

**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN MANEJO DE
RECURSOS NATURALES**

Informe Escrito Final

**Evaluación de la viabilidad, germinación y sobrevivencia inicial *ex situ* de
semillas del Guayacán real (*Guaiacum sanctum* L., *Zigophyllaceae*)**

**Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Naturales**

Acta de aprobación: 458

Alejandro Zúñiga Ortiz

**Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica
2019**

I. Miembros del tribunal

Este trabajo de graduación fue _____ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Manejo de Recursos Naturales modalidad Tesis de Grado.

Grado Académico, nombre
Presidente del Tribunal

Grado Académico, nombre
Director de la Escuela de Ciencias Biológicas

Grado Académico, nombre
Tutor(a)

Grado Académico, nombre
Asesor(a)

Grado Académico, nombre
Invitado(a) especial

II. Resumen

Guaiacum sanctum L. es un árbol que habita bosques secos, tiene un crecimiento lento y su madera es dura de utilidad medicinal y forestal; en Costa Rica está vedada, amenazada y es escasa de regeneración. El presente estudio evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento de 1, 12 y 24 meses a temperatura ambiente sobre el contenido de humedad, viabilidad y germinación; asimismo, se determinó el efecto de la luz, temperatura y estado hídrico del sustrato en la germinación. Además, se calculó la mortalidad posterior al repique. Las pruebas de contenido de humedad, viabilidad de embriones con tetrazolio y germinación se desarrollaron de acuerdo a las normas de la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA). Se calculó el vigor mediante el índice de germinación en semillas con 1 mes de almacenamiento en condiciones de luz y oscuridad a 25°C y 30°C; igualmente, se cuantificó el índice en semillas bajo cuatro niveles de estrés hídrico (MPa). Un total de 120 plántulas fueron trasplantadas y separadas en recipientes plásticos individuales y la sobrevivencia de los individuos fue registrada cada dos días en una cámara de crecimiento en un rango de temperatura de 25-27 °C y un fotoperiodo de 12 horas durante 60 días. Los valores de humedad que presentaron los tres lotes fueron menores al 15%, siendo el lote con 1 mes el que presentó mayor contenido de humedad con $14.72 \pm 0.33\%$; la viabilidad de embriones y la germinación varió entre 60-70% y 80-90%, respectivamente. Para los lotes con 12 y 24 meses los contenidos de humedad fueron $12.84 \pm 0.19\%$ y $12.01 \pm 0.14\%$, respectivamente, la viabilidad y la germinación presentaron porcentajes entre 0 a 20%. En temperaturas de 30°C se presentó una mayor germinación, plántulas más vigorosas y sin diferencias en la condición de luz. También se observó que el desarrollo inicial de plántulas se ve inhibido a potenciales hídricos de -0.5 y -1.1 MPa con porcentajes menores al 10%. La mortalidad de plántulas fue de 6%. Se concluye que el tiempo de almacenamiento de las semillas y el estrés hídrico tuvieron un efecto negativo en la viabilidad y germinación; también, estos resultados demuestran que las semillas de *G. sanctum* poseen una respuesta fotoblástica neutral y germinan con más vigor a mayor temperatura.

III. Agradecimientos

Se les agradece a todas las personas que colaboraron con esta investigación desde el planteamiento de la misma, la recolecta de semillas, trabajo de laboratorio y el análisis de los resultados. Quisiera expresar mi agradecimiento a los funcionarios del Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) y especialmente al Área de Conservación Guanacaste (ACG) y la Estación Experimental Forestal Horizontes por facilitar los permisos de colectas de semillas de guayacán real en esta área y por su apoyo logístico. También, quiero dar un agradecimiento especial a José Alfredo Gamboa y María Fernanda Vargas Molina por la ayuda brindada en la localización de los árboles semilleros y la recolecta de las semillas de guayacán real. De la misma manera, quisiera reconocer la ayuda ofrecida por mi comité asesor esencialmente en el préstamo del equipo y sus laboratorios, asimismo por sus recomendaciones y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo. Finalmente, quisiera agradecer a “Doña Sandra” vecina de Pozo de Agua de Nicoya que me ayudó con el monitoreo fenológico de los árboles de ese lugar y todas aquellas personas que aportaron su granito de arena para que yo lograra desarrollar y culminar esta investigación.

IV. Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mi madre Zaida Ortiz Ortiz y mi padre Walter Zúñiga Mendoza, a toda mi familia, seres queridos y personas que conocí en el camino de esta investigación por el apoyo que me brindaron durante este trabajo. Especialmente quiero dedicar esta investigación al guayacán real, una especie a la cual tengo mucho aprecio y afinidad, este es un árbol amenazado muy escaso en el país y que llega a vivir cientos de años si se le permite y posee una de las maderas más pesadas y preciosas del país; además, esta especie adorna con gran belleza los bosques y jardines de la zona de Guanacaste con su llamativa y hermosa floración color morado y purpura, por lo cual vale la pena desarrollar estrategias de reproducción *ex situ* para su conservación.

V. Índice

Miembros del tribunal.....	I
Resumen.....	II
Agradecimientos.....	III
Dedicatoria.....	IV
Índice.....	V
Índice de cuadros.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Abreviaturas.....	VIII
1. Introducción.....	9
1.1. Antecedentes.....	10
1.2. Justificación.....	17
1.3. Planteamiento del problema.....	19
1.4. Objetivos.....	19
1.4.1. Objetivo general.....	19
1.4.2. Objetivos específicos.....	19
2. Marco Teórico.....	20
3. Marco Metodológico.....	31
4. Resultados.....	39
5. Discusión.....	50
6. Conclusiones.....	60
7. Recomendaciones.....	61
8. Bibliografía.....	62
9. Anexos.....	76

VI. Índice de cuadros

Cuadro 1. Peso de tres lotes de semillas de <i>Guaiacum sanctum</i> recolectados durante los años 2015, 2016 y 2017 en la provincia de Guanacaste, Costa Rica.....	39
Cuadro 2. Contenido de humedad (%) para tres lotes de semillas de <i>Guaiacum. sanctum</i> almacenados a una temperatura ambiente (25 °C).....	41
Cuadro 3. Porcentaje de semillas germinadas, índice de germinación y coeficiente de velocidad para los diferentes ensayos de luz, temperatura y estrés hídrico en las semillas del lote con un mes de almacenamiento de <i>Guaiacum sanctum</i> durante un periodo de 21 días.....	45

VII. Índice de figuras

Figura 1. Localización de los árboles semilleros de <i>Guaiacum sanctum</i> utilizados en el estudio.....	31
Figura 2. Diferentes patrones de tinción que pueden presentar los embriones de semillas en la prueba de viabilidad con Tetrazolio.....	34
Figura 3. Medidas morfométricas de tres lotes de semillas de <i>Guaiacum sanctum</i>	39
Figura 4. Embriones viables (A, B, C, D) y no viables (E, F, G, H, I) de <i>Guaiacum sanctum</i> en la prueba de viabilidad con TZ.....	41
Figura 5. Porcentajes de viabilidad con tetrazolio y porcentajes de germinación promedio a 30°C para tres lotes de semillas de <i>Guaiacum sanctum</i> almacenados a temperatura ambiente de 25°C.....	42
Figura 6. Germinación acumulada en condiciones de luz y temperatura de 30 °C de tres lotes de semillas de <i>G. sanctum</i> almacenados en condiciones de laboratorio a 25°C.....	42
Figura 7. Curva de germinación acumulada de semillas de <i>G. sanctum</i> para los diferentes tratamientos de temperatura y luz.....	44
Figura 8. Porcentajes finales de germinación de <i>G. sanctum</i> para diferentes temperatura y luz.....	44
Figura 9. Altura de las plántulas de <i>G. sanctum</i> en el ensayo de luz y temperatura antes del trasplante.....	46
Figura 10. Curva de germinación acumulada de semillas de <i>G. sanctum</i> con diferentes tratamientos de estrés hídrico (MPa).....	47
Figura 11. Porcentajes finales de germinación de <i>G. sanctum</i> para diferentes tratamientos de estrés hídrico (MPa).....	48
Figura 12. Regresión lineal entre el porcentaje de germinación y el potencial hídrico (ψ) (MPa) del sustrato.....	49

VIII. Abreviaturas o acrónimos

CITES:	Convención Internacional para el Comercio de Especies Amenazadas
CV:	Coeficiente de Velocidad
FAO:	Food Agriculture Organization
INBio:	Instituto Nacional de Biodiversidad
DAP:	Diámetro a la Altura del Pecho
ISTA:	International Seed Testing Association
IG:	Índice de Germinación
MINAE:	Ministerio Nacional de Ambiente y Energía
PNPV:	Parque Nacional Palo Verde
TM:	Tasa de Mortalidad
TZ:	Tetrazolio
UICN:	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

1. Introducción

Durante los siglos XV y XVI el guayacán real (*Guaiacum sanctum*, Linneo 1753) era una especie abundante en América; sin embargo, se produjo una disminución de sus poblaciones, principalmente en Centroamérica y el Caribe, dado que en esta región su madera fue sobre aprovechada durante los años de los 80's llevándola al peligro crítico de extinción (Fuchs & Hamrick, 2010; López-Toledo, Ibarra-Manríquez & Martínez-Ramos, 2013). En la actualidad el guayacán real es una de las especies forestales con alto grado de amenaza en Centroamérica y el Caribe, sin embargo ha sido poco estudiada (CITES, 2018; UICN, 2018).

En Costa Rica sus poblaciones están aisladas y su regeneración se encuentra limitada a ciertos lugares como el Parque Nacional Palo Verde (PNPV), el cantón de La Cruz y Playa Garza de Nicoya (Hernández-Garzón, 2001; Jiménez, Rojas, Rojas & Rodríguez, 2002; Fuchs, Robles & Hamrick, 2013). Además, es escaso el conocimiento sobre aspectos ecológicos y reproductivos de la especie, como por ejemplo la polinización, la dispersión y la germinación de *G. sanctum* (Zúñiga-Ortiz, 2016). Diferentes factores ambientales pueden determinar el proceso de la germinación de una semilla, sin embargo, los factores principales son una combinación adecuada de temperatura, humedad y luz (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989; Bewley & Black, 1994; Baskin & Baskin, 1998; Schmidt, 2007).

Con base en lo anterior, surge la necesidad de generar información básica sobre la biología reproductiva de *G. sanctum* bajo las condiciones sugeridas por la *Asociación Internacional de Ensayos de Semillas* (ISTA por sus siglas en inglés), por lo tanto, este trabajo se enfoca en realizar ensayos de reproducción generativa con el fin de determinar los efectos del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de humedad, viabilidad y germinación, así como diferentes condiciones de luz, temperatura y estrés hídrico en la germinación de semillas de *G. sanctum*; además, evaluar la mortalidad de plántulas posterior a la germinación y registrar su crecimiento inicial.

1.1. Antecedentes

Estudios sobre el crecimiento, la ecología y el manejo de *Guaiacum sanctum* L.

López-Toledo, Burslem, Martínez-Ramos & García-Naranjo (2008) realizaron mediciones de campo de *G. sanctum* encontrando una tasa de crecimiento muy lento. En plántulas inferiores a 50 cm de altura se encontró un crecimiento de 4,2 cm/año de altura, en plantas juveniles con altura entre 50 a 150 cm y diámetros a la altura del pecho (DAP) menores 1 cm el crecimiento en altura fue 3,8 cm/año y para adultos de 1-40 cm de DAP el crecimiento de diámetro varió entre 1,5 a 2,3 mm/año. Con base en estas mediciones realizadas los autores estiman que la edad de árboles de 35-40 cm de DAP podría rondar entre 280-390 años. En comparación con otras especies de árboles tropicales como la balsa (*Ochroma pyramidale* Cav.) (Malvaceae), el guayacán tiene un desarrollo lento. Como muestra Douterlungne (2005), en árboles de balsa se ha reportado crecimientos de $6,93 \text{ m} \pm 0,63$ en altura y $10,6 \pm 1,8$ cm de DAP en sólo un año posterior a la siembra de las plántulas en campo. Es importante mencionar, que las tasas de crecimiento influyen en la densidad de la madera de balsa (0.10 - 0.15 densidad específica) que es menor comparada con *G. sanctum* (1.12-1.35 densidad específica) (Jiménez et al. 2002; Jiménez et al. 2010), razón por la cual la balsa crece más rápido y su madera es más liviana que la de guayacán.

Schaffer y Mason (1990) evaluaron los efectos de la sombra y la herbivoría de insectos del género *Toumeyella* sobre el crecimiento de árboles jóvenes de *G. sanctum* (altura promedio de 110 cm) y determinaron que no existe diferencia en la asimilación de CO₂ en condiciones de luz saturada y sombra, pero sí en las concentraciones de clorofila siendo mayor en el tratamiento de oscuridad, consecuentemente los autores concluyeron que la sombra y la herbivoría disminuyen el crecimiento y la capacidad fotosintética de *G. sanctum*.

Wendelken y Martin (1987) estudiaron la dispersión de semillas de *G. sanctum* y encontraron que 19 especies de aves dispersan las semillas. Además, su arilo y semillas son alimento para varias especies de aves del bosque seco como el pecho amarillo (*Tyrannus melancholicus* y *Pitangus sulphuratus*), la viudita (*Thraupis episcopus*) y el yigüirro (*Turdus grayi*) entre otras (Zúñiga-Ortiz, 2016).

