicionamiento por algunos autores. Según Halmer (2004), este último tratamiento además se conoce como *steeping treatments*, lo que puede traducirse como tratamiento de remojo abrupto de las semillas.

Dentro de la categoría del tratamiento de hidroacondicionamiento también se puede reunir el preacondicionamiento agrícola de las semillas (*on-farm seed priming*) (Harris *et al.* 1999), que se ha aplicado considerablemente por campesinos pobres de Asia y en menor medida de África. Según McDonald (2000), este procedimiento ha sido utilizado tradicionalmente en sistemas agrícolas de bajos insumos para acondicionar semillas. En la actualidad tiene gran popularidad y se recomienda como una tecnología muy práctica, de bajo coste y riesgo para incrementar el establecimiento y

rendimientos de los cultivos en países subdesarrollados (Harris 2004).

El preacondicionamiento propuesto por Harris *et al.* (1999) consiste fundamentalmente en hidratar las semillas en agua durante la noche (aproximadamente 8 horas; aunque se recomienda hasta 16 horas para algunos cultivos) y luego se secan durante un día antes de la siembra. Para lograr los mejores efectos, Harris (2004) recomienda que para cada cultivo se determine su tiempo límite de hidratación o límite de seguridad de hidratación. Esto permite acceder al tiempo de imbibición óptimo de cada lote de semillas y evita un sobrecondicionamiento que afectaría su vigor. Según Harris (2004), este tiempo debe ser establecido por los agricultores en conjunto con los investigadores para asegurar los mejores resultados de los tratamientos. En la actualidad el límite de hidratación ha sido establecido para una gran variedad de especies agrícolas que se cultivan en el continente asiático.

Por lo ya discutido, se aprecia que dentro de los tratamientos acondicionadores de semillas o *seed priming* hay una gran diversidad de métodos. Sin embargo, para McDonald (1999; 2000) los métodos que están contenidos bajo el término de *seed priming* son solo aquellos donde hay un control estricto del suministro de agua a las semillas. De este modo, dicho autor agrupa dentro de esta clase de tratamientos al acondicionamiento osmótico y mátrico de las semillas, al hidroacondicionamiento (cuando hay control estricto del agua) y una tecnología que él llama de pregerminación (remojo de las semillas hasta la germinación visible). Por su parte, para Taylor *et al.* (1998) el hidroacondicionamiento mediado por el tiempo de remojo y la reducción de la temperatura de imbibición no son considerados

como verdaderas técnicas que regulan estrictamente el nivel de agua que se le suministra a las semillas.

Los tratamientos robustecedores empleados por el fisiólogo ruso P. Henckel y sus colaboradores también pueden considerarse como métodos no osmóticos que controlan el nivel de humedad que se le suministra a las semillas (Henckel 1982). Este procedimiento es muy difícil de aplicar a grandes volúmenes de semillas, debido a que no alcanzan el mismo nivel de humedad durante la fase de hidratación parcial (Orta *et al.* 1998). En esta técnica, las semillas son remojadas en pequeñas cantidades de agua de acuerdo a su volumen y los mejores resultados se logran cuando son sometidas las simientes a dos o tres ciclos de HD; aunque para algunas especies con un solo ciclo es suficiente (Henckel 1964).

El tratamiento robustecedor igualmente ha evolucionado y desde hace ya bastante tiempo se robustecen semillas simplemente remojándolas sobre un papel de filtro humedecido, en un gel hidrofílico, o bien embebiéndolas en un recipiente con agua durante un determinado tiempo (Prisco *et al.* 1978; 1992; Orta *et al.* 1993; Sánchez *et al.* 1999a; Mondal *et al.* 2011). Alternativamente, también se ha comprobado que el tratamiento de las semillas en alta humedad relativa (e.g., 100%) tiene similar efecto que la imbibición en agua (Rao *et al.* 1987). Por tanto, el robustecimiento de las semillas al igual que el hidroacondicionamiento podrían considerarse tecnologías de hidratación parcial de las semillas donde el control del agua a las mismas no siempre es estricto. De hecho, para Heydecker (1974) y Welbaum *et al.* (1998), el hidroacondicionamiento (*hidropriming* o *priming in water*) es similar a lo que se conoce

como tratamiento robustecedor de semillas o *seed hardening*.

Los métodos que no controlan el agua que toman las semillas son aquellos en los que este recurso está libremente disponible a las semillas, no se controla por el ambiente que rodea a las mismas (Taylor *et al.* 1998). Por tanto, la toma del agua es gobernada por la afinidad que se establece entre los tejidos seminales y el agua. Comúnmente las semillas se hidratan sobre un sustrato humedecido hasta un punto tal que no se permita la emergencia de la radícula; por tanto, el tiempo de hidratación parcial debe ser determinado previamente. La técnica de HD propuesta por Orta *et al.* (1993; 1998) se fundamenta en el rol del agua en los procesos bioquímicos-fisiológicos sucesivos que ocurren en las semillas durante las fases pregerminativas (Obroucheva & Antipova 1997). El método regula la imbibición parcial en función del tiempo que se mantiene en contacto cualquier volumen de semilla con suficiente cantidad de agua y no en función del equilibrio de potenciales hídricos, ni la limitación en la cantidad de agua añadida, propuesto por los modelos desarrollados hasta el momento. Con dicha tecnología se alcanzaron resultados satisfactorios para acondicionar, revigorar y robustecer semillas de hortalizas y de especies forestales (Orta *et al.* 1993; 1998; 2004; Sánchez *et al.* 1997; 1998; 1999a; 2003a; 2006; Montejo *et al.* 2004; 2005).

La aplicación efectiva del modelo de imbibición parcial en agua propuesto por Orta *et al.* (1993; 1998) consiste en lograr que todas las semillas tratadas alcancen el mismo nivel de humedad deseado para que el efecto del tratamiento sea homogéneo. Este riesgo no se corre utilizando soluciones osmóticas, por cuanto la barrera a la absorción de agua se establece sobre

la base del equilibrio de potenciales hídricos que se crea en el sistema solución-semilla (o bien potenciales mátricos) y no en el tiempo de inmersión (Orta *et al.* 1998) ni la limitación en agua (Henckel 1982). Para superar esta dificultad técnica, los autores antes mencionados, proponen someter las muestras de semillas a dos o más ciclos de HD, como fue propuesto inicialmente por Henckel (1964), solo que en la técnica recomendada por Orta *et al.* (1998) el agua no es limitante. De hecho, Orta *et al.* (1998) en semillas frescas y envejecidas de tomate (*Solanum lycopersicum*) propusieron dos ciclos de HD para revigorar y acondicionar semillas y tres ciclos de HD para robustecer semillas (Fig. 8); dichos tratamientos lograron incrementar significativamente la germinación y los rendimientos del tomate, y los resultados fueron superiores al tratamiento osmótico que alcanzó similar contenido de humedad. Por su parte, Prisco *et al.* (1992) presentaron un método similar para robustecer semillas de diferentes cultivos con un solo ciclo de HD (Fig. 9). Igualmente, Sánchez *et al.* (2001b; 2003a; 2003b) con un solo ciclo de HD en agua también lograron robustecer semillas de hortalizas, de leguminosas herbáceas y de árboles tropicales pioneros como *Guazuma ulmifolia* (Fig. 10).

Otro método que no controla el agua que se le suministra a las semillas es el preacondicionamiento natural conocido en inglés por el nombre *natural priming* que fue creado y desarrollado por investigadores del grupo de Ecofisiología de la Germinación de México (González-Zertuche *et al.* 2001; Gamboa-deBuen *et al.* 2006; Orozco-Segovia *et al.* 2007). El preacondicionamiento natural es un tratamiento basado en el efecto que causa la exposición de las semillas a los procesos de hidratación-desección que ocurren en el suelo, durante su estancia en el banco de semillas; y consiste

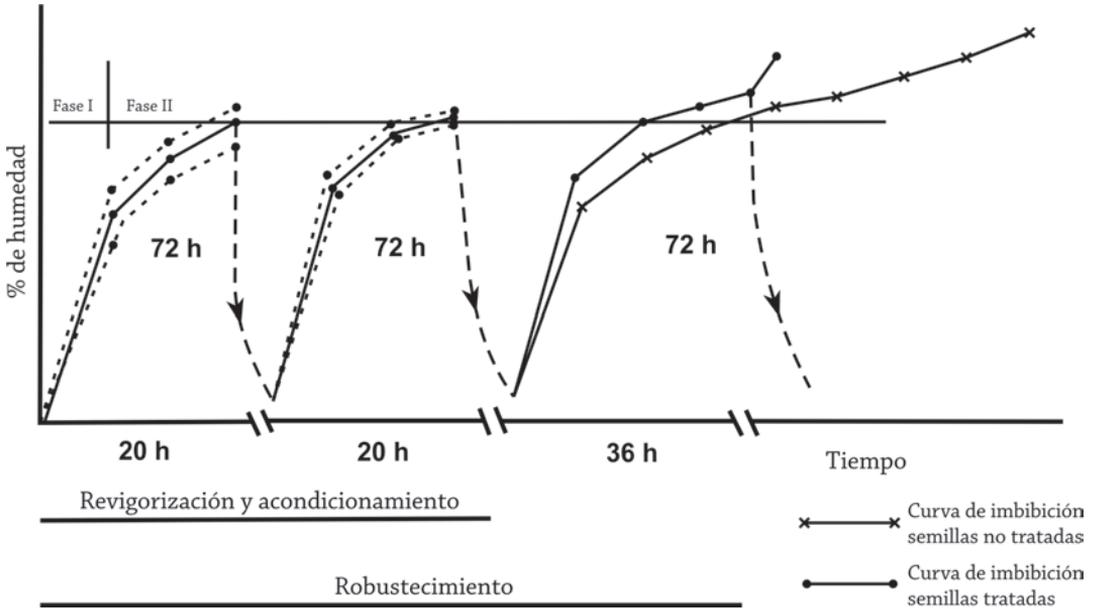


Figura 8. Modelo de hidratación parcial en agua para tratamientos revigorizadores, acondicionadores y robustecedores para semillas de tomate. Las líneas discontinuas representan el error estándar de la media. Modificado de Orta *et al.* (1998).

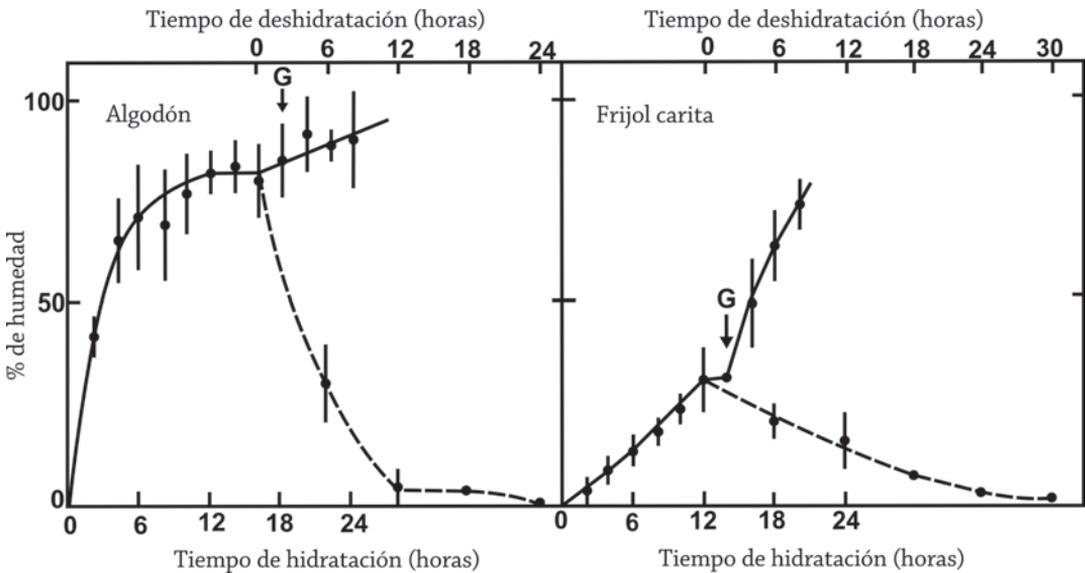


Figura 9. Curvas de hidratación y deshidratación para semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*) y frijol carita (*Vigna unguicalta*). La flecha representa la primera señal visible (G) de la germinación. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. Modificado de Prisco *et al.* (1992).



Figura 10. Plántulas de *Guazuma ulmifolia* después de tres meses en condiciones de vivero bajo estrés hídrico. Control (semillas no tratadas) y Tratamiento (semillas sometidas a un ciclo de hidratación-deshidratación). Elaboración de datos inéditos de Jorge A. Sánchez.

fundamentalmente en enterrar los lotes de semillas durante un tiempo y después se secan bajo aire seco en una habitación climatizada (González- Zertuche *et al.* 2001). Este tratamiento se ha usado exitosamente para eliminar dormancia seminal, incrementar la velocidad de germinación y aumentar la supervivencia y establecimiento de las plántulas silvestres con fines de restauración ecológica, debido a que promueve, fundamentalmente, eventos metabólicos relacionados con la fase temprana de la germinación (Gamboa-deBuen *et al.* 2006).

El preacondicionamiento natural es muy similar al tratamiento de estratificación de las semillas en el suelo, es decir, las semillas están sujetas a una amplia gama de variaciones ambientales, no

solo a ciclos de HD. Por consiguiente, las respuestas de las semillas a estos cambios constituyen mecanismos de aclimatación de las plantas a su ambiente (González- Zertuche *et al.* 2001; Gamboa-deBuen *et al.* 2006). Además, los cambios moleculares y fisiológicos que el preacondicionamiento natural promueve en las semillas son similares a los encontrados con los tratamientos acondicionadores de semillas (*seed priming*) que se realizan en condiciones de laboratorio (Gamboa-deBuen *et al.* 2006). Por otra parte, la efectividad de estos tratamientos se conserva en las semillas después de un prolongado almacenamiento, pero su garantía depende del suelo utilizado para acondicionar. Los mejores resultados se obtienen con suelo del sitio de colecta de las simientes (Gamboa-deBuen *et al.* 2006; Nicasio-Arzeta *et al.* 2011).