En otro estudio realizado por Otterstrom, Schwartz y Velázquez-Rocha (2006), los investigadores determinaron mediante quemas controladas que la especie *G. sanctum* presenta un aumento en las densidades de plántulas posterior al fuego junto con *Swietenia humilis* Zucc (Meliaceae), lo que podría indicar que sus semillas pueden ser resistentes al fuego.

La mortalidad de plántulas en los bosques de guayacanes posterior a la germinación es muy alta y solamente un 2% llega a germinar y generar una plántula. De éstas plantas juveniles apenas un 8% llega a la edad de 30 años, a partir de diámetros mayores a 1 cm DAP el riesgo de morir por causas naturales se reduce y el árbol alcanza su madurez para reproducirse (López-Toledo et al., 2013).

Investigaciones sobre el aprovechamiento de *G. sanctum* en México revelan que las poblaciones en ese país son estables en tamaño poblacional y que el uso forestal no afecta la regeneración de la especie; además, el aprovechamiento genera co-beneficios de conservación para la especie ya que crea áreas de interés para conservar y programas de monitoreo (López-Toledo, Ibarra-Manríquez, Burslem, Martínez-Salas, Pineda-García & Martínez-Ramos, 2012; López-Toledo et al., 2013).

Recolección, manejo y almacenamiento de semillas

En estudios de germinación es de importancia considerar la forma de recolección de las semillas, proceso que debe hacerse preferiblemente desde el árbol madre antes de que estas sean dispersadas, asimismo se deben considerar ciertos factores biológicos que influyen en la recolección de semillas como la fenología, el tipo de fruto, la dispersión, la maduración y los daños que se le pueden ocasionar al árbol durante la recolección, además los procedimientos metodológicos y los costos asociados a ésta (Schmidt, 2007). En el caso de guayacán se revisó la información sobre su fenología (Jiménez et al., 2010; Zamora, 2015) para evitar imprevistos en cuanto a la recolección de sus semillas y su logística; así de esta manera disminuir los costos y esfuerzos en la obtención de las semillas.

El procesamiento de las semillas es una etapa clave para el éxito de germinación, éste se refiere a los procedimientos de manipulación de las semillas entre la recolección y el almacenamiento o siembra (Schmidt, 2007). Schmidt en su obra “Semillas Tropicales” sugiere que el procesamiento de semillas puede agruparse en los siguientes pasos: 1) Pre-

limpieza, eliminar los residuos grandes como hojas, ramitas y partes de frutos. 2) Extracción, la separación física de frutos y semillas. 3) Eliminación de apéndices en las semillas como el arilo. 4) Limpieza de las semillas con agua. 5) Clasificación, separación de la fracción de semillas basado en: semillas por individuo (estudios genéticos), tamaño, peso, color, etc. Por último, el ajuste del contenido de humedad (secado como preparación para el almacenamiento), debe hacerse a una temperatura y humedad adecuadas. Posterior a este procesamiento las semillas estarán listas para almacenarlas o germinarlas.

Efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación

Maciel, Bautista y Aular (1996) obtuvieron un 66% de germinación en semillas recién procesadas de níspero (*Manilkara achras*) y un 23,3% en semillas con tres meses de almacenamiento, encontrando que el tiempo de almacenamiento de las semillas influye sobre el porcentaje de germinación y vigor de las semillas, observándose una disminución significativa en la velocidad y germinación total. En una especie del mismo género del guayacán, *Guaiacum officinale*, se ha encontrado la misma tendencia, en semillas de origen cubano almacenadas de 5 a 8 °C pierden su viabilidad en un mes; además se han obtenido porcentajes de 60% de germinación en semillas “frescas” (Betancourt Barroso, 1987). En semillas de *G. officinale* de origen puertorriqueño se obtuvo el 5% de germinación con semillas almacenadas por un mes a 5 °C; en semillas almacenadas por un mes a 26 °C se logró un 20% de germinación y un 10% en semillas almacenadas por dos meses a 26 °C (Marrero, 1949).

Buitrago-Rueda, Ramírez-Villalobos, Gómez-Degraves, Rivero-Maldonado y Perozo-Bravo (2004) concluyen que el tiempo de almacenamiento muestra una influencia significativa en la tasa de germinación, así como en la emergencia y longitud de la raíz. La velocidad de emergencia radicular en la germinación está directamente relacionada con el vigor de semillas, el cual se define como el potencial para una emergencia radicular rápida y uniforme de un lote de semillas (Contreras & Barros, 2005; Navarro, Febles & Torres, 2012). ISTA define el vigor como “la suma total de aquellas propiedades que determinan el nivel de actividad de la semilla o del lote de semillas durante la germinación y la emergencia de las plántulas”. Por ejemplo, en plantas de café se ha determinado que el almacenamiento reduce el vigor de la semilla hasta un 90% (Ortuño & Echandi 1980); sin

embargo, es importante evaluar el vigor de las semillas frescas y almacenadas para determinar el potencial y la calidad de diferentes lotes de semillas (Contreras & Barros 2005).

Semillas ortodoxas y recalcitrantes

La longevidad de un lote de semillas se refiere al tiempo en el cual las semillas se pueden mantener viables bajo determinadas condiciones de temperatura y contenido de humedad. De acuerdo al contenido de humedad las semillas pueden clasificarse en semillas ortodoxas y recalcitrantes (Berjak & Pammenter, 2004). Las semillas ortodoxas pueden almacenarse por largos periodos de tiempo y permanecer viables durante décadas a una temperatura de hasta -18 °C, por lo que las principales características fisiológicas de las semillas ortodoxas son su gran tolerancia a la deshidratación y resistencia al almacenamiento en frío (Piedrahita, 1987; Berjak & Pammenter, 2004; Magnitskiy & Plaza, 2007).

Las semillas recalcitrantes, por el contrario, son más sensibles a la deshidratación; adicionalmente, muchas semillas recalcitrantes de origen tropical son sensibles al frío y no pueden ser almacenadas a temperaturas inferiores a 15°C sin comprometer su viabilidad y germinación (Berjak & Pammenter, 2004; Magnitskiy & Plaza, 2007). Muchas especies de árboles tropicales poseen semillas recalcitrantes, algunos casos son la Fruta dorada (*Virola surinamensis* (Rol.) Warb.), la Nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. Bonpl.), la Araucaria (*Araucaria angustifolia* Bertol.) y el Roble (*Quercus rugosa* Née) (Magnitskiy & Plaza, 2007); sin embargo, aún existe poca información sobre muchas especies de árboles tropicales y se desconoce si su comportamiento corresponde a semillas recalcitrantes u ortodoxas.

Por otro lado, varios autores han reportado que el nivel de humedad al momento de la diseminación de semillas recalcitrantes de algunos árboles tropicales varía entre un 20 y 50%. Por ejemplo, en *Pourouma cecropiifolia* Mart. (Urticaceae) el contenido de humedad de la semilla fresca es de un 23% (Sánchez et al., 2005), 25% en la Nuez del Brasil *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Lecythidaceae) (Kainer et al., 1999), en la palma *Euterpe espirosantensis* Fernand. (Arecaceae) entre 46-51% (Martins et al., 1999) y en *Eugenia dysenterica* D.C. (Myrtaceae), un árbol de sabana, se ha reportado en un rango

entre 47 a 53% (Andrade et al., 2003). Para determinar si las semillas de una especie presentan un comportamiento ortodoxo o recalcitrante se han desarrollado distintas pruebas para evaluar la viabilidad de las semillas almacenadas, entre los más comunes se encuentran la prueba de índigo carmín y la prueba de tetrazolio ambos basados en la tinción de tejidos vivos y muertos en los embriones (Marrero, Padilla, Valdés & Nogales, 2007).

Viabilidad de semillas con la prueba de tetrazolio (TZ)

Un medio que se utiliza para determinar si una semilla es viable, es la prueba de Tetrazolio (TZ) también llamada Prueba Topográfica por Tetrazolio; esta prueba se realiza con el objetivo de realizar una estimación de la viabilidad en varias muestras de las semillas de un lote, asimismo para detectar daños en los embriones (Verma & Majee, 2013; Lima, Boaventura & Villela, 2018). La prueba de TZ presenta las ventajas de que puede realizarse rápidamente y no requiere un equipamiento muy sofisticado. La prueba de TZ también es frecuentemente aplicada en semillas que presentan estado de latencia o dormancia (Verma & Majee, 2013), así como también se han realizado distintos estudios que estiman los tiempos y concentraciones óptimas para diferentes especies.

Esta prueba es muy utilizada para determinar la viabilidad de semillas de plantas comerciales (Salinas, Yoldjian, Craviotto, & Bisaro 2001; Ruiz, 2009). Las primeras pruebas de esta metodología fueron aplicada en plantas de interés alimenticio son en la soja, el trigo, el arroz, los frijoles, el chile, la zanahoria y el maíz (Pérez-García & Pita-Villamil, 2001). Otras plantas que han sido sometidas a esta prueba son hierbas como *Puya raimondii* Harms. (Bromeliaceae) (Vadillo, Suni & Cano, 2004), *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) y *Anethum graveolens* L. (Dill) (Apiaceae) (Victoria, Bonilla & Sánchez, 2006), *Trichocentrum jonesianum* (Rchb. f.) M.W. Chase & N.H. Williams (Orchidaceae) (Lallana & García, 2013), así como para evaluar la maduración de embriones en semillas de maíz (*Zea mays* L.) (Poaceae) (Lima, Boaventura & Villela, 2018); también se ha aplicado en árboles como *Pinus pinea* L. (Pinaceae) (Benito-Matías, Sierra, Jiménez, & Rubira, 2004) y la papaya (*Carica papaya* L.) (Caricaceae) (Carvalho et al., 2018). Para *G. sanctum* se realizaron pruebas de TZ en embriones mostrando viabilidad y germinación muy similares en un periodo de ocho meses (Espinoza-Ocaña & Orantes-García (2014). En estos estudios los resultados son muy variados entre 40 y 100%, esto debido a que la viabilidad

depende de varios factores como el contenido de humedad, tiempo de almacenamiento, entre otros; sin embargo, todos los estudios indican que la prueba TZ permite una buena estimación de la germinación en semillas frescas con alto potencial germinativo. A pesar de ello, existen muy pocos ensayos de TZ realizados con especies forestales, campo aún por trabajar.

Estudios de propagación generativa en árboles tropicales

En varios estudios se han descrito los porcentajes de germinación en semillas recolectadas de especies de árboles tropicales nativos de Costa Rica presentando valores aceptables. Por ejemplo, en el Gavilancillo (*Albizia adinocephala* (Donn. Sm.) Britton y Rose) (Fabaceae) la germinación varía de un 60-84% (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2017), en la Ceiba (*Ceiba pentandra* (L.) Gaertn) (Malvaceae) de un 8 y 100% (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2014b), en el Cenízaro (*Samanea saman* (Jacq) Merril.) (Fabaceae) varía de un 85-100% (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2014a), para la Caoba (*Swietenia macrophylla* G. King) (Meliaceae) entre un 60% a un 84% (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2008), el Coralillo (*Cassia moschata* Kunth) (Fabaceae) varía de 60-84% (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2015a) y en el Cedro amargo (*Cedrela odorata* L.) (Meliaceae) se reporta de un 85-100% (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2014c). En estas seis especies de árboles los porcentajes de germinación son muy variables, reportando en el caso de la Ceiba un rango de 8-100%; los autores atribuyen estas variaciones principalmente a la “calidad de las semillas”, sin embargo no definen este término.

La calidad de los lotes de semillas incluye variables como la viabilidad, la germinación, el contenido de humedad de las semillas y las características de los árboles progenitores (madurez y genética) (Schmidt, 2007). También, es notable que en los trabajos que evalúan la viabilidad y germinación, pocos determinan el contenido de la humedad en la semilla, el cual desempeña un rol crítico en las otras dos variables ya que la desecación influye en la disminución de reservas, alteraciones del material genético y acumulación de metabolitos tóxicos en los embriones (Pérez-García & Pita-Villamil, 2001). Además, pocos estudios incluyen la sobrevivencia posterior a la germinación lo cual es importante ya que muchas semillas son sensibles a las condiciones de humedad, luz y temperatura y pueden

ser infectadas por patógenos que causan deterioro y la muerte de las plántulas (Pérez-García & Pita-Villamil, 2001).

El trasplante o repique posterior a la germinación es un proceso importante y de cuidado en su ejecución, permitiendo la uniformidad en el crecimiento de las plántulas dado que evita la competencia intraespecífica de los individuos y disminuye la mortalidad (Casanova, Ramírez & Solorio, 2007). En algunas especies de hortalizas como el chile el trasplante de plántulas estimula la floración temprana y precocidad en la producción (Montaño-Mata & Nuñez. 2003). En el árbol *Dipteryx micrantha* Harms (Fabaceae) realizaron experimentos de trasplante en distintas condiciones de luz en campo (sotobosque y claros) y demostró que la sobrevivencia y el crecimiento en diámetro y altura está relacionado con las condiciones de mayor intensidad de luz en claros; además que el diámetro y el número de hojas inicial de hojas no influye en el crecimiento durante un periodo de un año (Romo-Reátegui 2003).

1.2. Justificación

El guayacán real es una de las especies forestales amenazada más escasa de Costa Rica junto con otro grupo de árboles, de los cuales el gobierno prohibió su corta en el año 1997 mediante el Decreto Ejecutivo de Veda N° 23700-MINAE (MINAE, 1997); sin embargo, las poblaciones e individuos adultos remanentes que existen actualmente en país han sido poco estudiados, y se desconocen muchos aspectos fisiológicos y ecológicos de las semillas. El guayacán real ha sido una especie de poco interés de investigación, a pesar de ser considerada una especie amenazada hace más de 40 años por CITES (2018). El estado de las poblaciones mencionado en la literatura describe que es una especie aislada, poco abundante y con una regeneración limitada en ciertos bosques de Costa Rica.