Este tratamiento no osmótico también ha evolucionado, generándose nuevas combinaciones de procedimientos. Así, cuando se emplea suelo salino o arena humedecida como matriz sólida, en condiciones semicontroladas, se le llama al tratamiento “preacondicionamiento natural en matriz sólida” (Nicasio-Arzeta *et al.* 2011). En semillas de maíz (*Zea mays*), con el preacondicionamiento natural en suelo salino se logró incrementar significativamente la velocidad de germinación y tolerancia de las plántulas a la salinidad (Nicasio-Arzeta *et al.* 2011). Sánchez & Muñoz (2004) también eliminaron termodormancia en las semillas frescas de *Trichospermum mexicanum* cuando enterraron sus semillas durante un mes en suelo del interior de un bosque siempreverde. Los autores además, obtuvieron resultados similares al preacondicionar las semillas en condiciones de laboratorio.

Finalmente, las perspectivas de utilización del preacondicionamiento natural

son muy amplias. El tratamiento es muy simple y de bajo coste, y sigue como ningún otro tratamiento pregerminativo de HD los pasos de la naturaleza. Por tanto, frente a la diversidad de tipos de suelos que existe en los trópicos y factores edafoclimáticos que influyen en la germinación, podría ser una herramienta muy eficaz para incrementar la tolerancia de las plantas a diversas condiciones de estrés; tal como podrían ser suelos con altos contenidos de aluminio y pH extremos, de serpentinizaciones (con elevado contenido de metales pesados) y sometidos a cambios de uso de la tierra.

Por otra parte, es bien conocida la variabilidad germinativa que se obtiene entre lotes de semillas de una misma especie cuando se someten a un tratamiento único de HD (Bradford *et al.* 1990; Montejo *et al.* 2002; 2005). Esta variabilidad en la germinación, conlleva a que las condiciones ambientales óptimas para aplicar los referidos tratamientos deben determinarse empíricamente para cada lote. Para ello, se ha desarrollado un modelo matemático que predice cómo se afecta la velocidad de germinación de las semillas de diferentes lotes pretratadas en respuesta a los tres factores fundamentales del medio abiótico que intervienen en cualquier método de hidratación parcial que se aplique: la temperatura, el potencial de agua y la duración del tratamiento (Tarquis & Bradford 1992; Bradford 1995; Sánchez *et al.* 2001a).

El modelo se conoce por el nombre de tiempo de acondicionamiento hidrotérmico de las semillas o *hidrotermal priming time model*, y se calcula por la siguiente ecuación:

Tiempo de acondicionamiento hidrotérmico:

$$[(\text{MPa}) (\text{°C}) (\text{hora})] = (\Psi - \Psi_{\min}) (T - T_{\min}) tp,$$

Donde T_{\min} y Ψ_{\min} , es la temperatura y el potencial de agua mínimo en el cual el acondicionamiento de las semillas podría ocurrir; T y Ψ es la temperatura y el potencial de agua que exceden las mínimas de estos factores, y tp , es la duración del tratamiento en las diferentes condiciones de T y Ψ ensayadas.

El modelo ha sido efectivo para establecer las condiciones óptimas (en cuanto a T , Ψ y tp) para realizar los tratamientos de imbibición parcial en lotes de varias hortalizas (Bradford 1995; Welbaum *et al.* 1998). Sin embargo, cuando Cheng & Bradford (1999) aplicaron este concepto en seis lotes de semillas de tomate, previamente acondicionadas en dos temperaturas del sustrato (15°C y 20°C), tres potenciales hídricos (-1, -1,5 y -2 MPa) y seis tiempos de duración del tratamiento (de 26 horas a 31 días), no lograron predecir las condiciones más adecuadas para tratar a las semillas. Estos resultados sugieren, que los eventos metabólicos que tienen lugar durante la germinación y aplicación de los tratamientos pregerminativos son complejos y responden al variar las condiciones en que se llevan a cabo los mismos (McDonald 2000).

Por su parte, el concepto del tiempo hídrico o hidrotiempo (*hydrotime concept*) es otro modelo fisiológico que permite determinar la calidad de las semillas y establecer un protocolo de acondicionamiento óptimo (Bradford & Still 2004; Paparella *et al.* 2015). Este modelo fisiológico relaciona el potencial de agua con la velocidad y el porcentaje de germinación, y al igual que el tiempo de acondicionamiento hidrotérmico ha sido muy empleado en especies cultivadas, pero

muy poco en silvestres. Para la aplicación del modelo se necesitan repetidas observaciones del curso de germinación, porcentajes de germinación entre 16% y 84% y germinación en al menos dos niveles de los potenciales osmóticos (Bradford & Still 2004). Estos requerimientos también se aplican en el tiempo de acondicionamiento hidrotérmico y podrían ser inconvenientes en semillas de especies nativas donde con frecuencia se presentan complejos mecanismos de dormancia seminal o bajos porcentajes de germinación.

SOLUCIONES UTILIZADAS EN LOS TRATAMIENTOS HÍDRICOS

Como hemos señalado anteriormente, las principales sustancias aplicadas en los tratamientos pregerminativos de HD fueron las soluciones osmóticas y el agua. Las soluciones osmóticas pueden dividirse en tres grandes grupos: 1) las soluciones compuestas por un polímero de alto peso molecular (de 100 hasta 20000 Da) conocido como polietilenglicol (PEG) o Carbowax (nombre comercial) (Heydecker & Coolbear 1977); 2) las soluciones salinas, compuestas de una mezcla de K_3PO_4 y KNO_3 (Suzuki *et al.* 1989; Rehman *et al.* 1998) y otras sales como $NaCl$, $MgSO_4$, NH_4NO_3 , $Ca(NO_3)_2$ y KH_2PO_4 (Levitt & Hamm 1943; Parera & Cantliffe 1994); y 3) las soluciones compuestas de azúcares (sacarosa o manitol) (Thanos *et al.* 1989; Sánchez *et al.* 2001a).

Los tipos de PEG con pesos moleculares entre 2000-8000 han sido recomendados como sustancias osmóticas ideales para osmoacondicionar semillas, debido a que no penetran las membranas celulares, no presentan carácter tóxico, mantienen casi constante la osmolaridad de la solución y cuando están

presentes en pequeñas cantidades permiten una aireación aceptable del medio (McDonald 2000). Sin embargo, se reconoce que cuando el PEG se utiliza para crear estrés hídrico en las plantas, este puede ser absorbido y secretado por las mismas (Halmer 2004).

Las soluciones salinas y de PEG también se han utilizado en combinación con reguladores del crecimiento (como las citoquininas, giberelinas, etc.) para evitar termoinhibición de las semillas en temperaturas subóptimas y supraóptimas de germinación y de esta manera eliminan termodormancia en las mismas (Khan *et al.* 1978; Tiryaki *et al.* 2005). Khan *et al.* (1979) demostraron también los efectos positivos del osmoacondicionamiento y de las fitohormonas sobre la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) bajo condiciones de estrés abiótico (calor, sequía y salinidad).

Por otro lado, las soluciones salinas mantienen una aireación aceptable del medio al osmoacondicionar semillas a gran escala (Suzuki *et al.* 1989). La promoción de la germinación por estas se atribuye a sus propiedades osmóticas y no a sus propiedades químicas (Thanos & Georghiou 1988), aunque estas últimas pueden afectar las estructuras celulares de las semillas y por consiguiente, la viabilidad de las mismas (Khan *et al.* 1983; Parera & Cantliffe 1994). Otros autores proponen que la efectividad de las sales se atribuye a sus propiedades nutricionales; en este sentido, diferentes sales de potasio (KCl , K_3PO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 y KNO_3) se han empleado para acondicionar y robustecer semillas de hortalizas (Vanangamudi *et al.* 2006). También Suzuki *et al.* (1989) plantearon que las sales con iones trivalentes de fosfatos (como el K_3PO_4 y

el Na_3PO_4) son más eficientes para estimular la germinación que otras sales no trivalentes y ampliamente utilizadas en dichos tratamientos. Al parecer, esto se debe a que las sales trivalentes incrementan el pH del medio de imbibición y con esto aumentan la actividad metabólica de las semillas durante el acondicionamiento.

Con las soluciones compuestas de azúcares se obtienen resultados satisfactorios para acelerar e incrementar la germinación (Thanos & Georghiou 1988; Thanos *et al.* 1989; Sánchez *et al.* 1997); pero son sustancias que se contaminan rápidamente y esto puede afectar considerablemente el poder germinativo o la viabilidad de las semillas. Además, por su bajo peso molecular pueden ser absorbidas por las semillas, lo que altera el gradiente del potencial de agua (Bradford 1995).

Los tratamientos que utilizan sustancias osmóticas (PEG, sales y azúcares) se conocen también como acondicionamiento osmótico de las semillas u *osmotic priming seeds* (Khan 1992), y su efectividad para mejorar el funcionamiento de las semillas se ha comparado con el acondicionamiento mátrico de las semillas o *matric priming seeds*. En varias especies de hortalizas con el tratamiento mátrico se obtienen los mejores resultados para incrementar la germinación con relación al acondicionamiento osmótico, aunque las diferencias fisiológicas que producen ambos tratamientos en las semillas están pobremente dilucidadas. Sin embargo, Jett *et al.* (1996) demostraron que la efectividad del acondicionamiento mátrico sobre el osmótico se debe fundamentalmente al mayor aporte de oxígeno y de calcio que hace el soporte del acondicionamiento mátrico a las semillas durante el intercambio que se

establece en el sistema semilla-sustrato. El oxígeno y el calcio son esenciales en la división celular y en la activación de diferentes funciones de membranas y proteínas (Roberts & Harmon 1992; Ibrahim 2016). Esto explica, por qué las semillas tratadas mediante el acondicionamiento mátrico funcionan mejor que las acondicionadas con los tratamientos osmóticos.

Finalmente, la inclusión de antibióticos y fungicidas, como el Tiran (0,2%), en soluciones de PEG durante el tratamiento osmótico de las semillas de diferentes cultivos (Khan *et al.* 1978; 1983; Jisha *et al.* 2013) han reducido considerablemente la proliferación bacteriana y fúngica durante la emergencia y establecimiento de las plántulas en condiciones de vivero y campo. También la inclusión de microorganismos beneficiosos en los tratamientos preacondicionadores de semillas ha sido una práctica común en la agricultura orgánica para disminuir el *damping-off* (muerte de las plántulas por podredumbre del tallo o la raíz) (Taylor *et al.* 1994; O'Callaghan 2016). Esta técnica se conoce como acondicionamiento biológico o *biopriming* y se basa en la utilización de microorganismos que resultan importantes para el control biológico de fitopatógenos (Welbaum *et al.* 1998). La misma se ha empleado en tratamientos de hidratación parcial con soluciones osmóticas, matriz sólida y agua. Por ejemplo, el acondicionamiento en matriz sólida de semillas de pepino con *Trichoderma harzianum* (hongo facultativo) disminuye significativamente la proliferación del *damping-off* (Taylor *et al.* 1994).

Por su parte, el concepto de *biopriming* es más amplio cuando se aplican tratamientos robustecedores de semillas con material biológico. En este último

tratamiento, se incluye una gran diversidad de sustancias biológicas para mejorar la eficiencia del tratamiento robustecedor. Entre los materiales biológicos se incluyen: extracto de ajo y de moringa, agua de coco, desperdicios de animales y de plantas, etc. (Vanangamudi *et al.* 2006). Igualmente, se emplean sustancias antioxidantes (vitaminas E y C) y nutritivas (sales de potasio) para mejorar el funcionamiento de las semillas. Otra gran cantidad de sustancias se utilizan para fortificar semillas, pero se escapa del objetivo de este acápite. Para obtener mayor información sobre este tema el lector interesado puede revisar la obra de Vanangamudi *et al.* (2006).

Todo lo antes referido demuestra la gran diversidad de sustancias que se han empleado para precondicionar semillas. Sin embargo, el agua resulta un medio de imbibición adecuado para extender a la práctica agrícola los tratamientos pregerminativos de HD, por su relativamente fácil obtención y los resultados altamente satisfactorios que se obtienen para mejorar el funcionamiento de las semillas y plantas sin emplear sustancias tóxicas, aunque recomendamos que no se ignoren los resultados obtenidos con las soluciones osmóticas.

TERMINOLOGÍAS DE LOS TRATAMIENTOS DE HD

Los tratamientos pregerminativos de HD se nombran por una gran diversidad de términos de acuerdo a los métodos y soluciones empleados en los mismos. Sin embargo, la proliferación de nombres se debe tanto a la creación de nuevos procedimientos, como a una incorrecta interpretación por parte de los investigadores de las metodologías que ya existen; llevándolos incluso a renombrar tratamientos pregerminativos

que están bien definidos en la literatura científica. Este problema involucra tanto a jóvenes investigadores como a experimentados y depende también de dónde se publiquen las contribuciones. No solo se desconocen las terminologías existentes sino también los resultados publicados. En ocasiones se propone algo novedoso para la ciencia cuando realmente ya ha sido informado por varios autores, incluso en las llamadas revistas de alto impacto. Esto último ha sucedido en reiteradas oportunidades con los resultados obtenidos por el fisiólogo ruso P. Henckel y colaboradores. Las causas de este fenómeno, que afectan a todos los sectores de las ciencias, son diversas; pero indudablemente se debe a una escasa revisión de la información publicada.

Otro problema que sin dudas incrementa la confusión en los países hispanoparlantes, con relación a las terminologías empleadas, es que la mayoría de ellas fueron publicadas en idioma inglés, o bien en ruso; por cuanto al traducirse al español aparecen nuevos nombres, que en ocasiones no corresponden con el significado original que el autor quiso expresar. No obstante a lo anterior, el término más popular y reconocido en la literatura científica es *seed priming* (Malanassy 1971, citado por Heydecker 1974). Este nombre fue posteriormente divulgado y desarrollado como técnica por el fisiólogo inglés W. Heydecker y su grupo de investigación. A finales de la década del 70 del pasado siglo, y alternativamente a este término, aparecieron dos nuevas terminologías: *osmotic conditioning* o acondicionamiento osmótico y el *osmoconditioning* u osmoacondicionamiento (Khan *et al.* 1978). Estas últimas nomenclaturas se aceptaron por la comunidad científica y evitaron la confusión de los tratamientos

preacondicionadores de semillas con la terminología *priming* utilizada en biología molecular.