Actualmente uno de los principales desafíos para la conservación de especies en peligro de extinción es comprender sobre aspectos de su reproducción, en el caso de las plantas involucra de manera general el conocimiento de su floración, fructificación y germinación, así como la interacción de la planta con sus polinizadores y dispersores. Las especies de plantas amenazadas como el guayacán real requieren descripciones detalladas de su ciclo de vida para favorecer su conservación. Es necesario generar información ecológica sobre su reproducción, estrategias de manejo y programas de investigación y conservación para asegurar la sobrevivencia futura de la especie de interés, como es el caso de *G. sanctum*. Además, se deben crear iniciativas y estrategias de reproducción *ex-situ* para estas especies de árboles tropicales con el fin de promover su repoblación y la recuperación de la especie en los bosques de Costa Rica.

Las condiciones de germinación y viabilidad que figuran para muchas especies de plantas de interés comercial (frutales, ornamentales, hortalizas y forestales) han sido establecidas según la International Seed Testing Association (ISTA); sin embargo, existen muchas otras especies, como por ejemplo el *G. sanctum* que no se encuentran dentro de estos manuales, por lo cual es importante evaluar la viabilidad y germinación en tales casos ya que es una especie forestal en peligro de extinción con diversos usos forestales y etnobotánicos.

En los estudios de biología reproductiva de plantas es importante evaluar procesos como la germinación y el efecto de factores ambientales como la luz, la temperatura y la humedad ya que estos juegan un papel indispensable en la germinación de las semillas y la

sobrevivencia de las plantas; además, evaluar condiciones que logren mayores porcentajes de sobrevivencia y rendimiento. Para los viveros forestales este tipo de información es importante o vital porque puede reducir los costos en tiempo y dinero, proporcionando información útil para su reproducción y metodologías que pueden ser replicadas; así como también aumenta el éxito de reproducción de las especies de interés. Asimismo, se promueve la reproducción de especies amenazadas como el guayacán real lo que permite que estos árboles puedan ser incorporados en planes y proyectos de restauración de bosques secos, con fines de conservación *in situ* de la especie como ha sido el caso de la plantación de guayacán real en la Estación Experimental Forestal Horizonte, en el Área de Conservación Guanacaste.

Por lo mencionado anteriormente, el presente estudio tiene como objetivo principal generar información básica sobre la germinación *ex-situ* de *G. sanctum* con el fin de entender mejor aspectos de su fisiología y ecología, sobre todo en un estado tan crítico y vulnerable de sus primeras etapas de vida como lo es la germinación de las semillas y la sobrevivencia inicial de la plántula. Asimismo, aplicar la prueba de viabilidad con Tetrazolio en semillas de guayacán real como una técnica que permite evaluar rápidamente la viabilidad de distintos lotes de semillas de especies forestales. Este estudio permitirá generar conocimientos acerca de la reproducción de *G. sanctum*, específicamente en temas como el efecto del tiempo de almacenamiento, de la luz, la temperatura y el estrés hídrico en la germinación de las semillas, así como también la sobrevivencia de las plántulas a posteriori de la germinación y el repique; datos podrían ser utilizados para la producción de la especie en viveros.

1.3. Planteamiento del problema a investigar

¿Existe un efecto del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de humedad, la viabilidad y germinación en semillas de *G. sanctum*? Y ¿Cómo afecta la luz, la temperatura y el estrés hídrico en el proceso de la germinación en semillas *G. sanctum*? Finalmente, ¿Cuál es la mortalidad de las plántulas de *G. sanctum* durante el periodo de germinación y posterior al repique?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de humedad, la viabilidad y algunos factores ambientales en la germinación de semillas *Guaiacum sanctum*, así como la sobrevivencia y el crecimiento de las plántulas bajo condiciones de laboratorio con el fin de mejorar las prácticas de reproducción y manejo *ex situ* para esta especie.

1.4.2. Objetivos específicos

- Analizar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de humedad, viabilidad y germinación de tres lotes de semillas de *G. sanctum*.
- Determinar el efecto de la luz, la temperatura y el estado hídrico del sustrato en la germinación de semillas de *G. sanctum* con un mes de almacenamiento.
- Cuantificar la mortalidad y el crecimiento de plántulas de *G. sanctum* en condiciones de laboratorio.

2. Marco Teórico

Descripción de *Guaiacum sanctum* L.

El guayacán real también conocido como guayacán, *lignum vitae*, árbol santo o palo de piedra, es un arbusto o árbol (más frecuente) de la familia Zygophyllaceae de tamaño mediano de 3-18 m, sin embargo la especie alcanza hasta 20 m de altura y 60 cm de diámetro (Jiménez et al. 2002; Zamora, 2015) e inclusive en condiciones naturales se ha reportado árboles de hasta más de 30 metros de altura. Este árbol tiene fuste rugoso, grisáceo y a veces exfoliante en placas, posee hojas paripinnadas, opuestas, con 2-7 pares de foliolos opuestos, asimétricos y glabros (Jiménez et al. 2002). *Guaiacum sanctum* se caracteriza por su hábito generalmente arbóreo, a veces con un aroma fuerte y una resina pegajosa, con las ramitas abultadas en los nudos y corchosas, así como por sus pétalos blanco azulado a azules o lila y frutos capsulares que expone una semilla con arilo rojo (Zamora, 2015).

El guayacán real posee una floración muy llamativa que varía de azul-morado hasta blanco, con inflorescencias de hasta 9 flores fasciculadas o 1 flor solitaria; la flor tiene un pedicelo de 10–15 mm; posee 5 sépalos de 4–6 mm que son caducos; tiene 5 pétalos con un color blanco azulado a azules o lila que miden de 7–12 mm de forma obovada; el androceo está compuesta de 10 estambres, las anteras son de color amarillo; el gineceo tiene un ovario penta-ocular; los frutos son capsulares de color amarillo a anaranjado cuando maduros y miden de 1.2–1.6 x 1.2–2 cm con forma obovoides y con 1-5 lóbulos; las semillas generalmente 1 o 2 raramente 5, las semillas son de color café a negras con cerca 10 mm de longitud, elipsoides y con un arilo rojo, dulce, que rodea la semilla (Jiménez et al. 2002; Zamora, 2015) (Anexo 1).

Distribución de *Guaiacum sanctum* L.

El guayacán real se distribuye desde el sur de Florida (Estados Unidos), México y América Central hasta el norte de América del Sur; en Costa Rica se conocen poblaciones en algunas áreas de la provincia de Guanacaste desde el nivel del mar hasta los 450 m de elevación (Jiménez et al. 2002; Zamora, 2015; Zúñiga-Ortiz 2016). Las poblaciones de esta especie se encuentran distribuidas en Costa Rica en un área de 1383,7 km², de los cuales el

52% se encuentra en terrenos protegidos por el Estado (Estrada, Rodríguez, & Sánchez, 2005).

El guayacán real es un árbol típico del estrato medio de bosques secos, con una precipitación inferior a 1 500 mm anuales; se encuentra en laderas de cerros, en suelos franco arcillo arenosos que se caracterizan por tener un pH ligeramente alcalino con altos contenidos de fósforo (Hernández-Garzón 2001); algunas poblaciones suelen estar asociadas a suelos calcáreos provenientes del fondo marino, como por ejemplo la población existente en el Cerro Guayacán, en el Parque Nacional Palo Verde y La Cruz de Guanacaste (Jiménez et al., 2002; Fuchs et al., 2013).

Características de la madera de *Guaiacum sanctum* L.

La madera de guayacán real se ha descrito como una de las maderas más preciosas del mundo, de todas las maderas que se comercializan internacionalmente, la madera de guayacán real es una de las más duras, con una resistencia que excede los 855 Kg/cm² y su gravedad específica llega a alcanzar valores en el orden de 1.12-1.35, por lo que esta madera fácilmente se hunde en el agua (Jiménez et al., 2002; López-Toledo et al., 2008).

En el mundo, la madera de guayacán real se ha utilizado para la elaboración de gran cantidad de productos, desde piezas estructurales en la construcción de barcos hasta muebles, herramientas y artesanías; la madera tiene una albura color amarilla o crema dorada y el duramen oliva a castaño oliva con bandas más oscuras, la superficie es brillante y lisa al tacto, esta posee un olor suave y agradable con una textura fina y uniforme (López-Toledo et al., 2008). La madera de guayacán real tiene la particular característica de auto-lubricarse, propiedad que tiene origen en su aceite natural, el guayacol, que mantiene saturada la estructura celular de esta madera y representa cerca de un tercio del peso total húmedo en la madera (López-Toledo et al., 2008).

Uso etnobotánico

El guayacol posee propiedades medicinales, siendo utilizado en el sector farmacéutico por sus propiedades estimulantes, sudoríficas y expectorantes, utilizado para el tratamiento en afecciones de vías respiratorias, en reumatismo, gota, escrofulosis y afecciones en la piel (Salgado-Valladares & Flores-Rodríguez, 2011). Estos autores

mencionan que antes que apareciera la penicilina (año 1928), el guayacol mezclado con el mercurio fue el primer remedio conocido por los europeos para el tratamiento contra la sífilis y otros padecimientos similares, el sobre aprovechamiento por esta causa y el uso de su madera provocó un decline importante de sus poblaciones en ese periodo en su rango de distribución natural.

Estado de conservación de *Guaiacum sanctum* L.

En algunas regiones de América Central y el Caribe, el guayacán se extrajo intensamente de manera ilegal, lo cual asociado con procesos de deforestación y cambios del uso del suelo, llevó a una disminución alarmante de sus poblaciones y hábitat e incluso a la extinción local de la especie en algunos países durante los años 70's y 90's (CITES, 2018). Dada la sobreexplotación y la pérdida de hábitat del guayacán real a lo largo de su distribución natural, el guayacán real se encuentra incluido dentro del apéndice II de la Convención Internacional para el Comercio de Especies Amenazadas (CITES) desde 1975, esta clasificación cataloga al guayacán real como una especie en riesgo potencial de extinción por lo cual su comercio internacional está regulado (Quesada-Monge, 2004; CITES, 2018); de igual manera, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) tiene al guayacán real clasificado como especie amenazada, siguiendo a esta categoría las de críticamente amenazada y extinta en su hábitat natural para algunos países (UICN, 2018). Actualmente, en nuestro país es una de las especies forestales con mayor grado de amenaza debido a su escasa regeneración y su lento crecimiento; sin embargo, *G. sanctum* se encuentra vedada desde 1997 mediante el Decreto Ejecutivo de Veda N° 23700-MINAE (MINAE, 1997), por lo tanto la corta del árbol y comercialización de la madera está prohibida en Costa Rica.

Estado poblacional de *Guaiacum sanctum* L. en Costa Rica

De acuerdo a lo citado por Estrada et al., (2005), información recolectada por el Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio) en los años 90's estimaba que la población de árboles de guayacán real, que existían en Costa Rica en ese tiempo, no superaba a los 100 especímenes de adultos reproductivos. También autores como Jiménez y Quesada-Monge mencionan que esta especie requiere urgentes programas de investigación, estudios y

protección ya que es una especie escasa y rara en los bosques del país (Jiménez, 1999; Quesada-Monge, 2004), sin embargo ha sido poco el esfuerzo realizado en el estudio de esta especie.

Actualmente en Costa Rica se conocen tres poblaciones silvestres de *G. sanctum* ubicadas en el Parque Nacional Palo Verde (PNPV), La Cruz y Playa Garza de Nicoya (Jiménez et al., 2002), además de algunos individuos que han sido plantados en jardines, parques urbanos y en fincas de la provincia de Guanacaste; sin embargo, las mayores densidades de la especie se encuentran en la zona de La Cruz y el Golfo de Nicoya donde existen árboles con DAP mayores a 35 cm (Zúñiga-Ortiz 2016). Hernández-Garzón (2001) estudió la estructura poblacional de *G. sanctum* en el PNPV y en Las Delicias de Garza encontrando que en el PNPV la forma de la distribución diamétrica de la población se asemejó al tipo "j" invertida, lo cual significa que existen más individuos jóvenes que adultos, mientras que en Las Delicias su forma se asemejó a una parábola, evidenciando una posible perturbación en este último sitio. En el 2013 Fuchs et al. estudiaron en la misma área protegida la regeneración *G. sanctum* y encontraron que en ciertos sitios como el cerro Guayacán existen más de 1000 plántulas por hectárea y que los individuos adultos (mayores a 5m de altura) son escasos llegando a un total de 35 en el sitio de estudio (50 ha), evidenciando una baja densidad de árboles adultos reproductivos.

Reproducción de *Guaiacum sanctum*

En Costa Rica, sus flores son observables de febrero a mayo y noviembre y sus frutos en marzo, abril, junio, julio y octubre (Jiménez et al., 2002). Hernández-Garzón (2001) evaluó la floración y fructificación de *G. sanctum*, quién encontró que solo un 9% de los árboles mayores a 10 cm de DAP florecieron en el año 2000 y sugiere que esta especie tiene una floración asincrónica y que posiblemente no todos los árboles que florecen tienen la capacidad energética para fructificar en el sitio estudiado.

El sistema de reproducción (semillas y flujo genético) de *G. sanctum* para dos poblaciones de Guanacaste fue investigado por Fuchs y Hamrick (2011), y mediante análisis de paternidad fraccional encontraron que la especie presenta un sistema de apareamiento mixto, presentando una alta heterogocidad ($H_e = 0.332 \pm 0.05$) y cuyo polen es transportado largas distancias (más de 4 Km), además, los autores mencionan que los

árboles aislados pueden funcionar de conexión entre grupos de individuos, contribuyendo con el movimiento de polen a larga distancia.

El proceso de la germinación

En general la germinación de las semillas se ve afectada por condiciones bióticas y abióticas, en consecuencia, este proceso en escenarios de campo puede ser espacial y temporalmente variable, ya que algunos microhábitats pueden proveer mejores condiciones que otros, propiciando así condiciones adecuadas para la germinación en diferentes momentos de tiempo (Bisigato & Bertiller, 1999; Guariguata, 2000; Isselstein, Tallowing & Smith, 2002). Diversos factores ambientales pueden intervenir en la germinación de la semilla, aunque de acuerdo con Mayer y Poljakoff-Mayber (1989), Bewley y Black (1994), Baskin y Baskin (1998) y Schmidt (2007) los factores principales son una combinación adecuada de temperatura, humedad y luz. Además, el ambiente químico que rodea la semilla debe ser indicado (Karssen & Hilhorst 1992), por ejemplo, Friedman (1995) menciona que la presencia de inhibidores aleloquímicos liberados por la vegetación circundante también puede determinar el éxito o fracaso de la germinación.

Algunas semillas pueden controlar la germinación por diferentes periodos; presentando latencia, que se define como un estado en el cual la semilla evita iniciar la germinación. Este estado cambiaría en el momento que las semillas tengan las condiciones favorables para su germinación (Lobo, Delgado, Cartagena, Fernández & Medina, 2007).

Efecto de la luz y temperatura en la germinación

La temperatura y la luz son determinantes en la expresión del máximo potencial germinativo, pero las magnitudes y regímenes más favorables deben ser establecidos para cada especie (Otegui, Pérez & de Souza-Maia, 2005). Se ha probado que la luz no influye en forma aislada el proceso de germinación, sino que es la combinación entre ciertas temperaturas y la luz la que favorece el desarrollo y emergencia de una plántula (Toole, 1976). Las semillas de las plantas pueden presentar una respuesta fotoblástica positiva cuando su germinación se ve favorecida por la luz, una respuesta negativa ocurre cuando

las semillas germinan en oscuridad y una respuesta neutral cuando no hay diferencia de la germinación en condiciones de luz y oscuridad (Lindow-López et al., 2018).

Mayer y Poljakoff-Mayber (1989) afirman: “que la temperatura óptima de germinación es aquella en la que se obtiene el más alto porcentaje de plántulas normales y en el menor tiempo” (p.34). Faccini y Puricelli (2006) encontraron que la temperatura óptima de germinación para *Nicotiana longiflora* Cav. (Solanaceae) es de 25 °C en condiciones de luz y para *Oenothera indecora* Cambess. (Onagraceae) es de 15 °C también en condiciones de luz. La temperatura con frecuencia es el principal factor que regula la germinación (Shafii & Price, 2001), esta afecta las enzimas que median en el proceso de germinación, alterando tanto la tasa de emergencia como el porcentaje final de germinación (Bewley & Black, 1994).

En investigaciones recientes, también se concluye que la temperatura influye más en la germinación que la luz. Por ejemplo, la germinación óptima de *Salvia verbenaca* L. (Lamiaceae), se encuentra entre un rango de 20-30 °C y; además, mencionan que no existe una diferencia en la germinación en condiciones de luz (fotoperiodo de 12 horas) y oscuridad, y que las semillas obtienen porcentajes de germinación de hasta 97% en dichas condiciones (Javaid, Florentine, Ali & Weller, 2018). También, para *Echium plantagineum* L. (Boraginaceae) se determinó que la germinación es mayor en rangos de 20-30 °C con más de 70% de germinación en condiciones de luz y a rangos de 17-7 °C la germinación es menor al 40% en condiciones de luz y sombra (Florentine et al, 2018). Cabe destacar que para ambas especies el rango óptimo de temperatura se encuentra en los 20 y 30 °C.

En un ensayo con la palma *Euterpe precatoria* Mart. (Arecaceae), se evaluó su germinación en seis diferentes condiciones de temperatura (20, 25, 30 y 35°C, 20-30°C, y 25-35°C) en luz y sombra, los autores encontraron que la condición óptima de germinación fue a 20 °C, independientemente de las condiciones de luz (Costa et al., 2018). En *Caesalpinia pulcherrima* L. (Fabaceae) se evaluó la germinación a temperaturas constantes de 20 °C y 30 °C y una alternancia entre 20-30 °C en cinco condiciones de luz (blanco, verde, rojo distante, rojo y ausencia de luz) observándose que las semillas germinan en presencia y ausencia de luz, pero el mayor vigor se presentó en condiciones de temperatura de 30 °C y luz blanca (Alves, Alves, Rodrigues de Araújo, dos Santos Lima & Ursulino, 2018).

Lindow-López y colaboradores (2018) estudiaron la germinación de seis especies de cactáceas y encontraron que todas las especies fallaron en su germinación bajo condiciones de oscuridad, independientemente de los regímenes de temperatura; mientras que en condiciones de luz la germinación se fue significativamente afectada por temperatura y la mayoría de especies obtuvieron porcentajes mayores a 25 °C. También estos últimos autores concluyeron que las temperaturas alternas no promueven la germinación de las semillas de los cactus en la oscuridad.

Efecto de la humedad y estrés hídrico en la germinación

La germinación suele estar restringida a períodos cortos en donde las condiciones ambientales son más húmedas y es poco probable que ocurra durante un periodo seco (García-Fayos, García-Ventoso & Cerdà, 2000; Quilichini & Debussche, 2000). Los autores argumentan que esto puede ser especialmente crítico para especies cuyas semillas no sean objeto de latencia y por lo tanto no forman un banco de semillas persistente, la germinación en tales casos está particularmente limitada a pulsos temporizados de humedad. La cualidad de ciertas semillas para germinar en ambientes de estrés hídrico, les concede beneficios ecológicos, pues las plántulas se instauran cuando otras especies sensibles a la sequía no son capaces de hacerlo (Augsburger, 1979; Bewley & Black, 1982). Sin embargo, la información sobre el efecto del estrés hídrico en la germinación de árboles tropicales es escasa.

Uno de los métodos más utilizados para medir estrés hídrico en la germinación es el uso de Polietilenglicol (PEG) (Michel, 1983; Singh, Ibrahim, Flury, Schillinger, & Knappenberger, 2013). El PEG es un polímero de cadena larga, inerte, no iónico [HOCH₂-(CH₂-O-CH₂)_n-CH₂OH] el cual posee propiedades de agente osmótico. Esta sustancia no penetra las células cuando su peso molecular es alto (Castro-Montes, 2008), por lo tanto, a mayor peso molecular se necesita menor concentración de PEG para lograr cierto valor del potencial hídrico (ψ) y viceversa, así los cambios en ψ dependen de la concentración y la temperatura (Singh et al., 2013).

En un estudio de Cordero y Di Stéfano (1991) simularon el estrés hídrico con PEG 6000 y encontraron que la germinación de *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Bignoniaceae) se ve inhibida con potenciales osmóticos de 1,0 MPa y totalmente bloqueada a 1,5 MPa,

mientras que a 0,5 y 0,1 MPa se obtuvieron porcentajes de germinación de 72% y 88% respectivamente. En plantas de tomate también se evaluó el efecto del estrés hídrico en la germinación con PEG 6000, los resultados mostraron que la germinación disminuyó con el incremento del potencial hídrico negativo a partir de -0.5 MPa (Florido, Bao, Lara, Castro, Acosta & Marta Álvarez; 2018).

La reducción del porcentaje de germinación en presencia de estrés hídrico simulado con PEG también ha sido informado por Rodríguez-Morales et al. (2013) en cactáceas y por Florentine et al (2018) en bignoniáceas. En la especie *E. plantagineum* se reporta una disminución del porcentaje de germinación conforme aumenta el potencial hídrico negativo, con porcentajes de germinación menores al 20% a partir de -0.4 MPa (Florentine et al, 2018). Sin embargo, en algunas coníferas (Tesche, 1975; Falusi, Calamasi & Tocci, 1983) y en ciertas angiospermas arbóreas de la familia Fagaceae como *Quercus ilex* y *Q. pubescens* (Vuillemin, 1982), la resistencia al déficit hídrico favorece su germinación en hábitats secos. En especies de amplio rango de distribución, es posible que existan diferencias de capacidad de germinación cuando crecen en bosques o hábitats con diferentes patrones de precipitación, tal y como demostró Cordero y Molano en semillas de dos tipos de bosque de *Tabebuia heterophylla* de Puerto Rico (Cordero y Molano 1996).

Por lo cual, resulta interesante estudiar el efecto del estrés hídrico en la germinación de semillas de *G. sanctum* ya que se desconoce su comportamiento.

Sustrato en la germinación

Algunos autores también mencionan que el sustrato es una variable importante a considerar en la germinación y el establecimiento de una plántula (Bravo, Urdaneta, Silva, Poliszuk, & Marín, 2006; Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba 2014). El mercado actual ofrece una variedad de estos materiales, los cuales poseen propiedades bióticas y abióticas para un excelente desarrollo en la germinación; aspectos como el costo, el manejo, la productividad y la disponibilidad de estos materiales son elementos decisivos en su utilización para la reproducción en viveros (Sáez, 1999).

La turba de musgo (*Sphagnum* sp) es uno de los sustratos más utilizados en el ámbito mundial, sus características permiten una favorable germinación y crecimiento de las plántulas; sin embargo, este sustrato representa un costo más elevado para los viveros y

su extracción de los bosques representa una actividad insostenible para los ecosistemas y muchos hábitats han sido degradados y destruidos por esta actividad (Bravo et al., 2006). Debido a estas repercusiones el musgo se ha sustituido por otros sustratos más “amigables” con el ambiente; por ejemplo, se ha estudiado el éxito de germinación en hortalizas y árboles de interés comercial utilizando mezclas de sustratos orgánicos como la lombri-compost, el aserrín, fibra de coco y tierra con granza obteniendo buenos resultados (Quiroz & Rentería, 2002; Quesada-Roldán & Méndez-Soto 2005; Andrade-Rodríguez, Ayala-Hernández, Alia-Tejacal, Rodríguez-Mendoza, Acosta-Durán & López-Martínez, 2008). La mezcla de arena con tierra también han sido utilizado en estudios de germinación obteniendo resultados positivos de más de 70 % de germinación en especies forestales como la balsa (*Ochroma pyramidale*) (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2012), el cedro (*Cedrela salvadorensis*) (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2013) y cenízaro (*Samanea saman*) (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2014a). En el presente estudio se decidió utilizar este último sustrato.

Pruebas de germinación

Los ensayos de germinación en condiciones de campo son generalmente insatisfactorios puesto que sus resultados no pueden ser repetidos con confiabilidad (Zavala-Chávez, 2015), por lo tanto métodos y técnicas de reproducción han sido desarrolladas en condiciones *ex situ* controladas para producir una germinación más homogénea, breve y completa posible para la mayoría de las muestras de una planta particular (Isselstein et al., 2002).

Las normas de la ISTA se crearon en 1925 con el objetivo de estandarizar los análisis de semillas y facilitar su mercadeo. De acuerdo con la ISTA las condiciones de propagación de plantas de interés comercial deben ser estandarizadas para facilitar que los resultados de la prueba puedan ser reproducidos dentro de los límites más cercanos posibles a aquellos que están determinados por la variación de la muestra debida al azar de un lote semillas (ISTA, 2013). Inicialmente las pruebas se elaboraron para especies agrícolas pero progresivamente ha evolucionado y se han ido incluyendo especies de uso forestal, medicinal y ornamental (Poulsen, 2000). Las pruebas de potencial de germinación

recomendadas por la ISTA, consisten en cinco tipos de pruebas: pureza, peso, contenido de humedad, viabilidad y germinación de semillas.

La primer prueba de pureza, se realiza con el fin de identificar las semillas de la especie de interés y que en el análisis predomine la especie del interesado, incluyendo todas las variedades botánicas y cultivables de dicha especie, también se consideran semillas puras las semillas inmaduras, las de tamaño inferior al normal, arrugadas, enfermas o germinadas, siempre que puedan ser identificadas como pertenecientes a dicha especie (ISTA, 2013). La segunda prueba es la de peso, esta brinda el peso de la semilla expresado en relación al peso de 1000 semillas puras; permitiendo el cálculo del número de semillas por kilogramo, información importante en las operaciones del vivero (ISTA, 2013).

La tercera prueba es de contenido de humedad, esta se basa en calcular la humedad presente en las semillas que han sido o serán almacenadas. El contenido de humedad determina la actividad fisiológica y bioquímica de la semilla (Magnitskiy & Plaza, 2007), por lo cual es un factor importante en el almacenamiento y la germinación de las semillas. El contenido de humedad por debajo de niveles críticos puede producir lesiones y/o daños a los embriones durante el almacenamiento, por ejemplo el contenido de humedad mínimo que tolera *Coffea arabica*, *C. canephora* y *C. liberica* sin reducir su viabilidad, es de aproximadamente 9, 11, y 24% respectivamente (Eira et al., 2006). Asimismo, la determinación del contenido de humedad es de vital importancia para las operaciones de manejo de semillas en cuanto al peso, viabilidad y germinación de los lotes (ISTA, 2013).