El propio Heydecker (1974) empleó diferentes términos para agrupar a los tratamientos de *seed priming* o *priming of seeds*. Así, propuso cuatro tipos de tratamientos de acuerdo a las sustancias o soportes que se utilice. Estas técnicas incluyen el *osmopriming*, semillas remojadas en soluciones osmóticas; el *halopriming*, semillas humedecidas en soluciones salinas; el *biopriming*, semillas cubiertas con microorganismos beneficiosos más tratamientos hídricos y el *solid matrix priming*, técnica que emplea una matriz sólida como agente para regular el suministro de agua a las semillas. A las técnicas de *seed priming*, relativamente reciente algunos investigadores le añadieron la terminología de *hydropriming*, es decir, aquellas semillas que son hidratadas en agua (Fujikura *et al.* 1993). Sin embargo, bajo esta última terminología entran una gran variedad de procedimientos donde el control del agua a la semilla no es exacto. Por ende, es aceptado señalar que para Heydecker (1974) las técnicas de *seed priming* solo agrupan aquellas que emplean soluciones osmóticas o matriz sólida, donde hay un control preciso del agua que se le suministra a las semillas.

De hecho, el procedimiento implementado por Fujikura *et al.* (1993) en semillas de coliflor (*Brassica oleracea*) nunca conllevó un control estricto del agua. El tratamiento consistió en remojar las semillas en agua a 23°C por cinco horas, seguidamente secaron superficialmente las semillas y se colocaron en un recipiente cerrado con un 100% de humedad relativa durante tres días a 23°C, y posteriormente las secaron bajo aire seco a 20°C durante dos días. Por tanto,

los tratamientos de hidroacondicionamiento o *hydropriming* que no involucran un control estricto del suministro de agua a las semillas (es decir, la gran mayoría) podrían considerarse similares a los tratamientos robustecedores de semillas, no a los creados por Henckel (1964), sino a aquellos que evolucionaron a partir de estos (ver por ejemplo a Prisco *et al.* 1978; 1992).

La terminología empleada con los tratamientos robustecedores de semillas (*seed hardening*) también es compleja y se trata de diferentes formas. El término *hardening* literalmente significa endurecimiento. Sin embargo, este nombre se ha empleado para el tratamiento de endurecimiento de plantas en condiciones de vivero. Este tipo de tratamiento implica una deformación plástica de la planta que permanecerá a pesar de desaparecer el estrés (Valladares *et al.* 2004); pero el tratamiento robustecedor de semillas provoca en las semillas y en las plantas tanto una respuesta plástica como elástica (Ramamoorthy 2006), por lo que fisiológicamente sería más correcto hablar de tratamiento robustecedor de semillas. En ruso el término utilizado por P. Henckel es *закаливание*, que literalmente significa temple, pero tiene otras acepciones que significa fortalecer, endurecer y robustecer. Además, cuando este autor publicó sus contribuciones en inglés utilizó diferentes nombres para citar los tratamientos robustecedores de semillas (Henckel 1964; 1970; 1975). Entre estas terminologías sobresale el *presowing drought hardening* o robustecimiento de presiembra contra la sequía y el *presowing hardening* o robustecimiento de presiembra. También empleó el término de *hardenend plants* o plantas robustecidas, para referirse a las plantas procedentes de semillas pretratadas y las expresiones de *presowing*

hardening of seed (robustecimiento de presiembra de semillas) y *heat hardening* (robustecimiento térmico).

En castellano, el primer investigador que utilizó el término de robustecimiento de semillas fue el fisiólogo cubano R. Orta, a partir de las lecturas de los trabajos originales en ruso de P. Henckel y de su contacto personal con dicho autor. Sin embargo, no fue hasta 1993 que se cita por primera vez dicha terminología en un trabajo donde se comparó la efectividad de los tratamientos de HD en agua con aquellos que emplean soluciones osmóticas (Orta *et al.* 1993). Después siguieron otras publicaciones, realizadas en Cuba, donde siempre se ha designado este tratamiento por el término de robustecimiento de semillas (Orta *et al.* 1998; 2004; Sánchez *et al.* 1998; 2001a).

Sin embargo, en México, este tratamiento ha sido llamado en ocasiones como tratamiento robustecedor o endurecedor de semillas en una misma contribución (por ejemplo, Castro-Colina 2007). Incluso el preacondicionamiento natural o *natural priming* inicialmente fue llamado en español como endurecimiento natural de las semillas (González-Zertuche 2005), probablemente refiriéndose al tratamiento robustecedor. Quizás para este último tipo de tratamiento, que sucede casi completamente en condiciones naturales, el término más adecuados (tanto en español como en inglés) sea robustecimiento natural de las semillas o *seed natural hardening*. La terminología empleada en inglés por los creadores de este procedimiento (es decir, *natural priming*) no se ajusta a lo que sucede con las técnicas de *seed priming*. Dichos tratamientos fueron desarrollados en condiciones de laboratorio y plantean un control

estricto de agua (Heydecker *et al.* 1973); aspectos que no se cumplen con el *natural priming*. En cambio, los tratamientos robustecedores de semillas fueron desarrollados sobre la capacidad de adaptación de las plantas a factores adversos del medio; en particular bajo condiciones de sequía (Henckel 1964).

En la actualidad los tratamientos robustecedores de semillas también se agrupan de acuerdo a las sustancias o agentes que se utilizan para robustecer (Vanangamudi *et al.* 2006). Si emplean agua se denominan *hydrohardening* o robustecimiento hídrico; cuando se robustecen con soluciones salinas se denominan *halohardening* o robustecimiento químico; y si utilizan agentes biológicos se designan como *biohardening* o robustecimiento biológico. Otras terminologías manipuladas recientemente para estos tratamientos son el *thermal hardening* o robustecimiento térmico, pero este tratamiento solo involucra una combinación de estratificación en calor y frío para incrementar la germinación y el establecimiento del arroz (*Oryza sativa*) (Farooq *et al.* 2005); y el *osmohardening* que es una combinación de un tratamiento osmocondicionador de semillas con dos ciclos de HD, tal como se propone en el tratamiento robustecedor (Basra *et al.* 2004). En realidad, esta última terminología es nueva para el cultivo empleado, pero no el tratamiento.

Otros términos usados son el de *invigoration* o vigorización y el *seed reinvigoration* o revigorización de semillas, que se aplican cuando se pretende incrementar el vigor de las semillas con los tratamientos de HD (Heydecker *et al.* 1975; Goldsworthy *et al.* 1982; Burgass & Powell 1984; Sánchez *et al.* 2004). También Halmer (2000) bajo la

terminología de *invigoration* agrupó a todos los tratamientos pregerminativos de HD como ya mencionamos. Por su parte, el término de *seed fortification* o fortificación de semillas incluye los tratamientos de vigorización de semillas (Ponnusamy & Ramanadame 2006). Por último, Arjona *et al* (1998) plantearon el calificativo de osmo-iniciación para referirse al remojo de las semillas en soluciones osmóticamente activas. Alternativamente, Sánchez *et al.* (2001a) emplearon las terminologías de tratamientos hídricos, de hidratación parcial y de humedecimiento-desecación como similar a los tratamientos de HD. Posteriormente, Sánchez & Muñoz (2003) agruparon todos los tratamientos pregerminativos de HD bajo la terminología de precondicionamiento fisiológico de las semillas.

Lo anterior nos lleva a recomendar que en ausencia de un criterio claro sobre la terminología a emplear, los autores describan detalladamente las técnicas que aplican a las semillas, para que sus resultados puedan replicarse sin dificultad. La terminología es importante, pero más significativo es conocer qué se hizo y cómo. También es pertinente aclarar, que las reflexiones realizadas en el presente acápite para nada pretenden criticar las valiosas contribuciones realizadas por los diferentes colegas. Solo tratamos de esclarecer desde nuestro punto de vista las terminologías empleadas, para así facilitar su manejo y correcta divulgación.

FACTORES QUE AFECTAN A LOS TRATAMIENTOS DE HD

Muchos son los factores que pueden afectar los resultados de los tratamientos pregerminativos de HD (MacDonald 2000; Padmanabhan 2006); aunque sin dudas, el potencial osmótico de las

soluciones, la temperatura del sustrato, el suplemento de aire a las semillas y la duración de los tratamientos están entre los principales factores. Estos agentes interactúan entre sí y su influencia también está condicionada a las características intrínsecas de cada lote de semillas a tratar, como son por ejemplo: su grado de maduración, humedad inicial y tamaño seminal. A continuación discutiremos los principales factores abióticos/bióticos que afectan el funcionamiento de las semillas durante el tratamiento y su posterior almacenamiento; pero pueden influir muchos más factores, sobre todo aquellos que surjan de sus interacciones.

AIREACIÓN. El contenido de oxígeno durante el precondicionamiento de las semillas puede ser esencial para la germinación y el desarrollo de la plántula, fundamentalmente cuando las semillas se hidratan en soluciones osmóticas muy concentradas, como son los osmóticos de alto peso molecular (Heydecker *et al.* 1975; MacDonald 2000). Sin embargo, no todos los estudios coinciden. De este modo, se conoce que las respuestas al suministro de aire durante el precondicionamiento dependen de cada especie (Prisco *et al.* 1992; Padmanabhan 2006). Otros autores han utilizado la baja disponibilidad de oxígeno en el medio de imbibición (anoxia parcial) para disminuir la velocidad de imbibición de las semillas y con esto lograr sincronizar la hidratación del lote y por consiguiente, de la germinación y el establecimiento de las plántulas (Orta *et al.* 1998). La tensión de oxígeno junto con la humedad del suelo, la temperatura y la iluminación son factores abióticos del ambiente edáfico que intervienen en la germinación (Bewley & Black 1994; Özbingöl *et al.* 1999); por tanto, modelos de hidratación parcial que involucren grandes cantidades de

semillas o soportes de preacondicionamiento que aporten baja disponibilidad de oxígeno deben ser previamente estandarizados.

LUZ. Las especies con semillas fotoblásticas positivas requieren luz blanca para germinar. Por consiguiente, durante el tratamiento estas semillas deben ser iluminadas (MacDonald 2000). Si esto no se cumple los efectos positivos de los tratamientos pueden ser modificados. Sin embargo, también se conoce que el tratamiento de hidratación parcial en condiciones de oscuridad total puede inducir la germinación de muchas especies bajo condiciones adversas de iluminación (Sánchez *et al.* 2003a). Obroucheva & Antipova (1997) propusieron que la activación del fitocromo en las semillas se puede iniciar cuando estas alcanzan entre 17-19% de humedad con base a su peso fresco.

TEMPERATURA. La temperatura junto con el agua son los factores que más se regulan en las tecnologías de HD. La importancia de la temperatura es obvia, ella gobierna la velocidad de las reacciones químicas y por tanto la velocidad de imbibición y de germinación (Bradford 1995; Bewley 1997a). De este modo, se plantea que la temperatura óptima de germinación coincide con la óptima para preacondicionar semillas (Bradford 1986). Igualmente, cada lote de semillas tiene una temperatura óptima de hidratación. Sin embargo, la hidratación de las semillas a temperaturas bajas o subóptimas (por ejemplo a 15°C) para la germinación pueden incrementar la sincronización de germinación al rehidratarse las semillas, debido a que retardan los procesos fisiológicos relacionados con la germinación. Las bajas temperaturas además, reducen la posibilidad de contaminación microbiana de las semillas (MacDonald 2000). Por

último, cambios en la temperatura durante la imbibición de las semillas en soluciones osmóticas pueden alterar el potencial osmótico de las mismas y por consiguiente, afectar los resultados de los tratamientos pregerminativos. Estudios preliminares son necesarios para determinar cuál es la temperatura óptima de germinación, que dependerá a su vez del grado de maduración de las semillas y de su vigor.

POTENCIAL OSMÓTICO. El potencial osmótico de la solución es otro factor que puede afectar la longitud y efectividad del preacondicionamiento de las semillas. Soluciones con bajas concentraciones de sales o PEG permiten una rápida germinación y crecimiento de la radícula, debido a que el potencial de la solución es muy cercano al del agua. Sin embargo, con el aumento de la concentración de la solución se impide la hidratación rápida de las semillas; pero posteriormente a la deshidratación se logra mayor sincronización del proceso germinativo (Parera & Cantliffe 1994). Igualmente, pequeños cambios en el potencial osmótico de las soluciones pueden afectar los resultados de los tratamientos.

TÉCNICAS DE HD. Diferentes técnicas aplicadas a un mismo lote de semillas pueden arrojar resultados diferentes. Esto se debe fundamentalmente a la falta de estandarización de cada técnica para un mismo lote de semillas. Factores como la temperatura, el suministro de agua y oxígeno, la sustancia de imbibición empleada, entre otros, pueden influir marcadamente en la respuesta germinativa; y este efecto es mayor cuando se trabaja con lotes distintos de una misma especie (Parera & Cantliffe 1994; Montejo *et al.* 2005). Diferentes procedencias también pueden producir semillas con diferentes grados de

maduración, vigor inicial y dormancia seminal. En consecuencia, los resultados germinativos pueden ser contradictorios para una misma especie con un único tratamiento hídrico. Esto ha sido bien establecido en diversos cultivos (Heydecker & Coolbear 1977; Welbaum & Bradford 1991) y se ha informado en menor medida para especies arbóreas (Montejo *et al.* 2004; 2005; Montejo & Sánchez 2012).

LONGEVIDAD Y TAMAÑO DE LA SEMILLA. El tamaño de la semilla (masa fresca y/o seca) y su contenido de humedad inicial están entre los atributos seminales que muestran mayor diversidad en las plantas tropicales, y se correlacionan además con la germinación, la longevidad seminal y el establecimiento de las plántulas en distintas condiciones ambientales (Vázquez-Yanes & Orozco-Segovia 1993; Sánchez *et al.* 2009a; 2011). De ahí, que la variabilidad de estos rasgos podría afectar los resultados de los tratamientos de HD. Esta variación seminal no solo se presenta entre especies, puede existir también entre diferentes lotes de una misma especie y dentro de un mismo lote de semillas (heteromorfismo seminal).