Existen dos métodos principales para medir la humedad de la semilla: el método directo, donde se elimina el agua y se cuantifica la cantidad; y el método indirecto, que utiliza parámetros eléctricos (conductividad y capacitancia) (Grabe, Stanwood & McDonald, 1989). El método de secado al horno es recomendado por ISTA para determinar el contenido de humedad de las semillas. La determinación se debe realizar en al menos un duplicado en dos muestras de trabajo obtenidas independientemente de la muestra de análisis; el tamaño de la muestra de trabajo debe ser de 4 – 10g, para semillas grandes lo recomendado es no utilizar menos de 30 semillas en total (ISTA, 2013).

La cuarta prueba es la de viabilidad de semillas con TZ (Tetrazolio), el propósito de esta prueba es mostrar la actividad bioquímica de una semilla y el potencial de producir una plántula normal, dado que una semilla no viable muestra deficiencias y/o anomalías de

naturaleza tal que no permite su desarrollo en una plántula normal (AOSA, 1997). En la prueba de TZ se utiliza una solución de la sal cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio como un indicador de varios procesos metabólicos que acontecen en las células vivas del embrión, posterior que esta solución es absorbida por la semilla, en las células se lleva a cabo una reacción química de oxidación-reducción en la cual intervienen las enzimas deshidrogenasas presentes en los tejidos vivos, en esta reacción los protones de hidrógeno liberados por el proceso de respiración celular reducen la sal de tetrazolio a formazán (Benito-Matías et al., 2004; Russi, Bartosik, Rodriguez & Peretti, 2007). El formazán es una sustancia estable, no difusible, de coloración rojiza, que permite distinguir las áreas vivas de las semillas (áreas coloreadas de acuerdo a la concentración de TZ), de las zonas muertas (de color blanco) (Benito-Matías et al., 2004; Verma & Majee, 2013).

Por último, los ensayos de germinación, estos tienen el objetivo de determinar el potencial máximo de germinación de un lote de semillas, el que a su vez pueda usarse luego para comparar la calidad de diferentes lotes (ISTA, 2013). Schmidt (2007) afirma: “las pruebas de germinación se llevan a cabo en condiciones óptimas de temperatura, humedad y luz, y con tratamiento previo adecuado para vencer la posible latencia para la especie en cuestión” (p, 286).

3. Marco Metodológico

Recolecta de las semillas

En las mediciones de las pruebas de peso, humedad, viabilidad y germinación se utilizaron tres lotes puros de semillas de *G. sanctum*, los cuales fueron recolectados en Julio de 2015, Agosto de 2016 y Julio de 2017 en diferentes sitios de la provincia de Guanacaste, Costa Rica (Figura 1). En total se realizaron 21 visitas de campo donde se marcaron, georreferenciaron y recolectaron los frutos y semillas de un total de 23 árboles de guayacán real (Anexo 2). El DAP promedio de los árboles semilleros fue de 36.5 ± 6.8 cm con una altura promedio de 10.2 ± 2.08 m. Se recolectaron en total 3437 semillas para el lote 2015, 1448 del lote 2016 y 2909 semillas del lote 2017. Las semillas fueron procesadas según la metodología propuesta por Schmidt (2007) y almacenadas en bolsas de papel dentro de bolsas plásticas con cierre hermético para evitar la desecación, a una temperatura ambiente de 25°C en promedio (22-28°C) en el Laboratorio de Botánica de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional (UNA).

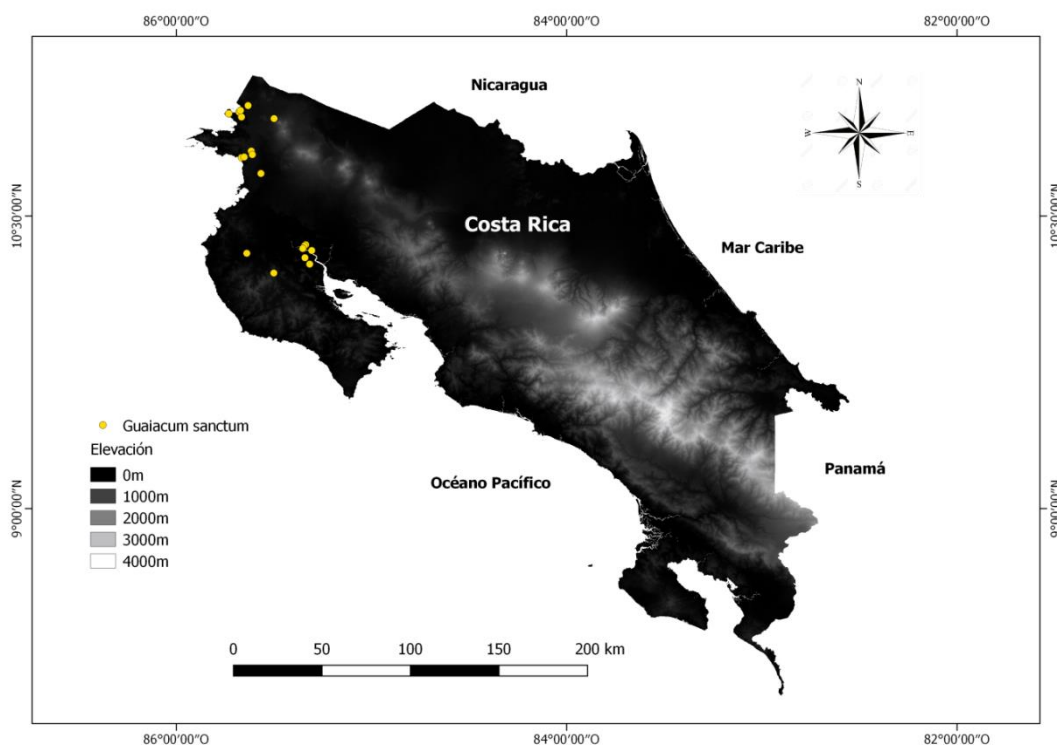


Figura 1. Localización de los árboles semilleros de *Guaiacum sanctum* L. utilizados en el estudio, provincia de Guanacaste, Costa Rica. Proyección WGS84.

Diseño de investigación

Las pruebas de semillas fueron realizadas siguiendo los procedimientos establecidos por ISTA (2013), los cuales consisten en pruebas de pureza, peso, contenido de humedad, viabilidad y germinación. Las pruebas de pureza, peso y humedad se realizaron en el Laboratorio de Ecología Tropical Aplicada de la Escuela de Ciencias Ambientales, Campus Omar Dengo de la Universidad Nacional, Heredia, utilizando un horno digital Thermo Scientific modelo Herathem OMH100, una balanza analítica, cristalería de laboratorio entre otros instrumentos (Anexo 3). Las pruebas de viabilidad, germinación y sobrevivencia fueron realizadas en el Laboratorio de Botánica de la Escuela de Ciencias Biológicas, Campus Omar Dengo de la Universidad Nacional, utilizando estereoscopio Olympus SZX16, pinzas, recipientes, cámara de crecimiento vegetal Thermo Scientific modelo PR505755R (Anexo 4), luxómetro, entre algunos implementos básicos de laboratorio. El trasplante de las plántulas posterior a la germinación fue realizado en condiciones de laboratorio.

El sustrato utilizado para la germinación fue una mezcla homogenizada 50/50 de arena de río con tierra lombri-compost comprada en un almacén local. La arena fue lavada y secada, posteriormente la mezcla del sustrato fue esterilizado mediante calor seco en un horno a una temperatura de 120 °C durante 24 horas (Reyes-Guiñones, 2015). La desinfección de las semillas antes de la siembra se realizó con una solución de cloro comercial diluida al 1% durante 10 minutos, posteriormente se enjuagaron las semillas tres veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente; asimismo, después de sembrar las semillas en el sustrato se aplicó una disolución de un agente fungicida (Vitavax al 3%) para evitar posible contaminación por hongos (Billard, Dalzotto, & Lallana, 2014).

Diseños experimentales

Prueba de peso y morfometría: Se utilizaron ocho repeticiones al azar de 100 semillas de cada uno los lotes recolectados en 2015, 2016 y 2017. Cada muestra de los lotes se pesó individualmente en una balanza analítica con el fin de calcular el peso de 1000 semillas puras y el número de semillas por kilogramo. Adicionalmente, se realizaron mediciones a 240 semillas por cada lote con un vernier digital para comparar el largo y

ancho las semillas de cada lote con fin de observar diferencias en las dimensiones de las semillas entre los tres lotes.

Prueba de contenido de humedad: Se secaron 5 g de semillas de guayacán para cada uno de los tres lotes en cajas petri durante un periodo de 17 ± 1 horas a 103 ± 1 °C por triplicado para obtener el contenido de humedad de cada lote de semillas (n=9). Los recipientes se llevaron inmediatamente después del secado a un desecador donde se les dejó enfriar, posteriormente se pesaron con una balanza analítica (precisión de 0.001 g). El resultado se estableció como el promedio de las repeticiones, expresado con dos decimales.

Prueba de viabilidad con tetrazolio (TZ): Para esta prueba se utilizó una muestra al azar de semillas de guayacán de cada lote (1, 12 y 24 meses de almacenamiento). De acuerdo a Ruiz (2009) este procedimiento consiste en 4 etapas: hidratación, corte, tinción y evaluación en base al patrón de tinción e intensidad. Las semillas fueron embebidas en agua destilada 24 horas antes de realizar la prueba, posteriormente se realizó un corte longitudinal a cada semillas para extraer el embrión. Los embriones fueron colocados en tubos “eppendorf” de 2 ml con una solución de TZ al 1% durante 16 horas para su tinción, seguido por su evaluación. Se realizaron diez repeticiones con diez embriones en cada tubo eppendorf para un total de 100 embriones por cada lote.

La clasificación de embriones se realizó de acuerdo a Ruiz (2009), donde las semillas se clasificaron de la siguiente manera: en *viables*, cuando el embrión y el endospermo en su cara interna están teñidos homogéneamente de color rojo, brillante y lustroso; y *no viables*, embriones blancos o con la radícula y/o el endospermo completamente blanco (frecuentemente los tejidos de esta condición están flácidos y con falta de brillo); además en este último grupo se incluyeron los embriones que presentaron manchas blancas distribuidas irregularmente por el endospermo o en el embrión) (Figura 2).

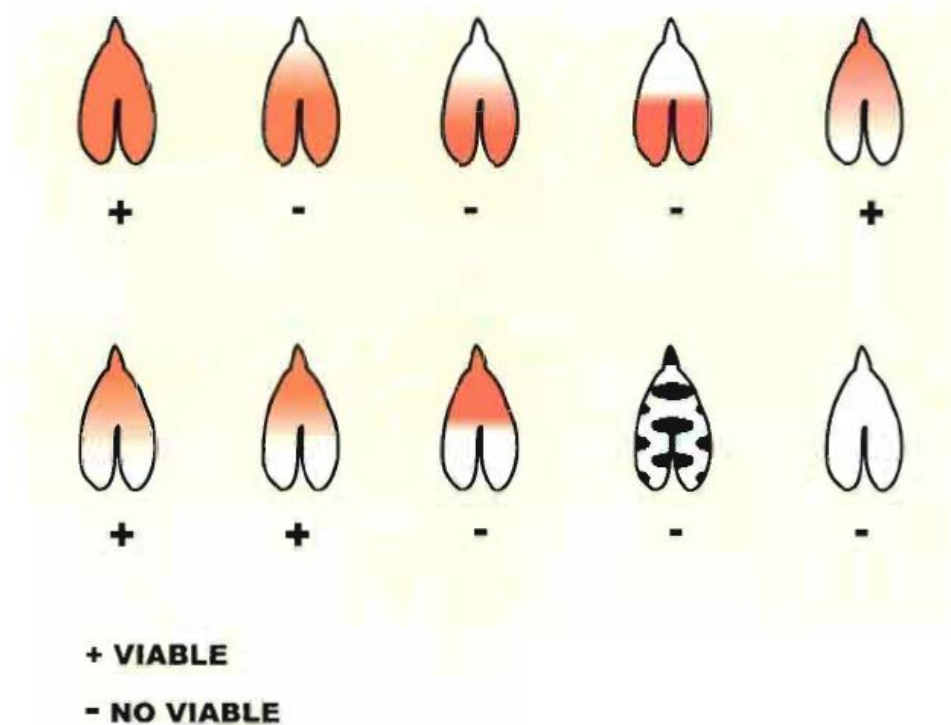


Figura 2. Diferentes patrones de tinción que pueden presentar los embriones de semillas en la prueba de viabilidad con Tetrazolio. Tomado de Pérez-García & Pita-Villamil (2001).

Pruebas de germinación: En todos los experimentos el periodo de germinación establecido fue de 21 días; además, las semillas que se consideraron como germinadas fueron aquellas en la que la radícula y el cotiledón o la plúmula habían emergido de la semilla (Stevens, Seal, Archibald, & Bond, 2014) (Anexo 5).

Efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación: Este experimento se realizó en la cámara de crecimiento vegetal con una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ en condiciones de luz (fotoperiodo de 12 horas), la fuente de luz instalada en la cámara corresponde a un sistema de dos lámparas fluorescentes de color blanco. Se colocaron 25 semillas en cajas plásticas con tapa transparente para evaluar su germinación. El sustrato utilizado fue la mezcla de arena con tierra lombri-compost. Se realizaron cuatro repeticiones por cada uno de los lotes colectados (2015, 2016 y 2017) para un total de 100 semillas por cada tratamiento.