Igualmente, muchos árboles tropicales presentan semillas grandes y con alto contenido de humedad (es decir, semillas recalcitrantes); atributos que contribuyen a que pierdan rápidamente su viabilidad en condiciones naturales, o bien cuando se someten a un sobreacondicionamiento o deshidratación violenta durante la implementación de los tratamientos hídricos. Escenario que podría complicarse si se considera que recientes hallazgos, en especies tropicales, notifican semillas recalcitrantes con complejos mecanismos de dormancia, independientemente de su tamaño (Sautu *et al.* 2007; Sánchez *et*

al. 2009b). Por ende, la mayoría de las contribuciones donde se han aplicado los tratamientos preacondicionadores en especies nativas involucran semillas pequeñas, longevas y sin dormancia; y si este último fenómeno existe, no es difícil su eliminación, como es el caso de los árboles tropicales pioneros donde se han implementado con éxito los tratamientos de HD (ver por ejemplo, Sánchez *et al.* 2003a).

Las plantas nativas pioneras además, producen gran número de semillas y juegan un papel importante en la restauración y sucesión vegetal, lo que las convierte en un modelo biológico atractivo para este propósito. Sin embargo, con una estandarización previa de los tratamientos preacondicionadores se pueden aplicar a semillas grandes y de longevidad corta; tal como son los casos de *Quercus rugosa* (Castro-Colina *et al.* 2011) y *Andira inermis* (Sánchez *et al.* datos inéditos).

CALIDAD DE LA SEMILLA. Es otro factor que produce variabilidad en la respuesta germinativa y en los resultados de los tratamientos de HD. También la calidad de la semilla se relaciona con su longevidad, el tamaño seminal y las procedencias de los lotes. En general, se reconoce que el preacondicionamiento mejora la longevidad de las semillas con bajo vigor, pero la reduce en aquellas con vigor inicial alto (Powell *et al.* 2000). Después del tratamiento pregerminativo de hidratación parcial las semillas con alto vigor están más cercanas a la fase III de la germinación, por lo que pueden ser más propensas al deterioro celular. En cambio, las semillas con bajo vigor requieren más tiempo para germinar porque previamente deben reparar los daños celulares antes de cualquier avance de la germinación (Varier *et al.* 2010); fenómeno que podría evitarse

sometiendo las semillas a cortos ciclos de HD en agua, o bien hidratándolas en soluciones osmóticas con bajos potenciales de agua.

DURACIÓN DE LOS PROCESOS DE HD. Hegarty (1978) planteó, que si las semillas se desecan excesivamente después de aplicado el tratamiento pregerminativo, o se mantienen en el estadio de imbibición por períodos muy prolongados, los mecanismos de deterioro celular se impondrán sobre los mecanismos de reparación y activación que se logran con el incremento sostenido y gradual del nivel de hidratación de las semillas. Crevecoeur *et al.* (1976) también señalaron, que la sensibilidad al efecto nocivo de la deshidratación en las semillas de maíz se incrementa con el tiempo transcurrido desde el inicio de la imbibición, es decir, con el nivel de hidratación alcanzado y el desarrollo de los procesos fisiológicos irreversibles. Ellos detectaron que cuando las semillas de maíz se desecan después de un período prolongado de imbibición (72 horas), ocurren afectaciones celulares, como la condensación de la cromatina, degradación del ADN y daños en la ultraestructura de las membranas nucleares y mitocondriales externas que impiden la germinación de las semillas al ser rehidratadas.

Por lo tanto, este efecto no parece producirse por el proceso de desecación en sí, sino por el prolongado tiempo de imbibición parcial, que desencadena el desarrollo irreversible de algunos procesos celulares, que al mismo tiempo agotan las reservas nutricionales disponibles sin alcanzar la germinación del embrión, ya que las semillas no tratadas son capaces de soportar violentas deshidrataciones sin perder la viabilidad (Wedd & Arnott 1982). Por su parte, Bradford (1995) señaló que muchas semillas son tolerantes a la desecación si

el período de hidratación se mantiene hasta la fase II del patrón trifásico de absorción de agua (Fig. 2 y 3) y tienen una limitada capacidad de sobrevivencia a la desecación cuando se inicia la fase de crecimiento (III). Según Welbaum *et al.* (1998) y Taylor *et al.* (1998), la fase de deshidratación de las semillas pretratadas es un paso crítico para el mantenimiento de su calidad y beneficios obtenidos durante la hidratación de las mismas. Allen (1997) también señaló que la velocidad de deshidratación afectó significativamente la velocidad de germinación en semillas de lechuga y de zanahoria (*Daucus carota*), pero fue indiferente en semillas de tomate.

Es bien conocido que durante la aplicación de los tratamientos de humedecimiento-desecación, la hidratación debe ocurrir hasta un punto tal que permita la activación de la mayor parte del aparato metabólico, pero que impida la total emergencia del embrión. El nivel adecuado de hidratación parcial y el momento en que debe procederse a la desecación debe ser determinado empíricamente para las semillas de cada especie, variedad o lote en particular (Bradford *et al.* 1990; Sánchez *et al.* 2001a).

Henckel (1982) planteó que el momento óptimo para deshidratar es cuando ocurre la emergencia de la radícula, es decir, una vez que ocurren todos los procesos fisiológicos relacionados con la germinación de las semillas. En cambio, McKersie & Tomes (1980) y Dasgupta *et al.* (1982) demostraron que el momento óptimo para deshidratar y robustecer son dos horas antes de la emergencia de la radícula, debido a que en este punto el eje embrionario es más resistente a la deshidratación. Según Goldsworthy *et al.* (1982), con cortos períodos de imbibición se logran revigorizar semillas envejecidas. En cambio, Heydecker *et al.*

(1973), Khan *et al.* (1978) y Özbingöl *et al.* (1998) lograron acelerar y uniformar la germinación sometiendo las semillas a largos períodos de imbibición, aproximadamente hasta la mitad o final de la fase II del proceso de imbibición (Fig. 2). Se conoce que las semillas conservan su tolerancia a la desecación, tanto en condiciones naturales como cuando son sometidas a tratamientos hídricos mientras se encuentran en la fase II, y esta tolerancia a la desecación disminuye cuando se inicia el crecimiento del embrión o se llega a la fase III de la germinación (Taylor *et al.* 1998; Welbaum *et al.* 1998). Sin embargo, no todos los autores están de acuerdo con esta afirmación, y proponen que las semillas recién germinadas pueden pasar por un proceso de desecación ya que sintetizan proteínas que le confieren resistencia al estrés (Henckel 1982; Bruggink & van der Toorn 1995). Por consiguiente, la aplicación o utilidad de estos tratamientos dependerá de los cambios bioquímicos y fisiológicos que se promuevan en las semillas durante los ciclos de HD.

ALMACENAMIENTO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE HD. Las condiciones de almacenamiento y su duración pueden afectar los resultados de los tratamientos de HD; sin embargo, estos aspectos se han ignorado por los investigadores y productores de semillas, aunque usualmente las semillas se almacenan después de ser tratadas. Numerosas pueden ser las causas que afecten el vigor y viabilidad de las semillas tratadas cuando se almacenan, pero el desarrollo acelerado de microorganismos patógenos en la testa seminal influye significativamente en su deterioro (Welbaum *et al.* 1998). No obstante, en este aspecto se demandan más estudios para precisar los requerimientos de almacenamiento de las semillas tratadas.

UTILIDAD DE LOS TRATAMIENTOS DE HD EN LA PRÁCTICA AGRÍCOLA

En la actualidad los tratamientos de HD se investigan fundamentalmente con los siguientes fines prácticos: 1) revigorización de semillas para incrementar el vigor y la longevidad durante el almacenamiento; 2) acondicionamiento de semillas frescas para incrementar, acelerar y sincronizar su germinación; 3) acondicionamiento de semillas para eliminar dormancia orgánica o impuesta y 4) robustecimiento de semillas para incrementar la germinación, el establecimiento y los rendimientos de las plantas bajo condiciones ambientales adversas (McDonald, 2000; Sánchez *et al.*, 2001a; Vanangamudi *et al.* 2006; Ibrahim 2016). Estos procedimientos igualmente se han empleado con otros propósitos biológicos y prácticos (ver para mayor revisión a Sánchez *et al.*, 2001a); pero en general, su uso está condicionado a los objetivos que persiguen los investigadores y a las características de los lotes de semillas usados, pues los tratamientos influyen en muchos eventos bioquímicos-fisiológicos relacionados con la germinación, la longevidad, la dormancia, el crecimiento y los rendimientos de las plantas tanto bajo condiciones ecológicas óptimas como adversas.

También constituyen un modelo experimental adecuado para conocer la plasticidad fenotípica de las plantas bajo condiciones ambientales cambiantes (norma de reacción de las plantas); y por consecuencia, una ecotecnología de bajos insumos que es efectiva para mejorar el funcionamiento de las plantas bajo los posibles escenarios ambientales inducidos por el Cambio Climático (Sánchez *et al.* 2011).

REVIGORIZACIÓN DE SEMILLAS PARA RECUPERAR VIGOR E INCREMENTAR LA LONGEVIDAD

La pérdida de la viabilidad o deterioro de las semillas por el envejecimiento se debe fundamentalmente a: la acumulación de radicales libres, déficit de sustancias de reservas, acumulación de inhibidores del crecimiento, agentes mutágenos y la desnaturalización de los ácidos nucleicos, las proteínas y lipoproteínas celulares (McDonald 2000). Por lo tanto, los tratamientos de hidratación parcial además de producir la activación general del aparato metabólico relacionado con la fase pregerminativa, restauran la integridad de las células (autoreparación enzimática de las membranas) a través de la síntesis de lípidos, proteínas, ARN y ADN como fue descrito en semillas frescas por Bewley & Black (1994) y Bewley (1997a). También existen evidencias de que los tratamientos de hidratación parcial de las semillas activan mecanismos de reparación de ADN, proteínas, membranas y enzimas, así como los sistemas desintoxicantes (eliminadores de radicales libres) (Varier *et al.* 2010; Hussian *et al.* 2014). El incremento de la actividad antioxidante en las células evita fundamentalmente la peroxidación lipídica y con ello el envejecimiento de las semillas (McDonald 1999).

Thanos *et al.* (1989) estudiaron la relación existente entre el osmoacondicionamiento y el envejecimiento de las semillas de pimiento (*Capsicum annuum*) almacenadas durante tres años. Ellos lograron con un ciclo de osmoacondicionamiento en manitol antes y/o después del almacenamiento, incrementar significativamente la germinación con respecto a las semillas no tratadas; lo que demuestra, probablemente, la participación de estos tratamientos en la

activación de los procesos reparadores de membranas, reportados en otras especies (Ward & Powell 1983; Burgass & Powell 1984).

Goldsworthy *et al.* (1982) lograron revigorar semillas de trigo (*Triticum aestivum*) con 30 minutos de imbibición. Concluyeron además, que los mecanismos reparadores de membranas actúan en ausencia de oxígeno, lo que facilita el uso comercial de este método de inmersión total en agua. Sin embargo, otros estudios han sugerido que el oxígeno incrementa los procesos reparadores en las semillas envejecidas cuando estas alcanzan alto contenido de humedad (24-44%) (Ibrahim *et al.* 1983; Petruzzeli 1986), lo cual demuestra que la actividad respiratoria es un componente esencial en los procesos reparadores (McDonald 2000).

Por su parte, Punjab & Basu (1982) reportaron que el acondicionamiento aplicado a semillas de lechuga, incrementó sensiblemente la resistencia de las mismas a condiciones adversas de almacenamiento y minimizó el efecto nocivo de las radiaciones ionizantes aplicadas antes o después del acondicionamiento, reduciéndose la concentración de radicales libres en semillas tratadas con respecto al testigo. En investigaciones similares realizadas con la misma especie, Rao *et al.* (1987) aseguran que el acondicionamiento muestra un efecto profiláctico somero; pero sí un efecto terapéutico notable con relación al almacenamiento de las semillas en condiciones adversas, expresado en: disminución del número de aberraciones cromosómicas y anomalías morfológicas de las plantas, e incremento de la velocidad de crecimiento de las raíces con respecto a las plantas

provenientes de semillas almacenadas no acondicionadas.

Dearman *et al.* (1986) determinaron que en semillas frescas de cebolla (*Allium cepa*) se incrementa la resistencia al almacenamiento después del tratamiento de hidratación parcial; pero la aplicación de este tratamiento a semillas envejecidas no mostró ningún efecto. Por el contrario, el acondicionamiento aplicado a embriones de trigo con diferentes grados de viabilidad resultó adecuado para incrementar la velocidad de síntesis de proteínas, ARN y ADN de los embriones tratados con relación al testigo (Dell'Aquila *et al.* 1978). Alvarado & Bradford (1988) sometiendo las semillas de tomate a tratamientos acondicionadores lograron retener la calidad de las mismas cuando se almacenaron por varios años a 10°C; pero se reduce considerablemente su longevidad cuando se almacenan a altas temperaturas.

Igualmente, Tarquis & Bradford (1992), Corbineau *et al.* (1994) y Chojnowski *et al.* (1997) demostraron que cuando las semillas de diferentes cultivos se someten a los tratamientos pregerminativos de HD son más sensibles al envejecimiento acelerado que las no tratadas. Según Chojnowski *et al.* (1997), esto podría deberse a la fase de deshidratación de los tratamientos revigorizadores que afectan los mecanismos enzimáticos protectores de membranas, como sucede en las semillas frescas de girasol (*Heliantus annuus*) al someterse al deterioro celular inducido por el envejecimiento acelerado (Bailly *et al.* 1996). También estas aparentes contradicciones en los resultados obtenidos con los tratamientos revigorizadores pudieran deberse a problemas de procedimiento, al desconocerse empíricamente los requerimientos exactos de las

semillas de cada especie, variedad o lote en particular.

En plantas silvestres pocos son los resultados que se han informado para revigorizar semillas envejecidas, aunque este fenómeno es típico en bancos de germoplasma de especies forestales tropicales, donde las condiciones de almacenamiento no son adecuadas dado el coste que representan. Así, es típico que las semillas almacenadas de muchas plantas nativas tropicales tengan baja capacidad germinativa y viabilidad, y también alta producción de plántulas anormales (MacDonald 2000). En Cuba, con los tratamientos de HD se lograron revigorizar semillas envejecidas de tres especies arbóreas tropicales (*Trichospermum mexicanum*, *Hibiscus elatus* y *Guazuma ulmifolia*) (Sánchez *et al.* 2004); y cuando las semillas se sometieron a largos períodos de envejecimiento acelerado (ocho días), los mejores resultados para incrementar la germinación se obtuvieron con ciclos cortos de hidratación parcial (Fig. 11). Por tanto, los efectos favorables que se obtienen con los tratamientos se deben, tanto a la activación de eventos relacionados con la germinación como aquellos afines a la reparación de daños celulares (Sánchez *et al.* 2004). También Montejo *et al.* (2004) incrementaron la germinación de semillas de *H. elatus* con un ciclo de HD en agua después de su almacenamiento en condiciones de laboratorio durante nueve meses. La hidratación parcial en agua durante cuatro horas igualmente fue efectiva para incrementar la germinación de semillas almacenadas de *Parkia pendula* (Vargas & Ferraz 2008).