Efecto de la temperatura y la luz en la germinación: Este experimento se realizó con las semillas del lote recolectado en el 2017 (1 mes de almacenamiento), dado a que las semillas de este lote presentaron mayor viabilidad en la prueba de TZ. Las pruebas de temperatura y luz se realizaron simultáneamente, por lo cual no debería existir ningún efecto del tiempo de almacenamiento sobre la germinación. Para este ensayo se utilizó la cámara de crecimiento vegetal programada a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1$; mientras que el Laboratorio de Botánica fue acondicionado a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, en ambas condiciones de temperatura se evaluaron dos intensidades de luz de 0 Lux (Oscuridad) y 2500 ± 300 Lux (Luz). Las cajas del tratamiento *oscuridad* fueron tapadas con cartulina para evitar que la luz atravesara la superficie de las mismas (Anexo 5). Se colocaron 25 semillas en cada caja de germinación y se realizaron cuatro repeticiones para un total de 400 semillas para el experimento. Posterior al periodo de germinación se midió el crecimiento en la altura de 48 individuos germinados en cada tratamiento (Luz y Oscuridad a 25°C y 30°C) para un total de 192 plantas evaluadas.

Efecto de estrés osmótico en la germinación: En este experimento se sembraron únicamente semillas del lote 2017 (1 mes de almacenamiento). Se colocaron 25 semillas a concentraciones de 0% (control), 10%, 20% y 30% de PEG 8000 (g/L) (molaridad equivalente a 0, 0.013, 0.025 y 0.038 mol/L) los cuales a una temperatura de 25°C corresponden a los siguientes potenciales osmóticos: 0, -0.2, -0.5 y -1.1 MPa (Arif, Jan, Mian, Khan, Hollington, & Harris, 2014). Las semillas fueron incubadas a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ con un fotoperiodo de 12 horas de luz. Para cada tratamiento se realizaron cuatro repeticiones, para un total de 400 semillas en este experimento.

Sobrevivencia después del trasplante: Un total de 120 plántulas fueron trasplantadas y separadas en recipientes plásticos individuales en un sustrato homogenizado de tierra con lombri-compost (50/50) comprada en el centro agropecuario local. La sobrevivencia de los individuos fue evaluada cada dos días en una cámara de crecimiento en un rango de temperatura de $25\text{-}27^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 12 horas durante 60 días.

Análisis de datos

El tamaño de las semillas de *G. sanctum* de los tres lotes se comparó mediante un diagrama de cajas (“box plot”) y se realizó una estadística descriptiva del peso de los tres lotes. El peso de 1000 semillas puras se calculó de la siguiente manera:

Peso de 1000 semillas (g) = Σ (sumatoria) de los pesos de ocho repeticiones individuales x 1.25

El contenido de humedad (%) se calculó con base en el peso fresco de la semilla con la siguiente ecuación:

$$CH (\%) = \frac{(M_2 - M_3)}{(M_2 - M_1)} * 100$$

Donde: CH = Contenido de humedad, M_1 = peso del recipiente en gramos, M_2 = peso del recipiente y su contenido en gramos antes del secado, M_3 = peso del recipiente y su contenido en gramos después del secado.

Para los porcentajes de viabilidad (TZ) y germinación se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (debido a que los datos no reunían el supuesto de normalidad) ($\alpha=5\%$), adicionalmente se realizó una prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para comparar las diferencias estadísticas entre el porcentaje de germinación estimado en la prueba de TZ y la germinación observada de los tres lotes de semillas.

Con los registros del número de semillas germinadas cada dos días se realizaron curvas de germinación acumulada con el fin de representar el vigor de germinación de las semillas de *G. sanctum* a través del tiempo en distintas condiciones de luz, temperatura y estrés hídrico (Tseng y Hsu, 1989; Contreras y Barros, 2005).

También se calculó el índice de germinación (IG) y el coeficiente de velocidad (CV) de germinación propuestos por Scott, Jones & Williams (1984) para cada tratamiento con el objetivo de cuantificar el vigor.

El índice de germinación está definido como:

$$\mathbf{IG} = \frac{\sum T_i * N_i}{S}$$

Donde: T_i es el número de días después de la siembra, N_i es el número de semillas germinadas en el día i , y S es el número total de semillas plantadas.

El coeficiente de velocidad se calcula como:

$$\mathbf{CV} = 100 * \left[\frac{\sum N_i}{\sum N_i T_i} \right]$$

Donde: N es el número de semillas germinadas en el día i , y T es el número de días desde la siembra. Por lo general, el CV aumenta a medida que más semillas germinan y con menor tiempo.

Para el crecimiento de las plantas se realizaron mediciones de altura (cm) a 48 plántulas germinadas en los tratamientos de luz y oscuridad a 25°C y 30°C, y se aplicó una prueba paramétrica de Fisher ($\alpha=5\%$) para determinar diferencias de altura entre los tratamientos.

Además, se contrastaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$) los porcentajes de germinación del lote con 1 mes de almacenamiento en los ensayos de temperatura-luz y potencial hídrico. Para calcular los porcentajes de germinación (PG) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mathbf{PG (\%)} = \frac{SG_i}{T} * 100$$

Donde SG es la cantidad de semillas germinadas en el día i , y T es el total de semillas sembradas.

Adicionalmente, se realizó una regresión lineal entre el porcentaje de germinación y el potencial hídrico para asociar el efecto del estrés hídrico sobre la germinación.

Para la sobrevivencia inicial se evaluaron las plántulas mediante la tasa de mortalidad calculando la tasa de mortalidad (TM) de las plántulas de *G. sanctum* de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$TM = \frac{NM}{P} * 1000$$

Donde NM es el número de muertes en un periodo de 60 días y P es la población inicial, en este caso la mortalidad está expresada por 1000 individuos.

Para las pruebas estadísticas y las gráficas se utilizó el programa STATISTICA 8.0 (Weiß 2007).

4. Resultados

Morfometría y peso de semillas

El largo y ancho de las semillas de *G. sanctum* no difiere entre los tres lotes de semillas colectados en 2015, 2016 y 2017 (Figura 3) por lo tanto los lotes presentan dimensiones similares en el tamaño de las semillas; sin embargo, las semillas del lote 2017 con 1 mes de almacenamiento presentaron un menor número de semillas por kilogramo y mayor coeficiente de variación en el peso de 100 semillas que los lotes con 12 y 24 meses de almacenamiento (cuadro 1). El rango de semillas por kilogramo varió entre 5 800 - 6 600 entre los tres lotes.

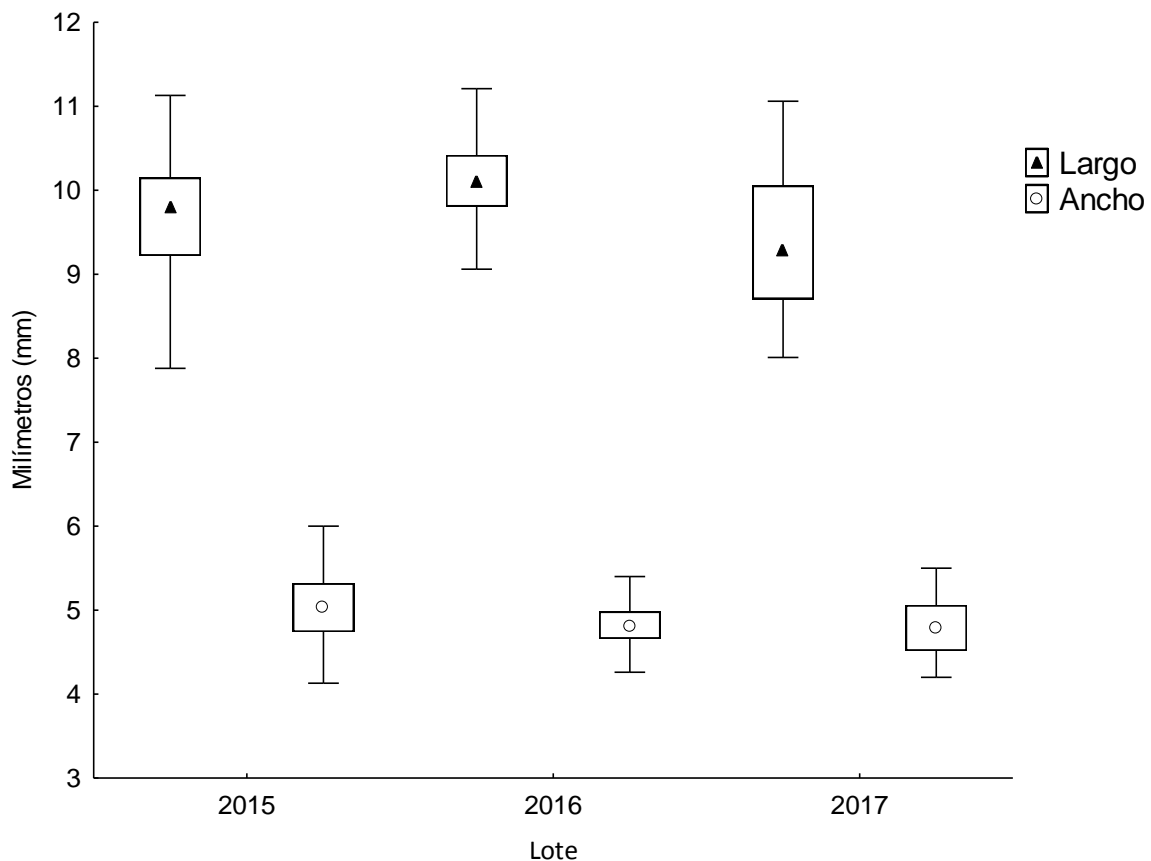


Figura 3. Medidas morfométricas de tres lotes de semillas de *G. sanctum* (n=240), colectadas en tres diferentes fechas en la Provincia de Guanacaste, Costa Rica.

Cuadro 1. Peso de tres lotes de semillas de *G. sanctum* colectados durante los años 2015, 2016 y 2017 en la provincia de Guanacaste, Costa Rica (n=8). Los valores representan la media y su desviación estándar.

	1 mes Almacenamiento (2017)	12 meses Almacenamiento (2016)	24 meses Almacenamiento (2015)
Peso promedio de 100			
semillas (g)	15.13 ± 0.43	16.14 ± 0.28	17.18 ± 0.32
Coefficiente de			
variación (%)	2.82	1.71	1.81
Semillas/Kg	5 819	6 195	6 609

Contenido de humedad, viabilidad y germinación de semillas almacenadas

El contenido de humedad que presentaron todos los lotes fue menor al 15% de humedad con una diferencia de 3%, siendo el lote recolectado en 2017 el que presentó el valor más alto (cuadro 2). Los resultados de la tinción de los embriones de *G. sanctum* en la prueba de TZ (figura 4) muestra que el porcentaje promedio de embriones viables fue estadísticamente diferente para los tres lotes; además el lote de 2017 con 1 mes de almacenamiento obtuvo mayor viabilidad con un valor de $67,5 \pm 14.88\%$, el cual es significativamente mayor en comparación con los otros lotes (KW = 19.33; $p < 0.05$); además la viabilidad de los embriones fue disminuyendo hasta 0% de viabilidad a los 24 meses de almacenamiento (Figura 5).

Asimismo, el lote de 2017 fue el que obtuvo mayor porcentaje de germinación con un promedio de $84\% \pm 5.65$ (KW = 8.26; $p = 0.01$), mientras que la germinación observada de los lotes 2015 y 2016 fue baja con porcentajes por debajo del 10% (Figura 5). La prueba de chi-cuadrado indicó que existe una diferencia entre la germinación esperada por la prueba de TZ y la germinación observada ($\chi^2 = 9.32$; G.L = 2; $p < 0.05$), obteniéndose una mayor cantidad de plántulas germinadas a la esperada en el lote con 1 mes de almacenamiento; sin embargo, para el lote con 12 meses de almacenamiento la germinación

fue menor a lo esperado en la prueba de TZ, mientras que a 24 meses la viabilidad y la germinación fue similar a lo esperado.

También, la curva de germinación acumulada demuestra que las semillas germinadas con 1 mes de almacenamiento presentaron el mayor vigor, además las semillas de los lotes de 12 y 24 meses de almacenamiento las semillas germinaron entre 4 - 9 días más tarde que las semillas con 1 mes, por lo que el proceso de germinación fue menos vigoroso y obteniendo promedios de germinación de 20% y 5% para los 12 y 24 meses, respectivamente (Figura 6).

Cuadro 2. Contenido de humedad (%) para tres lotes de semillas de *G. sanctum* almacenados a una temperatura ambiente (25 °C) (n=9). Los valores representan la media y su desviación estándar.

	1 mes Almacenamiento	12 meses Almacenamiento	24 meses Almacenamiento
Contenido de humedad (%)	14.72 ± 0.33	12.84 ± 0.19	12.01 ± 0.14

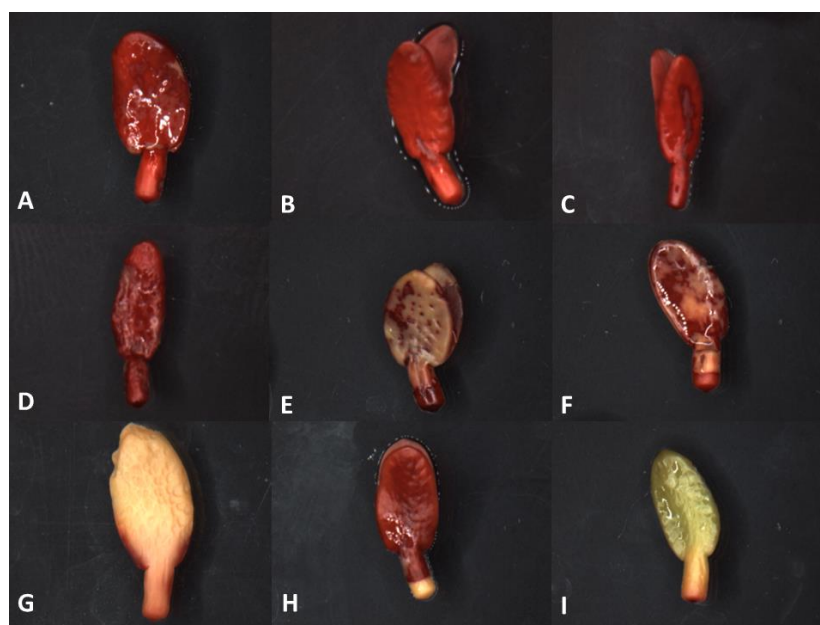


Figura 4. Embriones viables (A, B, C, D) y no viables (E, F, G, H, I) de *Guaiacum sanctum* en la prueba de viabilidad con TZ.

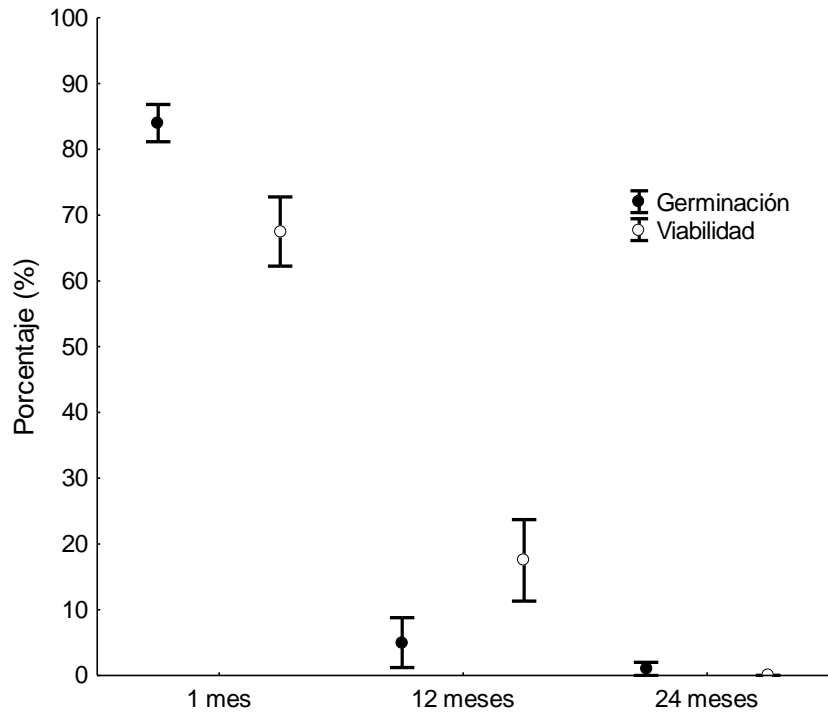


Figura 5. Porcentajes de viabilidad con tetrazolio y porcentajes de germinación promedio a 30°C para tres lotes de semillas de *G. sanctum* almacenados a temperatura ambiente de 25°C. Los círculos representan la media y las barras el error estándar.

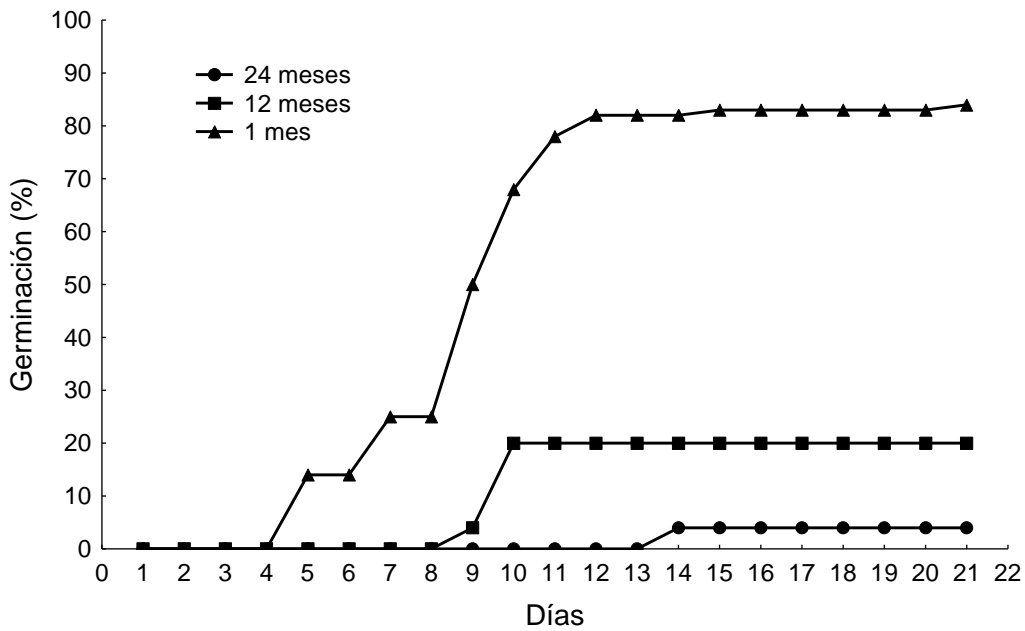


Figura 6. Germinación acumulada en condiciones de luz y temperatura de 30 °C de tres lotes de semillas de *G. sanctum* almacenados en condiciones de laboratorio a 25°C.

Efecto de la temperatura y la luz en la germinación de *Guaiacum sanctum*

Todos los tratamientos de luz y temperatura con semillas de *G. sanctum* presentaron curvas con forma de “S”, además el vigor de las semillas germinadas a temperaturas de 30 °C fue mayor, iniciando la germinación al día 5, mientras que a temperatura de 25 °C la germinación fue más lenta y menos vigorosa (Figura 7).

En los ensayos de germinación de luz y temperatura no se presentó diferencia significativa entre los porcentajes de los tratamientos (KW = 4.21; p = 0.23). En la germinación se obtuvieron valores finales entre 84% y 70%, siendo la combinación de 30°C/Luz la que presentó mayor germinación, mientras que la combinación de 25°C/Oscuridad fue la menor (Figura 8). El tratamiento que obtuvo el mayor valor del índice de germinación fue 30°C/Luz con un valor de 17.64 ± 1.18 , seguido por la germinación de 30°C/Oscuridad, 25°C/Luz y 25°C/Oscuridad con valores entre 16 y 14 (Cuadro 3). Por otro lado, el coeficiente de velocidad para todos los ensayos de luz y temperatura fue de 20 ya que las semillas de todos los experimentos comenzaron a germinar al mismo día (Cuadro 3).

Por último, la altura de las plántulas fue significativamente mayor en el tratamiento de 30°C/Oscuridad de acuerdo a la prueba de Fisher (F = 12.8; p < 0.05), mostrando hipocotíleos más largos; mientras que en el ensayo de 25°C/Luz las plántulas obtuvieron una menor altura (Figura 9).

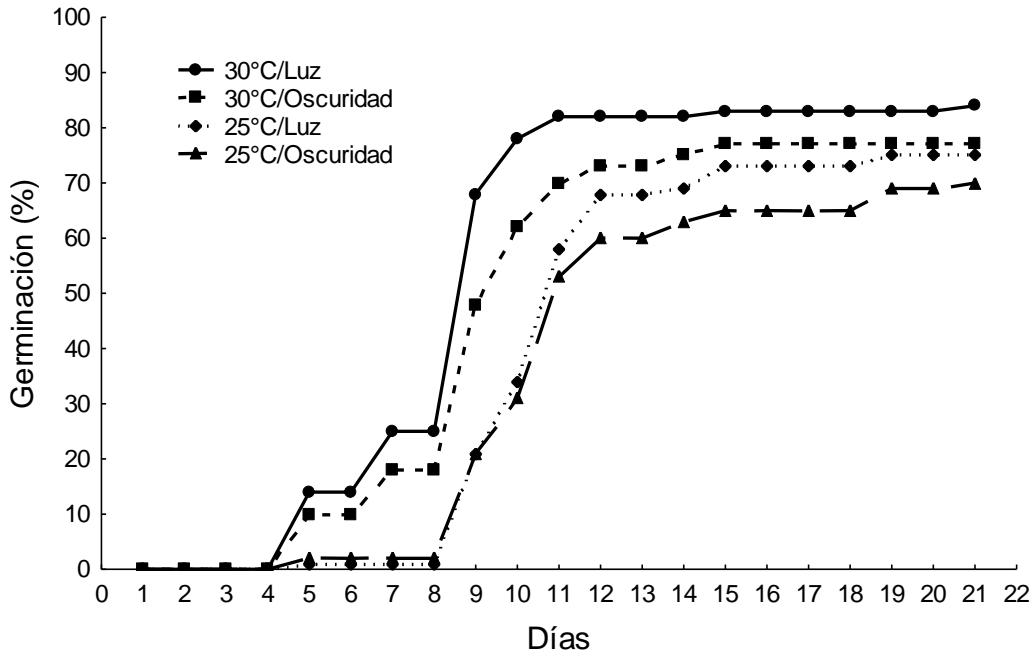


Figura 7. Curva de germinación acumulada de semillas de *G. sanctum* para los diferentes tratamientos de temperatura y luz.

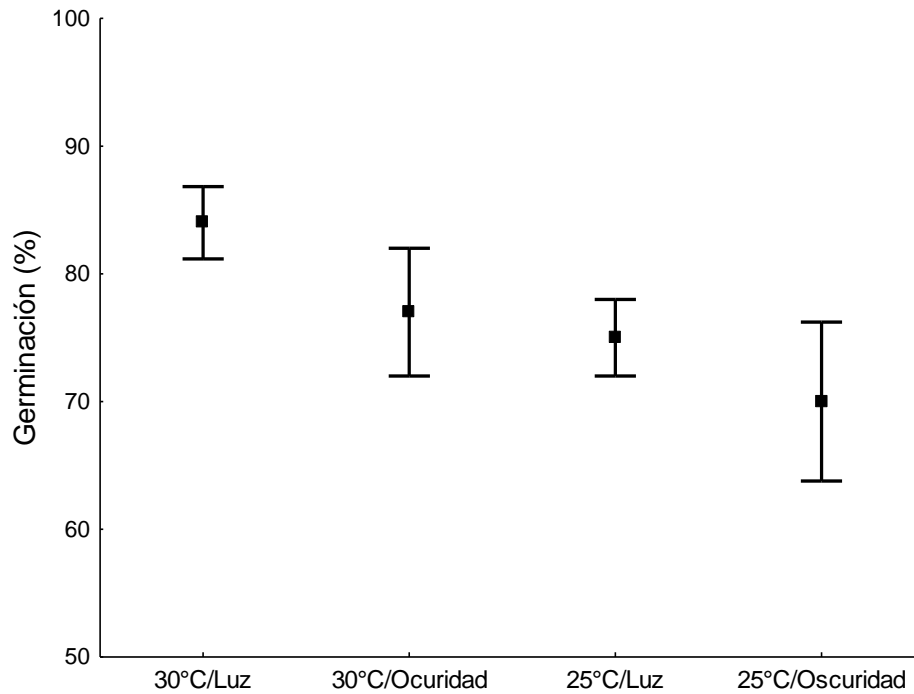


Figura 8. Porcentajes finales de germinación de *G. sanctum* para los diferentes tratamientos de temperatura y luz. Los cuadros corresponden a la media y las barras al error estándar.

Cuadro 3. Porcentaje de semillas germinadas, índice de germinación y coeficiente de velocidad para los diferentes ensayos de luz, temperatura y estrés hídrico en las semillas del Lote con un mes de almacenamiento de *G. sanctum* durante un periodo de 21 días. Los valores representan la media y su desviación estándar.

Tratamiento	Semillas No Germinadas (%)	Semillas Germinadas (%)	Mortalidad de Plántulas (%)	Índice de Germinación (IG)	Coficiente de velocidad (CV)
30°C/Luz	16	84	11.9	17.64 ± 1.18	20
30°C/Oscuridad	23	77	12.9	16.17 ± 2.1	20
25°C/Luz	25	75	10.6	15.75 ± 1.26	20
25°C/Oscuridad	30	70	14.2	14.70 ± 2.61	20
0 MPa	34	66	10.6	13.86 ± 4.48	20
-0.2 MPa	40	60	26.6	12.60 ± 1.18	11.1
-0.5 MPa	91	9	66.6	1.89 ± 2.2	8.3
-1.1 MPa	95	5	80.0	1.05 ± 1.59	4.7

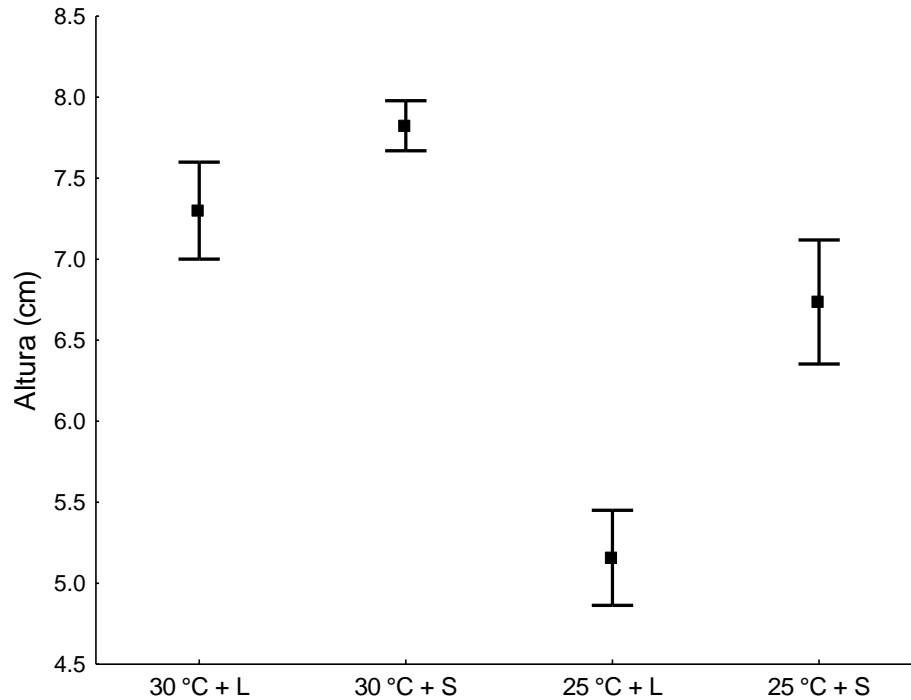


Figura 9. Altura de las plántulas de *G. sanctum* en el ensayo de luz y temperatura antes del trasplante (n=28). Los cuadros corresponden a la media y las barras al error estándar.