Por su parte, en semillas envejecidas de leguminosas arbóreas (*Albizia lebeck*, *Gliricidia sepium* y *Leucaena leucocephala*)

y de leguminosas herbáceas (*Crotalaria spectabilis*, *Macroptilium atropurpureum* y *Mimosa invisa*) con ciclos cortos de HD también se consiguieron efectos revigorizadores, siendo más evidentes los resultados al incrementarse el estrés calórico del sustrato (Sánchez *et al.* 2005; González *et al.* 2009a). Estos efectos demostraron que los tratamientos pregerminativos de HD no solo activaron el aparato metabólico relacionado con la germinación y los mecanismos de reparación de daños celulares, sino que también estimularon procesos bioquímicos-fisiológicos relacionados con la tolerancia al estrés ambiental (Henckel 1964; Sánchez *et al.* 2001a), que permanecen latentes bajo condiciones ambientales óptimas.

De hecho, existe una relación muy cercana entre la abundancia de ciertas proteínas (que están presentes durante el desarrollo de las semillas) y la longevidad seminal (Rajjou & Debeaujon 2008). En semillas ortodoxas, la tolerancia a la desecación (estrés hídrico) y el estado quiescente se asocian con las proteínas LEA (abundantes en los estados tardíos de la embriogénesis o maduración de las semillas), las proteínas de choque térmico (HSP o *heat shock proteins*) o proteínas antiestrés y las proteínas de las reservas seminales (Rajjou & Debeaujon 2008). Los dos primeros grupos de proteínas incrementan su sobreexpresión durante el preacondicionamiento de las semillas, en particular durante la fase de deshidratación; pero también pueden ocurrir en mayor cantidad cuando se aplica algún tipo de estrés durante la hidratación de las semillas (por ejemplo, choque térmico), o bien cuando las semillas son remojadas en soluciones osmóticas, como el PEG, donde la hidratación es incompleta por el estrés osmótico creado con la solución (González-Zertuche 2005; Varier *et al.*

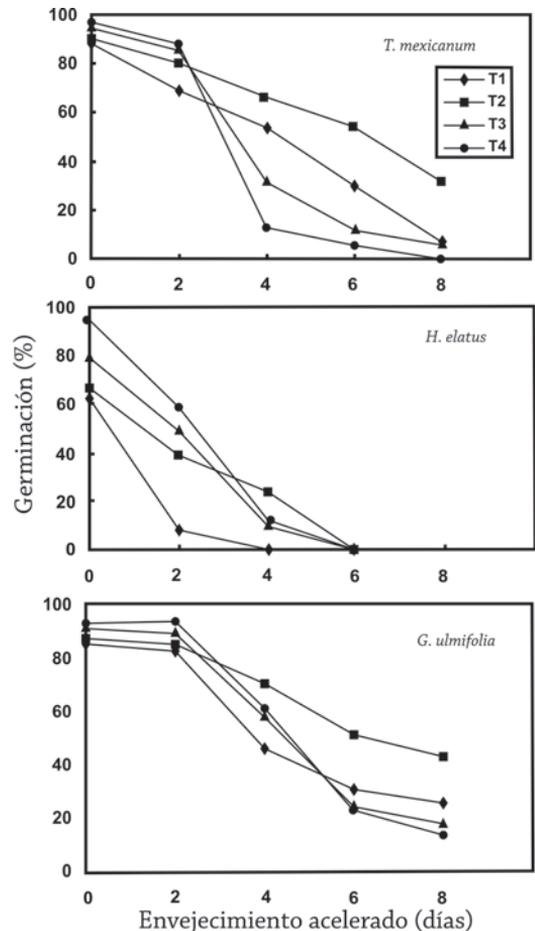


Figura 11. Efectos de la duración del envejecimiento acelerado y de los tratamientos pregerminativos de HD sobre el porcentaje de germinación final de semillas de especies arbóreas pioneras. T1: semillas no tratadas (control); T2: semillas hidratadas hasta el final de la fase I; T3: semillas hidratadas hasta aproximadamente la mitad de la fase II, y T4: semillas hidratadas hasta dos horas antes de la primera señal visible de la germinación. Las líneas verticales representan el error estándar de las medias. Modificado de Sánchez *et al.* (2004).

2010). Esta última condición de estrés igualmente se puede lograr con cortos períodos de hidratación parcial en agua.

Por su parte, las proteínas de choque térmico actúan fundamentalmente

como proteínas chaperonas y además participan en la protección de otras proteínas contra los daños oxidativos inducidos por el envejecimiento acelerado, o bien provocados por el envejecimiento natural (Rajjou & Debeaujon 2008; Varier *et al.* 2010). En consecuencia, las proteínas de choque térmico mantienen la integridad de las membranas celulares, especialmente bajo condiciones de estrés calórico (Al-Whaibi 2010). Es válido aclarar que la denominación de proteínas de choque térmico se debe a que fueron detectadas por primera vez por un estrés térmico inducido en moscas del género *Drosophila*. Sin embargo, esto no implica que la respuesta al choque térmico sea única. En otras condiciones de estrés abiótico/biótico diversas plantas producen proteínas de choque térmico (sequía, salinidad, metales pesados, altas intensidades de radiaciones solares, pH extremos, estrés oxidativo y osmótico) y también bajo la combinación de múltiples condiciones de estrés (Al-Whaibi 2010). De hecho, esta condición combinada de estrés es la que encuentran las plantas, con mayor frecuencia, en condiciones naturales y es la que promueve a su vez el desarrollo de múltiples mecanismos de tolerancia al estrés, entre los que sobresalen la producción de proteínas de choque térmico (Wang *et al.* 2003; Jisha *et al.* 2013; Ibrahim 2016).

Una característica genérica de las proteínas chaperonas, es que involucran reacciones dependientes de ATP (Trifosfato de Adenosina) en los procesos en que actúan (Al-Whaibi 2010); y por otro lado, se conoce que el tratamiento precondicionador incrementa el metabolismo energético (cantidad de ATP disponible) en las semillas tratadas, al igual que la integridad de las mitocondrias y su número, y por tanto el vigor seminal

(Varier *et al.* 2010). Sin embargo, aunque ahora se conocen con más detalles los procesos moleculares que involucran la tolerancia al estrés, debemos señalar que muchos de estos resultados fueron informados inicialmente por Henckel (1964; 1970). Él señaló que en las plantas robustecidas, el alto nivel energético inducido por el tratamiento robustecedor permitía mantener la integridad de las mitocondrias y la reparación y renovación de las proteínas; principalmente después de los procesos de deshidratación y sobrecalentamiento, que como ya sabemos generan estrés oxidativo que conlleva al envejecimiento celular. Por su parte, Varier *et al.* (2010) plantearon que a pesar de todo el avance molecular logrado se necesitaban más investigaciones para dilucidar la asociación entre el mejoramiento de la integridad mitocondrial por el preacondicionamiento de las semillas y el funcionamiento de este orgánulo.

En general, se deben incrementar las investigaciones relacionadas con los efectos de los tratamientos pregerminativos de HD sobre la viabilidad o vigor seminal. En el orden práctico estos procedimientos podrían significar una metodología sencilla y rápida para mejorar el funcionamiento de las semillas de interés agroforestal, tanto en la producción directa, como en su conservación en bancos de germoplasma.

ACONDICIONAMIENTO DE SEMILLAS FRESCAS PARA INCREMENTAR Y SINCRONIZAR LA GERMINACIÓN Y EL ESTABLECIMIENTO

Cualquier lote de semillas, por homogéneo que sea, deberá presentar un comportamiento fisiológico con distribución normal para cualquier variable que se observe. Ese comportamiento se

corresponde con la variabilidad genética del lote, expresado en las características de cada semilla, y en general, es la expresión de la adaptabilidad de la especie para asegurar su perpetuación en un determinado rango de condiciones ambientales (Caver 1983).

Aún las especies y unidades cultivadas, que han pasado un riguroso proceso de selección genética, presentan también diversidad (o dispersión) en su comportamiento germinativo (Fig. 8), lo que constituye una ventaja desde el punto de vista ecológico para evadir la incertidumbre del ambiente; pero el comportamiento heterogéneo atenta contra la aplicación de tratamientos agrotécnicos y silvícolas masivos, al estar constituidas las poblaciones por individuos en diferentes estadios de desarrollo. El acondicionamiento de las semillas contribuye a la homogeneidad conductual de la germinación de un lote (Fig. 7 y 8), además de acelerar e incrementar otros procesos de interés agronómico, como son por ejemplo: la floración y producción de frutos (rendimientos) (Bradford 1986; Sánchez *et al.* 2001a). El mejoramiento del funcionamiento de la germinación por los tratamientos descritos, no solo se debe a la activación de los eventos metabólicos relacionados con la fase pregerminativa, sino también al incremento del contenido de ADN y ATP en las semillas (Özbingöl *et al.* 1999; McDonald 2000); existe una correlación positiva entre la replicación de ADN y los efectos positivos logrados con los tratamientos (Özbingöl *et al.* 1999; Powell *et al.* 2000).

En la práctica se aplican diferentes sustancias y métodos (descritos anteriormente) para que las semillas logren el mismo nivel de humedad y estado fisiológico deseado. Los mejores resultados

experimentales generalmente se alcanzan con soluciones poliméricas, como el polietilenglicol (Heydecker *et al.* 1973; Bradford 1986); pero en condiciones agronómicas, resultan más simples y baratos los métodos de imbibición parcial en agua, que han demostrado ser eficientes no únicamente para incrementar, acelerar y uniformar la germinación (Gray *et al.* 1990a; Jett *et al.* 1996; Sánchez *et al.* 1997; Orta *et al.* 1998), sino también para sincronizar e incrementar el establecimiento y los rendimientos de los cultivos (Henckel 1982; Khan *et al.* 1983; Harris *et al.* 1999; Sánchez *et al.* 1999b).

Diversos autores (Bradford *et al.* 1988; Jett *et al.* 1996; Welbaum *et al.* 1998; Sánchez *et al.* 2006) plantearon que los tratamientos de hidratación parcial incrementan y sincronizan el establecimiento debido a que aceleran la emergencia de las plántulas (lo que evita la incertidumbre del ambiente) y disminuyen la pérdida de electrolitos por las semillas (aminoácidos y azúcares). Esto último contribuye considerablemente a disminuir los ataques fúngicos. También los referidos procedimientos estimulan enzimas que son esenciales para la desintegración de macromoléculas (ej. proteínas, lípidos, etc.) necesarias para el crecimiento y desarrollo del embrión y por consiguiente para la emergencia de las plántulas (Ibrahim 2016).

ACONDICIONAMIENTO DE SEMILLAS PARA ELIMINAR DORMANCIA PRIMARIA O IMPUESTA

En previo acápite se presentó la clasificación de dormancia seminal propuesta por Baskin & Baskin (2004; 2014) que aceptamos como la clasificación óptima (por su simplicidad y aplicabilidad) para especies tropicales. Sin embargo,

aunque aceptamos tal clasificación, en el presente acápite seguiremos la propuesta por Bewley & Black (1994), dado que es la que más ha sido utilizada en la discusión de los efectos de los tratamientos hídricos sobre la dormancia (Sánchez *et al.* 2001a). De este modo, en lo adelante utilizaremos los términos de dormancia primaria o dormancia impuesta para definir la incapacidad de germinación de semillas viables debido a propiedades inherentes a la semilla en sí o a factores del medio, respectivamente.

ACONDICIONAMIENTO PARA ELIMINAR DORMANCIA PRIMARIA

Levitt y Hamm (1943) lograron acelerar el proceso de postmaduración en las semillas de *Taraxacum kok-saghyz* mediante la aplicación de soluciones salinas. Posteriormente, Heydecker y Coolbear (1977) y Wiebe y Tiessen (1979) también determinaron que los tratamientos acondicionadores intervienen en la maduración fisiológica de las semillas. De acuerdo a lo anteriormente planteado, las semillas inmaduras deben ser más beneficiadas por los tratamientos acondicionadores, que las semillas completamente maduras o sin dormancia primaria. Bradford *et al.* (1990) comprobaron esta hipótesis en 42 lotes de semillas de pimiento de diferentes grados de maduración. Ellos lograron los mejores resultados para incrementar y acelerar la germinación, cuando los tratamientos acondicionadores fueron aplicados en semillas frescas con bajo poder germinativo inicial o inmaduras.

Welbaum & Bradford (1991) y Oluoch & Welbaum (1996) determinaron que la efectividad de estos tratamientos en semillas de melón de castilla (*Cucumis melo*) depende del grado de maduración que tengan las mismas en su momento

de obtención. Concluyeron además, que el incremento de la germinación por la hidratación parcial no solo se debe a la activación de los mecanismos reparadores de membranas reportados en diferentes cultivos (Ward & Powell 1983; Dearman *et al.* 1986); al parecer, están involucrados otros procesos relacionados con la maduración fisiológica de las semillas. También se conoce que los tratamientos hídricos disminuyen la resistencia mecánica que ofrece el endospermo a la emergencia de la radícula; al parecer dichos procedimientos activan la endo- β -manasa, enzima responsable de la degradación del endospermo (Bewley 1997b; Welbaum *et al.* 1998; Mondal *et al.* 2011).

Kermode *et al.* (1985) proponen que los tratamientos preacondicionadores promueven la maduración de las semillas porque inducen la expresión completa de los genes relacionados con la germinación; mientras que otros autores sugieren que el acondicionamiento mejora la germinación de las semillas dormantes porque aumentan la actividad respiratoria, la síntesis de proteínas, ARN y ADN. Chojnoswki *et al.* (1997) además, determinaron que los referidos procedimientos incrementan la capacidad de convertir al ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico en etileno, compuesto este último responsable de la maduración fisiológica de las semillas y por consiguiente de la germinación (Bewley & Black 1994).

Los tratamientos acondicionadores igualmente eliminan dormancia fisiológica, morfológica o morfofisiológica (Ibrahim 2016); y al parecer, también pueden romper dormancia debido a la impermeabilidad de las cubiertas de las semillas, como sucede en *Vigna unguiculata* (Ellis *et al.* 1982). La humidificación

de las semillas de esta especie con posterioridad de haber sido almacenada en seco (4,4 a 4,5% de contenido de humedad) y también antes de ser sembradas, permite incrementar el porcentaje de germinación final con respecto al testigo. Este comportamiento de las semillas de *V. unguiculata* pudiera estar relacionado con los efectos colaterales del tratamiento acondicionador sobre los mecanismos de dormancia típicos de las leguminosas y otras especies con “semillas duras”, descritos por Potsov (1976) y basados en evidencias de la correlación que existe entre la desecación y el incremento del nivel de dormancia de las semillas de este tipo.

En contraste, en semillas de especies nativas de interés en proyectos de restauración tropical, pocos son los reportes sobre los efectos de los tratamientos pregerminativos de HD en la dormancia primaria. De hecho, en la mayoría de las publicaciones que comentan sobre dormancia seminal y tratamientos hídricos se refieren a la dormancia impuesta por condiciones adversas de luz, temperatura y agua (Sánchez *et al.* 2001a). Por otra parte, en los bosques tropicales húmedos más de 40% de las especies presentan dormancia seminal (fundamentalmente fisiológica de tipo no profunda) como obstáculo fundamental para su reproducción en vivero; por tanto, los tratamientos preacondicionadores de semillas son una vía fisiológica adecuada para eliminar dormancia primaria en dichas especies.

Evidentemente la aplicación efectiva de los tratamientos de hidratación parcial en las semillas duras debe ir precedida de un tratamiento de escarificación que permita el intercambio de agua entre las semillas y el medio. Sin embargo, la simple hidratación o remojo de las

semillas puede eliminar inhibidores hidrosolubles de la germinación presentes en las cubiertas seminales, o bien provocar cambios en la integridad de la cubierta seminal, tal como se ha reportado para especies cultivadas. En Cuba, los primeros resultados para eliminar dormancia primaria con los tratamientos hídricos se obtuvieron en semillas frescas de *H. elatus*, esta especie presenta un 12% de semillas con dormancia física (*sensu* Baskin & Baskin 2004) y al menos un 60% con dormancia fisiológica no profunda (Montejo *et al.* 2004). El tratamiento de hidratación parcial en agua en semillas intactas logró duplicar la germinación final y también acelerar dicho proceso. La efectividad de dicho tratamiento se comprobó además en dos procedencias de sitios naturales de *H. elatus*. Según Montejo *et al.* (2004), su efectividad podría deberse posiblemente a cambios en la integridad de la cubierta seminal y/o robustecimiento del embrión, que se hace más fuerte y con esto logra atravesar las estructuras que lo rodean. Sin embargo, también podrían estar involucrados otros eventos metabólicos relacionados con la fase temprana de la germinación, como son por ejemplo: incremento del volumen del embrión y número de células embrionarias y aumento de actividad de las enzimas que degradan el endospermo que rodea la radícula (Gray *et al.* 1990b; MacDonald 2000).

Con el tratamiento de preacondicionamiento natural Orozco-Segovia *et al.* (2007) eliminaron dormancia fisiológica en semillas de *Opuntia tomentosa*. Ellos determinaron que el enterramiento de las semillas, en suelo del sitio de colecta, incrementó el potencial de crecimiento del embrión y con esto la entrada de agua a las semillas y la emergencia de la radícula. En semillas de *A.*

inermis (árbol tropical no pionero de Centroamérica) también se comprobó la validez de los tratamientos hídricos para eliminar dormancia fisiológica (Sánchez *et al.* datos inéditos). Las semillas de esta especie son recalcitrantes típicas y la profundidad de su dormancia fisiológica aumenta al disminuir el tamaño seminal (Fig. 12). Por ende, la efectividad del tratamiento de hidratación parcial (imbibición en agua durante cinco días y deshidratadas durante 48 horas) se incrementó en las semillas de tamaño pequeño y mediano. En las semillas grandes el tratamiento deprimió la germinación con relación al tratamiento control; lo cual probablemente se debió al desarrollo de procesos fisiológicos irreversibles que se activaron rápidamente en estas, dado que presentaron menor grado de dormancia seminal, o bien a una mayor sensibilidad a la deshidratación.

Los tratamientos precondicionadores igualmente fueron adecuados para mejorar la germinación de *Dracaena cubensis* (arbusto endémico del oriente de Cuba) (García *et al.* 2003), que abunda en bosques de pinares y matorral

xeromorfo espinoso de llanura. Los procedimientos eliminaron dormancia morfofisiológica en una fracción de la población de semillas e incrementaron su termotolerancia durante la germinación (Fig. 13). En esta especie la efectividad de los tratamientos se acrecentó con el nivel de humedad que alcanzaron las semillas. También, recientemente se comprobó que los ciclos de HD en combinación con altas temperaturas alternas del sustrato redujeron la dormancia física en lotes de semillas frescas de *Guazuma ulmifolia* (Martínez & Sánchez 2016), tal como se propone que ocurra en condiciones naturales.

ACONDICIONAMIENTO PARA ELIMINAR DORMANCIA IMPUESTA

Thanos & Georghiou (1988), al osmocondicionar semillas de pepino y de tomate en soluciones de sacarosa, manitol y NaCl lograron incrementar y acelerar significativamente la germinación bajo condiciones adversas de iluminación. En semillas frescas de pepino también Sánchez & Muñoz (2002), con un tratamiento de hidratación parcial en agua, lograron aumentar la germinación



Tipo de semilla/tamaño	Masa fresca (mg)	Germinación (%) Control	Germinación (%) Tratamiento
Morfo I (< 29,9 mm)	5451,9	30	93
Morfo II (30,0 - 34,0 mm)	9092,0	63	85
Morfo II (>35,0 mm)	14342,5	92	60

Figura 12. Variación en el tamaño de las semillas de *Andira inermis* y efectos de los tratamientos de hidratación-deshidratación según el tamaño seminal. La dormancia fisiológica aumenta al disminuir el tamaño seminal. Elaborado a partir de datos inéditos de Jorge A. Sánchez.

en condiciones de oscuridad total y bajo irradiaciones continuas de rojo lejano. Este efecto se debe al mecanismo alternativo de escape del fitocromo, que al rehidratarse incrementa los niveles de fitocromo activo en las semillas y por consiguiente, desencadena la germinación. Normalmente las semillas fotosensibles al ser irradiadas con luz blanca o roja eliminan la fotoinhibición (Bewley & Black 1982). Sin embargo, esta no es la única vía para lograr que el fitocromo inactivo (inhibidor de la germinación) pase a su forma activa. Diversas investigaciones (revisar por ejemplo Orozco Segovia & Vázquez-Yanes 1992) han demostrado que el fenómeno está muy correlacionado con el ambiente edafoclimático que rodea las semillas. Se conoce que existen formas bioquímicas intermedias del fitocromo activo que requieren de humedad para pasar a la forma activa del pigmento (Bewley & Black 1994). De este modo, se establece la participación de los tratamientos pregerminativos de hidratación parcial en el proceso, es decir, permiten la rehidratación del fitocromo y con esto la activación y el inicio de la germinación en ambientes lumínicos no adecuados para la germinación. En semillas de árboles tropicales pioneros donde la germinación por lo general está condicionada por la formación de claros en los bosques (sitios con alta iluminación), igualmente se comprobó la efectividad de los tratamientos hídricos para inducir germinación bajo condiciones adversas de iluminación (Sánchez *et al.* 2003a).

Los tratamientos acondicionadores también se han utilizado para evitar la termoinhibición de las semillas en temperaturas subóptimas y supraóptimas de germinación (Welbaum & Bradford 1991; Khan 1992). En este sentido, Cantliffe *et al.* (1984) acondicionando

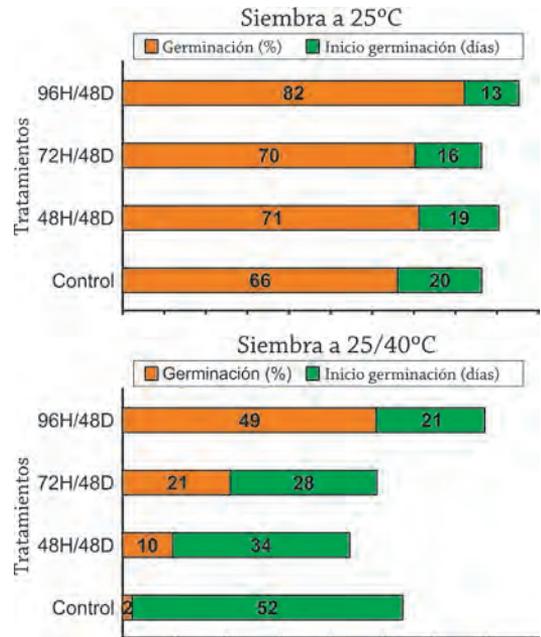


Figura 13. Efectos de diferentes ciclos de hidratación-deshidratación sobre la germinación de *Dracaena cubensis*. Los tiempos de hidratación aplicados fueron de 48, 72 y 96 horas y la deshidratación ocurrió durante 48 horas. Elaborado de datos inéditos de Jorge A. Sánchez.

semillas de lechuga en soluciones de K_3PO_4 y en agua lograron eliminar la termoinhibición que adquieren las semillas de esta especie cuando se siembran a $35^\circ C$. Concluyeron que tal efecto se debe a la activación de eventos metabólicos irreversibles, como la elongación celular durante la fase de hidratación de los tratamientos acondicionadores, que permite la germinación aún cuando las semillas se rehidraten en temperaturas inadecuadas. Estos autores además plantearon, que la termodormancia en las semillas se impone por la inhibición de la elongación y división celular, como ocurre en las semillas no tratadas o tésigo. Welbaum & Bradford (1991) acondicionando semillas de melón de castilla en solución salina también, lograron eliminar termodormancia a temperaturas

subóptimas; lo que demuestra la efectividad de los tratamientos para evitar la termoinhibición.

En *T. mexicanum* la termoinhibición que adquieren las semillas frescas e intactas a temperaturas fijas de 25°C y 30°C se eliminó parcialmente con la prehidratación de las semillas (Sánchez & Muñoz 2004). Resultados que también se demostraron en condiciones de campo (Sánchez & Muñoz 2004); lo que significa que los ciclos de HD que sufren las semillas, en el interior del bosque, eliminan la dormancia inducida que adquieren las mismas por temperaturas inadecuadas para la germinación.

ROBUSTECIMIENTO DE SEMILLAS PARA INCREMENTAR GERMINACIÓN, ESTABLECIMIENTO Y RENDIMIENTOS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS

Heydecker (1977) en sus compilaciones sobre estrés y germinación revisó la literatura existente sobre tratamientos robustecedores de semillas (*seed hardening*) y concluyó que, excepto en muy raras contribuciones, casi toda la teoría sobre estos tratamientos se basa en los resultados obtenidos por P. Henckel y colaboradores en Rusia. En la actualidad, dichos procedimientos tienen una amplia divulgación a nivel mundial y se han aplicado a un gran número de especies de interés para sistemas agroforestales y silvopastoriles.

Los tratamientos robustecedores desarrollados en Rusia se realizan por métodos muy simples, consisten en agregar cantidades limitadas de agua a las semillas de manera que el nivel de hidratación que alcancen permita solo la emergencia incipiente del embrión, que bajo este estado debe permanecer durante una o varias jornadas de desecación al

aire (Henckel 1964). Así, las plantas durante las primeras etapas del desarrollo, sufren el estrés hídrico provocado por el tratamiento y activan numerosos mecanismos fisiológicos de resistencia al estrés, que permanecerán latentes en condiciones ambientales idóneas (Heydecker 1977).

La expresión fenotípica de esta relación genotipo-ambiente se traduce en profundos cambios bioquímicos y fisiológicos que incrementan la tolerancia de las plantas no solo a la sequía, sino también a las altas o bajas temperaturas y a la salinidad, a partir de la germinación y durante todo el desarrollo hasta los valores finales de crecimiento y rendimiento de los cultivos. Efectos que son muy atractivos, debido a que las condiciones de estrés son las que usualmente encuentran las semillas y plántulas en condiciones de vivero o de campo (Bradford 1995; Sánchez *et al.* 2001a, Ibrahim 2016). De hecho, en diversas especies arbóreas se ha determinado que existe una correspondencia casi exacta entre el porcentaje de emergencia final de las plántulas en vivero y el porcentaje de germinación final alcanzado en el laboratorio bajo condiciones de estrés calórico y tratamientos pregerminativos similares (Fig. 14) (Sánchez *et al.* 2005; 2006). Es decir, al incrementarse la germinación con los tratamientos robustecedores de semillas se incrementó linealmente la emergencia final de las plántulas, y también su crecimiento en condiciones de vivero y campo (Tabla 2) (Sánchez *et al.* 2003a; 2006; Bravo *et al.* 2011).

Según Henckel (1964; 1975) y Henckel & Tvorus (1978; 1982), las características adaptativas adquiridas por las plantas después del tratamiento robustecedor pueden resumirse como: 1)

citoplasma con alta viscosidad y elasticidad; 2) alto nivel hidrofílico de los coloides citoplasmáticos; 3) mayores contenidos de ARN, ADN citoplasmáticos y ATP; 4) incremento de la retención del agua; 5) mayor resistencia de polisomas al recalentamiento y a la deshidratación; 6) recuperación más rápida de las funciones perdidas después de la sequía, como por ejemplo la fosforilación oxidativa; 7) estructuras xeromórficas específicas, como células más pequeñas y 8) sistemas regenerativos mejor protegidos contra daños ambientales.

Igualmente, el potencial de agua teórico necesario para alcanzar el 40% de la germinación (Ψ_{40}) y para la inhibición de la germinación o base (Ψ_b) disminuyeron significativamente (es decir, a valores más negativos) cuando las semillas de árboles pioneros fueron sometidas a los tratamientos robustecedores (Tabla 3) (Sánchez 2003; Sánchez *et al.* 2003a). Conforme con Welbaum & Bradford

(1991) y Bradford & Somasco (1994), la disminución del Ψ_b implica una mayor velocidad de germinación en las semillas bajo condiciones de estrés hídrico y calórico, y también en temperaturas subóptimas; sobre todo para aquellas especies donde el endospermo y la testa constituyen una barrera mecánica para la emergencia del embrión. De hecho, las semillas sometidas a los tratamientos robustecedores presentaron mayores velocidades de germinación que las no tratadas y alcanzaron un 40% de germinación en una condición de estrés hídrico más severo que las semillas no tratadas (Sánchez 2003; Sánchez *et al.* (2003a). De igual forma, Bradford (1995) planteó que la efectividad de los tratamientos de hidratación parcial para disminuir el Ψ_b y el Ψ_{40} se debe fundamentalmente a la acumulación de solutos durante la última etapa de la germinación (*sensu stricto* fase II), que genera suficiente presión de turgencia en el embrión para vencer la restricción mecánica que le ofrece el endospermo a la emergencia de la radícula bajo estrés hídrico.

La teoría general del robustecimiento de semillas y plantas se reconoce como válida internacionalmente, por cuanto desde el punto de vista teórico y práctico está bien fundamentada (Henckel, 1964; Heydecker 1977; Vanangamudi *et al.* 2006). Sin embargo, según Bewley & Black (1994) no todos los autores (e.g., Jarvis & Jarvis 1964; Husain *et al.* 1968; Woodruff 1969) coinciden en que el efecto robustecedor se mantenga constante durante todo el ciclo de vida de las plantas. Ante estas evidencias, es válido cuestionarse si el tratamiento robustecedor fue aplicado correctamente a los requerimientos de la especie, variedad o lote particular, o si las semillas de la especie investigada no respondieron

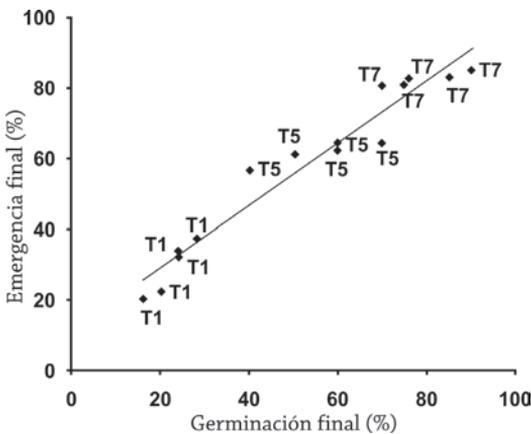


Figura 14. Relación lineal entre el porcentaje de germinación final obtenido en laboratorio y el porcentaje de emergencia final de plántulas de *Trichospermum mexicanum* en condiciones de vivero ($r=0,96$; $p < 0,001$). T1: semillas no tratadas (control); T5: semillas hidratadas parcialmente en agua y T7: semillas sometidas a hidratación parcial más choque térmico. Modificado de Sánchez *et al.* (2006).

Tabla 2. Crecimiento de plántulas forestales pioneras en condiciones de vivero (tres meses) y procedentes de semillas sometidas a tratamientos de hidratación deshidratación. Durante la siembra no se aplicaron plaguicidas, ni fertilizantes químicos. EE (error estándar de las medias). Asteriscos representan diferencias significativas por especie. Fuente: Elaboración de datos inéditos de Jorge A. Sánchez.

Especies/tratamientos		Altura de la plántula (cm)	Biomasa seca total plántula (g)
<i>Guazuma ulmifolia</i>	Control	6,2	0,49
	Tratamiento	9,6	0,85
	EE(±)	1,7 **	0,18 ***
<i>Hibiscus elatus</i>	Control	22,4	0,37
	Tratamiento	27,0	0,93
	EE(±)	1,8 *	0,28 ***
<i>Trichospermum mexicanum</i>	Control	7,5	0,18
	Tratamiento	15,2	1,65
	EE(±)	3,8 ***	0,73 ***

efectivamente al tratamiento por carecer de mecanismos estables de resistencia al estrés que puedan ser estimulados por el mismo. Por ejemplo, tendría muy poco sentido tratar de robustecer semillas de especies de plantas acuáticas, por cuanto los mecanismos de resistencia a la sequía pueden no existir o ser muy débiles, por lo que el tratamiento mostraría poco efecto o resultaría nulo.

COMBINACIÓN DE TRATAMIENTOS DE SEMILLAS

Muchas son las combinaciones de tratamientos pregerminativos que pueden generarse de acuerdo a los requerimientos de las semillas y a los propósitos de los investigadores y técnicos forestales. Quizás la combinación más común que se pueda aplicar, en semillas de especies arbóreas tropicales, es un método de escarificación (mecánica o ácida) con un tratamiento pregerminativo de HD. Ambos tratamientos son efectivos para mejorar la germinación y el posterior

desarrollo de las plantas. Sin embargo, las combinaciones de tratamientos suelen ser más complejas, y se basan fundamentalmente en las tecnologías disponibles y en los conocimientos que tengan los productores de semillas sobre ecofisiología vegetal y las respuestas de las plantas al estrés.

Asimismo, otros investigadores basándose en el mismo principio creado por Henckel y colaboradores para robustecer plantas han propuesto métodos de robustecimiento consistentes en someter a las semillas recién germinadas a altas temperaturas (Altschuler & Mascarenhas 1982; Cooper & Ho 1983). Se plantea que una breve exposición a temperaturas subletales (choque térmico), induce tolerancia al calor en una variada gama de plantas (Vierling 1991; Medina & Cardemil, 1993; Ortiz *et al.*, 1995). Cooper & Ho (1983) además plantearon, que la adquisición de la termotolerancia se correlaciona con una mayor síntesis de proteínas de alto peso

Tabla 3. Efectos de los tratamientos de hidratación-deshidratación y choque térmico sobre el potencial de agua teórico necesario para alcanzar el 40% de la germinación (Ψ_{40}) y el potencial de agua requerido para la inhibición de la germinación (Ψ_b). Tratamientos: T1= semillas no tratadas (o control); T2= semillas hidratadas y deshidratadas; y T3 = T2 + choque térmico. Medias con letras distintas, por filas y especies, difieren significativamente ($p < 0,05$). EE (error estándar de las medias). Fuente: Sánchez *et al.* (2003a) y para *Guazuma ulmifolia* elaborado a partir de datos inéditos de Jorge A. Sánchez.

Especies/Tratamientos		T1	T2	T3	EE(±)
<i>Cecropia peltata</i>	Ψ_{40}	-0,24 c	-0,36 b	-0,49 a	0,07
	Ψ_b	-0,85 c	-1,28 b	-2,08 a	0,37
<i>Guazuma ulmifolia</i>	Ψ_{40}	-0,49c	-0,83 b	-0,97 a	0,13
	Ψ_b	-1,58 b	-2,08 a	-2,36 a	0,21
<i>Hibiscus elatus</i>	Ψ_{40}	0,00 c	-0,28 a	-0,20 b	0,08
	Ψ_b	-0,59 c	-1,58 a	-1,21 b	0,28
<i>Trichospermum mexicanum</i>	Ψ_{40}	-0,34 c	-0,61 b	-0,85 a	0,14
	Ψ_b	-1,33 c	-2,10 b	-2,37 a	0,31

molecular o de estrés calórico, que al parecer, evitan la desnaturalización de las proteínas de membranas como ya se explicó previamente.

Este tipo de tratamiento también puede inducir la tolerancia a la sequía (Al-Whaibi 2010); pero los efectos que sobre las plantas podrían tener la combinación del choque térmico con los tratamientos de HD en semillas sin germinar han sido escasamente estudiados, aunque algunos resultados se han obtenido en especies hortícolas y de árboles tropicales pioneros. En semillas de tomate y de pimiento, con un ciclo de hidratación parcial en agua hasta dos horas antes del inicio de la germinación en combinación con un choque térmico a 36°C ó 38°C durante una hora, se logró incrementar significativamente la germinación y el vigor de las plántulas bajo condiciones de estrés calórico (25/40°C y 25/45°C) con relación al testigo (Sánchez *et al.* 2001b). Con dichos tratamientos además, se obtuvieron

resultados superiores a los alcanzados con los tratamientos tradicionales de HD y de choque térmico (Sánchez *et al.* 2001b). Esto evidencia el sinergismo que establece la combinación de los tratamientos de hidratación parcial con los de choque térmico sobre la respuesta germinativa de estas especies.

Sin embargo, en semillas de pepino la combinación de ambos tratamientos no fue la óptima para mejorar el comportamiento germinativo de esta especie (Sánchez *et al.* 2001b). Este resultado podría deberse a la falta de estandarización de los tratamientos en la variedad de pepino empleado, debido a que en otras variedades de esta especie con la combinación de los referidos tratamientos se obtienen los mejores resultados para incrementar la germinación bajo déficit hídrico (Sánchez & Muñoz 2003). Cooper y Ho (1983) y Vierling (1991) señalaron también, que la efectividad de los tratamientos de choque térmico depende del momento y tiempo

de aplicación de los mismos; así como de la temperatura del procedimiento térmico.

También en semillas de *Cecropia schreberiana*, *H. elatus* y *T. mexicanum* la combinación de ambos tratamientos fue la más adecuada para incrementar la germinación y el vigor de las plántulas en condiciones de estrés hídrico, calórico y bajo barrera física para la emergencia de las plántulas (Sánchez *et al.* 1998; Sánchez *et al.* 2003a). Por ello, resulta evidente la efectividad de dichos procedimientos tanto en plantas hortícolas como en especies arbóreas pioneras. En semillas de *T. mexicanum* la combinación de tratamientos robustecedores igualmente propició la mayor producción de fitomasa de las plantas en condiciones de vivero y de campo (Fig. 15), e incrementó significativamente la floración y la producción de semillas (Sánchez 2003; Sánchez *et al.* 2006). Posteriormente, Sánchez *et al.* (2007) crearon una nueva combinación de tratamientos robustecedores de semillas (HD más choque ácido) que mejoró el funcionamiento de las semillas y el crecimiento las plantas de *Leucaena leucocephala* en suelo ácido (pH 4,3) y con alta saturación de aluminio intercambiable (50%).

De igual forma, con base al principio de que las plantas están sometidas simultáneamente a múltiples condiciones de estrés, que propician al mismo tiempo el desarrollo de mecanismos múltiples de resistencia o tolerancia al estrés (Kozłowski & Pallardy 2002; Paparella *et al.* 2015), se podrían proponer nuevas combinaciones de tratamientos robustecedores de semillas, como puede ser, la implementación de una combinación de tratamientos hídricos con choque

salino para mejorar el funcionamiento de las semillas bajo estrés salino.

También los tratamientos precondicionadores de semillas se pueden combinar con técnicas de peletización y micorrizas, para crear unidades de siembras con semillas mejoradas y recursos iniciales disponibles para crecer en sitios con altos niveles de estrés y/o suelos empobrecidos. Esta nueva combinación de tratamientos puede ser factible para reforestar espacios poco accesibles por métodos de siembra aérea, o bien por sistemas de hidrosiembra. Las unidades de siembra creadas igualmente podrían contener diferentes combinaciones de recursos (fungicidas, insecticidas, bactericidas, pesticidas, rodenticidas, micronutrientes y macronutrientes) de acuerdo a las necesidades de los sitios a reforestar. De hecho, la agricultura moderna actual realiza muchas de estas combinaciones para mejorar el comportamiento agronómico de los cultivos. Así por ejemplo, un tratamiento pregerminativo típico aplicado por



Figura 15. Plantas de *Trichospermum mexicanum* (árbol tropical pionero) después de seis meses en condiciones de campo. Control (semillas no tratadas) y Tratamiento (semillas sometidas a un ciclo de hidratación parcial más choque térmico). Datos tomados de Sánchez *et al.* (2006).

los agricultores presenta la siguiente combinación de tratamientos: semillas robustecidas con sustancias derivadas de productos naturales y contenidas en unidades peletizadas junto con *Trichoderma* y *Rhizobium* (Vanangamudi *et al.* 2006).

Las combinaciones de tratamientos que se apliquen a las semillas de especies silvestres podrían ser muy diversas; pero todas deben ser superiores a un simple tratamiento, para que justifique su coste de producción y mejore las oportunidades de germinación y de establecimiento de la nueva plántula. Además, en especies silvestres tropicales probablemente se requiera de una estandarización previa para cada lote de semilla, dado la gran diversidad de formas, tamaños y tipos funcionales de semillas que existe en diferentes lotes de semillas de una misma especie o variedad, e incluso dentro de un mismo lote.

SIGNIFICADO ECOLÓGICO DE LOS CICLOS DE HD

Con toda seguridad, el primer autor que reflexionó y demostró el papel ecológico de los tratamientos pregerminativos de HD fue el fisiólogo ruso P. Henckel en su excelente artículo titulado *Physiology of plants under drought* publicado durante 1964 en la revista *Annual Review of Plant Physiology*. Estas ideas aparecieron también en diferentes contribuciones publicadas por este autor, en su lengua materna, durante las décadas del 30 o 40 del pasado siglo y en su obra sobre adaptación de las plantas al estrés ambiental (Henckel 1982). De hecho, él argumentó, en varias oportunidades, que las plantas robustecidas ofrecen un modelo biológico excelente para estudiar los procesos fisiológicos que determinan la resistencia y la adaptación

a la sequía (Henckel 1964; 1970; 1975). Además, los tratamientos robustecedores se desarrollaron bajo el marco conceptual anteriormente mencionado y en particular, sobre la capacidad de reorganización fisiológica que sufren las semillas durante la deshidratación, que induce tolerancia a la sequía sin reducción del crecimiento y productividad de las plantas (Henckel 1982).

La mayoría de las experiencias que acumularon Henckel y su grupo de investigación se concentraron en especies cultivadas; aunque estos autores también trabajaron plantas silvestres, fundamentalmente de sitios áridos. Por otra parte, todos los cambios moleculares, fisiológicos, anatómicos y morfológicos que inducen los tratamientos robustecedores a las plantas, reflejan su adaptación a condiciones ambientales extremas (Henckel 1982). Esto último, recientemente se ha corroborado en semillas y plantas de especies cultivadas y silvestres (Vanangamudi *et al.* 2006; Sánchez *et al.* 2006; 2007; Mondal *et al.* 2011). También hallazgos moleculares recientes evidenciaron que las plantas aprenden a lidiar con el estrés porque luego del tratamiento de deshidratación aumentan la transcripción de un determinado subconjunto de genes que incrementan la tolerancia a la sequía, y que tienen además la capacidad de volver a niveles normales de transcripción cuando el agua está disponible (Ding *et al.* 2012).

Posteriormente a los trabajos de Henckel y colaboradores, una gran cantidad de estudios demostraron el papel ecológico de los ciclos de HD que sufren las semillas cuando llegan al suelo (Baskin & Baskin 1972a; 1972b; 1982; Allen *et al.* 1993; Debaene-Gill *et al.* 1994; Dubrovsky 1996; 1998);

particularmente resultan muy interesantes aquellos realizados con especies de sitios desérticos. Efectivamente, Dubrovsky (1996) demostró que diferentes tratamientos de hidroacondicionamiento fueron adecuados para incrementar la germinación de cactáceas mexicanas. En esta misma contribución, J. Dubrovsky acuñó el término de *seed hydration memory* o memoria de la hidratación de la semilla para referirse a la capacidad de las semillas para preservar, durante los períodos de deshidratación, aquellos cambios fisiológicos que fueron inducidos previamente por los períodos de hidratación, y que posteriormente incrementan significativamente la velocidad de germinación. Dubrovsky (1996) además señaló, que la principal diferencia entre el término de “hidroacondicionamiento” y el de “memoria de la hidratación de la semilla” se debe a que el primero solo propone un tratamiento seminal, mientras que el segundo se refiere a una respuesta germinativa dependiente de una experiencia específica de hidratación. Posteriormente, Dubrovsky (1998) determinó que las semillas sometidas a procesos de hidratación discontinuos germinan más rápido y con mayor porcentaje de germinación final que aquellas sometidas a hidratación continua; lo cual evidencia, según este autor, un requerimiento facultativo y adaptativo para el establecimiento de las plántulas en sistemas áridos.

De acuerdo a Dubrovsky (1996), cualquier experiencia que disminuya el tiempo de germinación después de un tratamiento de HD podría ser considerado como una expresión de la memoria de la hidratación de la semilla. De hecho, el postulado enunciado por Dubrovsky (1996) no es nuevo, y coincide con el principio fisiológico de los tratamientos preacondicionadores de semillas creado

por Heydecker *et al.* (1973) y Bradford (1986). Diversos autores además, reportan que los efectos benéficos de los tratamientos preacondicionadores no solo están asociados con los mecanismos de reparación de daños subcelulares, sino que también activan procesos de síntesis, sobre todo relacionados con la acumulación de sustancias osmóticamente activas (proteínas, ARN, ADN, azúcares), que favorecen el rápido crecimiento del eje embrionario cuando se rehidrata la semilla, tal como fue demostrado en *V. faba* por Obroucheva & Antipova (1989) y Obroucheva (1991).

Sánchez *et al.* (1998; 2003a; 2006) también reflexionaron que en condiciones naturales (sobre todo en sitios abiertos o semiabiertos) las semillas de las especies forestales pioneras cubanas podrían estar sometidas a ciclos de HD y a variaciones de la temperatura (choque térmico) que promueven tolerancia a la sequía. Según estos autores, los ciclos de HD podrían estimular la revigorización de las simientes envejecidas, eliminar la dormancia primaria, o bien la impuesta por condiciones inadecuadas de temperatura o de iluminación. Este último mecanismo de acción fue propuesto por Fenner (1985) para la “detección” de claros por parte de las semillas de especies no fotoblásticas, debido a que en los sitios abiertos el proceso de desecación de las semillas es mayor que en los lugares cerrados. De igual forma, se conoce que las proteínas de choque térmico están presentes en todos los seres vivos y estimulan su síntesis frente a diferentes condiciones de estrés ambiental, como pudiera ser un mecanismo de termoprotección (Vierling 1991; Al-Whaibi 2010).

En México, con el tratamiento de preacondicionamiento natural se demostró que los procesos que sufren las semillas

en el suelo (fundamentalmente con el humedecimiento-desección) activan mecanismos bioquímicos-fisiológicos que mejoran la conducta germinativa y el establecimiento de las plantas silvestres en distintas condiciones ambientales (González-Zertuche *et al.* 2000; 2001; Gamboa-deBuen *et al.* 2006). Este tratamiento preacondicionador, es quizá el que refleje con mayor certeza que los tratamientos de HD siguen los pasos de la naturaleza; y que los cambios que ocurren en las semillas durante el preacondicionamiento en laboratorio probablemente evolucionaron durante la permanencia de las semillas en el suelo (González-Zertuche 2005). Esta hipótesis recientemente fue confirmada por Long *et al.* (2011). Ellos manifestaron que los ciclos de HD que sufren las semillas de *Avena sterilis*, en condiciones de campo, incrementan su longevidad porque reinducen la síntesis de compuestos antioxidantes que evitan el deterioro celular.

Sin embargo, es pertinente aclarar que las semillas en el suelo están expuestas a fluctuaciones en las condiciones ambientales, como son: la disponibilidad de agua, temperatura, luz, concentración de gases, acidez y también a eventos azarosos de depredación y fuego, entre otros factores. De esta forma, este ambiente complejo con grandes variaciones en el espacio y en el tiempo puede significar señales para la germinación y el establecimiento de la nueva plántula, como ha sido reportado para un gran número de especies (Baskin & Baskin 2004); pero también puede provocar un sobrecondicionamiento en las semillas que afecte su viabilidad, o bien imponga una dormancia secundaria. Este último aspecto fue comprobado en condiciones de laboratorio por González-Zertuche *et al.* (2002). De hecho, uno de los eventos que más se informa por la permanencia

de las semillas en el suelo es el establecimiento de ciclos de inducción y rompimiento de dormancia (Baskin & Baskin 1985; 2014).

APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS DE HD DE FORMA RÁPIDA Y SENCILLA

Cuando se quiere aplicar los tratamientos de HD de forma rápida y sencilla, debe pensarse en primer lugar en dos metodologías que por su sencillez y efectividad podrían ser implementadas por muchos agricultores y técnicos forestales con bajos recursos. Estas ecotecnologías son: el preacondicionamiento natural (*natural priming*) y el preacondicionamiento agrícola de las semillas (*on-farm seed priming*). La segunda técnica, en esta contribución, se ha considerado similar al tratamiento robustecedor de semillas sin control estricto del agua; por tanto, en este acápite se designa como tratamiento robustecedor para diferenciarla del preacondicionamiento natural.

Es importante señalar, antes de informar de qué manera se pueden introducir estas ecotecnologías, que con nuestros comentarios no pretendemos dar una fórmula tecnológica única, ni transferir tecnologías. Cada persona interesada en el tema, puede concebir su propio modelo de HD de las semillas con base fundamentalmente a sus objetivos, material biológico a tratar y procesos fisiológicos en que descansan los tratamientos de HD. Por tanto, partiendo de estos principios creemos que hay dos aspectos críticos que deben ser considerados seriamente para implementar con éxito los tratamientos de HD. Estos son: 1) su estandarización para cada especie, variedad o lote de semilla en particular y 2) la determinación previa del tiempo límite de hidratación.

Cumpliendo estas premisas los resultados tienen una alta probabilidad de ser

exitosos, como ha sido demostrado en una gran diversidad de plantas. Pero si se produce un sobrecondicionamiento o sobrerobustecimiento de las semillas durante el tratamiento seminal, los resultados pueden ser negativos para la viabilidad y vigor de las semillas; y por ende, para el establecimiento de las plantas en vivero y en campo. En el precondicionamiento natural también el factor suelo muestra especificidad para cada lote de semillas. Por consiguiente, hay que estandarizar previamente la técnica para este factor, ya que las semillas cuando llegan al suelo están sujetas a muchos factores bióticos y abióticos que pueden inducir dormancia secundaria, o bien acelerar su deterioro. Esto nos lleva a sugerir, que esta ecotecnología sería más factible para grandes volúmenes de semillas cuando se realiza en condiciones semicontroladas como proponen Nicasio-Arzeta *et al.* (2011). Dichos autores precondicionaron semillas de maíz colocándolas en una bolsa de malla plástica y enterrándolas a 5 cm de profundidad en macetas con suelo. Estas macetas se pueden mantener en una casa de sombra o en un invernadero, donde se consiguen controlar algunos factores del ambiente (luz, temperatura y humedad) por el tiempo que dure el tratamiento pregerminativo. De esta forma, se mejora potencialmente el funcionamiento de las semillas y se reducen los riesgos ya comentados.

La ecotecnología de robustecimiento también puede implementarse para grandes volúmenes de semillas, pero requiere de mayor control del proceso, fundamentalmente del tiempo límite de hidratación. Los pasos a seguir para su implementación dependen de si se realiza en un laboratorio o en condiciones no controladas. Las condiciones de laboratorio son mínimas, pero al menos se requiere de un cuarto con

temperatura climatizada, de una balanza analítica digital y de incubadoras refrigeradas con control de la temperatura y la iluminación. Todos estos equipos permitirían estandarizar la técnica para cada lote de semillas, e incluso podría implementarse un único tratamiento robustecedor para un gran número de lotes de semillas. A continuación se describen y comentan los pasos a seguir en laboratorio:

- a) Determinación del contenido de humedad inicial de las semillas. Se puede realizar con base a la masa seca o fresca de la semilla. Este valor sería el contenido de humedad inicial de la semilla en el tiempo cero cuando se realice la curva de imbibición, y nos permitirá explorar si las semillas pueden tolerar procesos violentos de deshidratación. Altos contenidos de humedad (entre 25-50%) sugieren que las semillas podrían ser recalitrantes o de corta viabilidad, y por tanto, sensibles a la deshidratación forzada.
- b) Determinación de los requerimientos de germinación de cada lote de semillas (con relación a la iluminación y temperatura del sustrato). En particular, es muy importante determinar la temperatura óptima o rango óptimo de germinación porque en esas condiciones se obtienen los mejores resultados para robustecer semillas (con cuerda con la temperatura óptima de las reacciones químicas a nivel subcelular). Las condiciones de temperaturas ensayadas deben coincidir con las temperaturas que encuentran las semillas cuando llegan al suelo, y las condiciones de iluminación pueden ser oscuridad total y siembra bajo luz blanca fluorescente. También debe determinarse si las semillas se hidratan o requieren algún

- tratamiento de escarificación previo a la aplicación de los tratamientos hídricos para favorecer la entrada de agua.
- c) Construir la curva de imbibición de las semillas en la temperatura óptima de germinación hasta la ocurrencia de la germinación visible, para así determinar el patrón trifásico de absorción de agua (si existe en la especie que se está investigando). La determinación del patrón de hidratación de las semillas es fundamental para implementar los tratamientos hídricos de acuerdo a los objetivos de los investigadores (es decir, revigorizar, acondicionar o robustecer semillas) y también para determinar el tiempo límite de hidratación.
- d) Una vez que las semillas logren el nivel de humedad requerido se pueden deshidratar hasta que alcancen su contenido de humedad inicial. Esto se logra deshidratándolas sobre una superficie seca (papel de filtro) a temperatura ambiente, o en una habitación climatizada con baja humedad relativa. También se puede construir la curva de deshidratación de las semillas, para determinar la velocidad con que estas se deshidratan.
- e) Después de esto, ya estamos en condiciones de aplicar los tratamientos de HD a las semillas. Los tratamientos pueden ser ciclos repetitivos de HD, o simplemente un solo ciclo de HD. Si se aplican largos períodos de hidratación parcial de las semillas (hasta aproximadamente el final de la fase II de la curva de imbibición) se corre el riesgo que cuando se repita el ciclo las semillas germinen durante la fase de hidratación, porque ya se activaron parte de los procesos fisiológicos relacionados con la fase pregerminativa; por tanto, si se quiere aplicar varios ciclos de HD (2, 3 o más) recomendamos que se hidraten las semillas hasta aproximadamente el final de la fase I del patrón trifásico, o bien hasta la mitad de la fase II. En múltiples ocasiones con estos niveles de humedad se logran efectos positivos tanto para revigorizar semillas como para robustecer plantas.
- f) Por último, las pruebas de efectividad de los tratamientos, tanto en laboratorio como en vivero, deben realizarse bajo condiciones de estrés para probar la garantía de dichos tratamientos. Es importante recordar que las condiciones de estrés son las que usualmente encuentran las semillas cuando llegan al suelo, y que por consecuencia son estas las condiciones que permiten expresar los mecanismos de tolerancia al estrés que previamente fueron activados con los tratamientos de HD.
- Cuando el tratamiento robustecedor se aplique en condiciones semicontroladas o poco controladas, es decir, cuando no se disponga de equipamientos, lo más importante es determinar el tiempo límite de hidratación como ya se explicó. Para ello, el productor debe realizar pruebas de germinación en los sustratos disponibles (suelo, arena, vermiculita, etc.) y en las condiciones ambientales más parecidas a las encontradas en los sitios de colectas, para determinar el tiempo máximo que pueden hidratarse las semillas. Una vez conocida esta información, ya se puede implementar el tratamiento de HD para el lote de semillas, sin dejar que las mismas alcancen el nivel de humedad crítico; para así, evitar que la deshidratación afecte la viabilidad de las semillas. También el tiempo medio de hidratación, es decir, la mitad del tiempo que las semillas se demoran en iniciar la germinación,

podría ser utilizado para estandarizar un tratamiento único en varios lotes de semillas de una misma especie, incluso para semillas de varios géneros. Este último tratamiento evidentemente lleva mayor trabajo experimental; pero es posible y efectivo, como fue demostrado por González *et al.* (2009b) para más de 60 accesiones de semillas envejecidas de leguminosas herbáceas.

Finalmente recomendamos que los trabajos se inicien con semillas pequeñas como las de especies pioneras; que por lo general tienen bajos contenidos de humedad inicial y no presentan complicados mecanismos de dormancia. Estos atributos seminales, con toda certeza,

facilitarán la implementación de los tratamientos de HD en un grupo sucesional que juega un papel importante en los procesos primarios de restauración del bosque. Lo anterior no excluye que se apliquen los referidos tratamientos a semillas de otras especies nativas, igualmente significativas para la recuperación del ecosistema forestal primario; pero es evidente que el trabajo con estas especies (es decir, las no pioneras) requiere de un mayor esfuerzo experimental, sobre todo si son semillas grandes con corta viabilidad y dormancia.



Cojoba arborea