Efecto del estrés hídrico en la germinación de *Guaiacum sanctum*

Las semillas que germinaron bajo los tratamientos de estrés hídrico a 0 MPa y -0.2 MPa presentaron curva en forma de “S” pero a valores de -0.5 y -1.1 MPa la curva asemejó una recta con valores cercanos a 0% de germinación (Figura 10). Se encontró que existe diferencia significativa (KW = 11.54; p = 0.009) entre la germinación de semillas de *G. sanctum* a potenciales hídricos, se observó que a valores de -0.5 y -1.1 MPa los porcentajes de germinación son menores a 10%, mientras que a potenciales de 0 y -0.2 MPa se obtuvieron porcentajes entre 66% y 60%, respectivamente (Figura 11), mostrando que el vigor de las semillas bajo estrés hídrico es menor a potenciales hídricos más negativos. Se detectó una relación moderadamente fuerte entre la germinación y el potencial hídrico del sustrato de acuerdo al coeficiente de Spearman, con un ajuste del modelo que explica el 66% de la variabilidad en el porcentaje de germinación ($r = 0.81$; $p = 0.0001$; $r^2 = 0.66$), el cual generó la siguiente ecuación: $y = 61.7391 + 59.4203*x$, siendo mayor la germinación en condiciones de alta disponibilidad de humedad (Figura 12). La germinación bajo estrés

hídrico en los tratamientos a -0.5 y -1.1 MPa presentó los valores más bajos del índice de germinación (entre 2 y 1), mientras que a 0 y -0.2 MPa el valor del índice fue entre 13 y 12; por otro lado, la velocidad de emergencia fue menor conforme disminuía el potencial hídrico (cuadro 3).

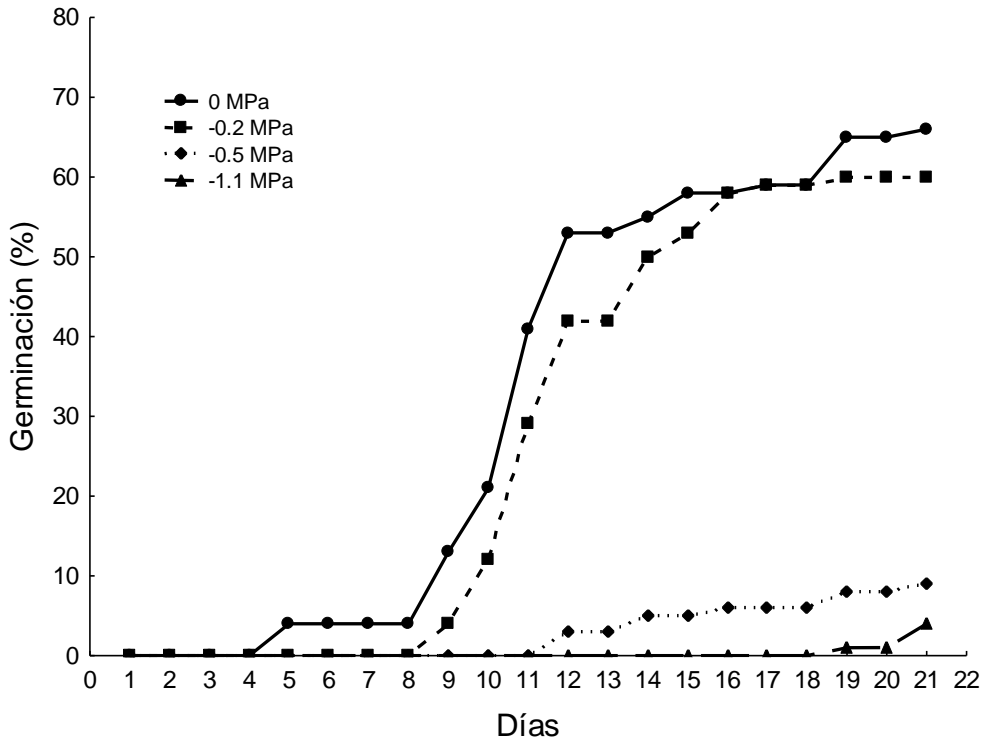


Figura 10. Curva de germinación acumulada de semillas de *G. sanctum* con diferentes tratamientos de estrés hídrico (MPa).

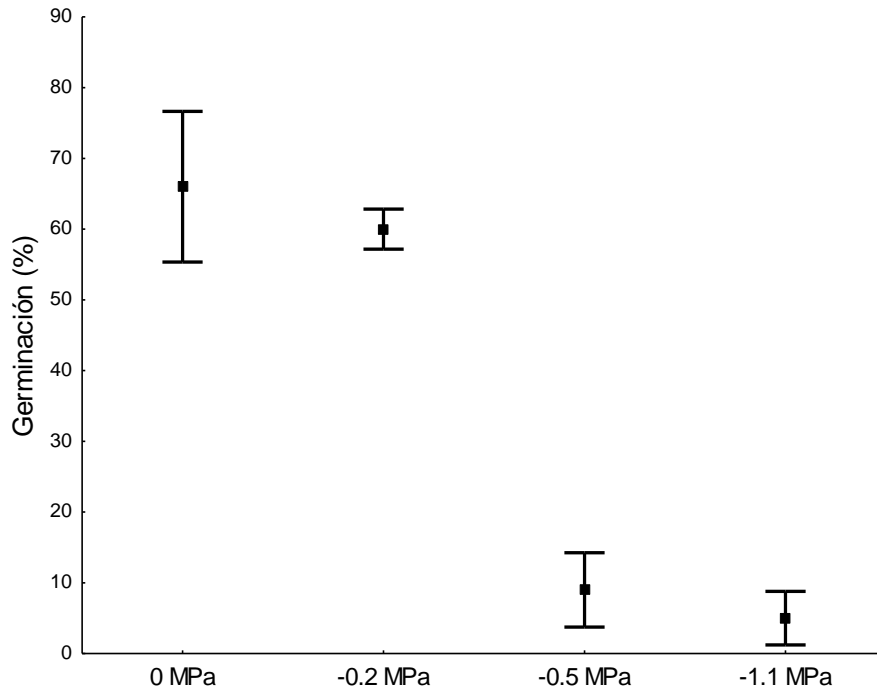


Figura 11. Porcentajes finales de germinación de *G. sanctum* para diferentes tratamientos de estrés hídrico (MPa). Los cuadros corresponden a la media y las barras al error estándar.

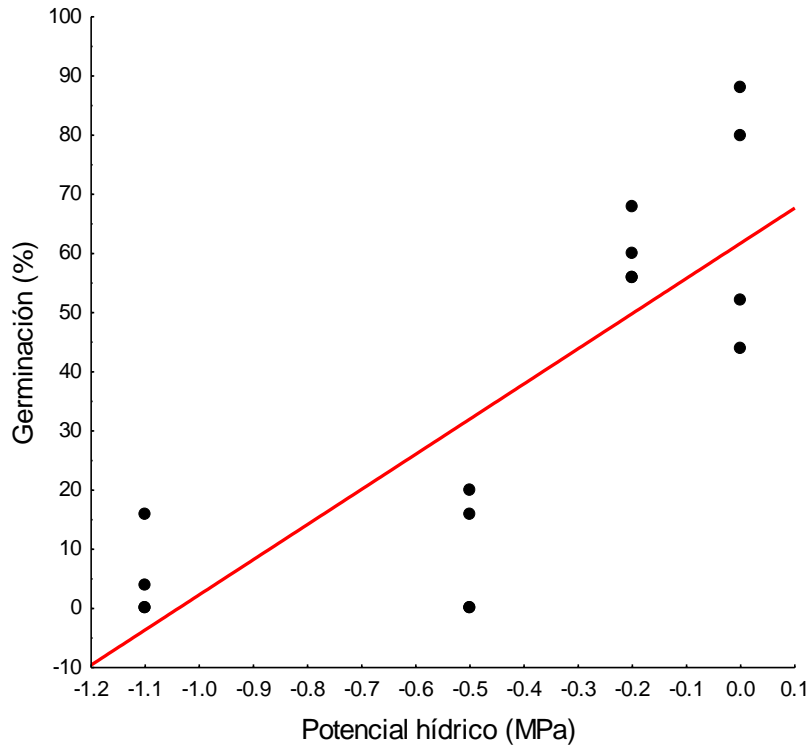


Figura 12. Regresión lineal entre el porcentaje de germinación y el potencial hídrico (ψ) (MPa) del sustrato (n=16; $p < 0.001$; $r^2 = 0.66$) ($y = 61.7391 + 59.4203 \cdot x$).

Mortalidad de plántulas

La tasa final de mortalidad fue de 66 plántulas por cada 1000 en un periodo de 60 días, este valor representa un 6,6% de mortalidad para *G. sanctum*. Se registró una baja mortalidad de plántulas después de una semana del trasplante en los recipientes individuales colocados en el laboratorio y posterior a ese periodo no se observó mortalidad.

5. Discusión

Morfometría y peso de semillas de *Guaiacum sanctum*

El tamaño de las semillas analizadas de *G. sanctum* concuerda con lo informado por González-Rivas, Tigabu, Castro-Marín y Odén (2009) y Jiménez et al. (2010) para la especie, aproximándose a 10 mm de largo y 5 mm de ancho; sin embargo, el número de semillas por kilogramo reportado por estos últimos autores es menor a la obtenida en este estudio, con alrededor de 5 000 semillas/kilo. El tamaño entre las semillas de los lotes colectados de *G. sanctum* en los diferentes años no fue diferente estadísticamente, por lo cual se puede descartar que el tamaño de las semillas haya tenido un efecto sobre la germinación y más bien estas diferencias en tamaño y peso podrían ser atribuidas a la pérdida de humedad producto del tiempo de almacenamiento entre los lotes (Magnitskiy & Plaza, 2007).

Asimismo, las diferencias en el peso de los lotes podría ser causado por el manejo y secado de las semillas, por la madurez de las semillas y las características genética de los individuos progenitores (Hoekstra et al. 1986). La variación en el tamaño y morfología de la semilla juega un función importante en la germinación y desarrollo de las plántulas; según algunos autores, semillas más pesadas exhiben un mayor porcentaje en su germinación que semillas más livianas (Ayala-Cordero et al., 2004; Andreu et al., 2006; Lobos et al., 2008).

Contenido de humedad, viabilidad y germinación de semillas almacenadas

El contenido de humedad encontrado entre los tres lotes de semillas de guayacán varió muy poco, menos de un 3% de contenido de humedad, a pesar de ello, la viabilidad, la germinación y el vigor se vieron afectados negativamente en los lotes con 12 meses y 24 meses de almacenamiento con alrededor de 12% de contenido de humedad en sus semillas. En contraste, las semillas con aproximadamente 15% de contenido de humedad con 1 mes de almacenamiento, presentaron mayor viabilidad y germinación con porcentajes de 67,5% y 84%, respectivamente. En un estudio realizado por Espinoza-Ocaña & Orantes-García (2014) se evaluó gradualmente la viabilidad de semillas de *G. sanctum* con TZ durante un periodo de 1 a 8 meses y los resultados demostraron que los embriones mantienen una

viabilidad alta durante los primeros 6 meses y al séptimo mes la viabilidad tendió a disminuir cerca del 90%.

Magnitskiy y Plaza (2007) sugieren que el contenido de humedad en las semillas es un factor crucial para el almacenamiento, viabilidad y germinación de las plantas. Las semillas ortodoxas resisten una desecación de hasta 5% en su contenido de humedad; por otro lado, las semillas que soportan la deshidratación entre 10% y 12,5% de contenido de humedad se consideran intermedias y las que toleran un secado entre 15% y 50% de humedad se catalogan como recalcitrantes (Farrant et al., 1993; Magnitskiy & Plaza, 2007).

Basándonos en esta última clasificación de contenido de humedad, las semillas de *G. sanctum* presentan un comportamiento recalcitrante, ya que con un contenido de humedad cercano al 15% se obtuvieron porcentajes de germinación por arriba del 80%; además al aproximarse su contenido de humedad cerca del 12% se obtuvo una viabilidad y germinación menor al 20%; sin embargo, se deben realizar estudios sobre la viabilidad y germinación ajustando diferentes contenidos de humedad para llegar a esta conclusión. Estos resultados sugieren que el contenido de humedad crítico que toleran las semillas de *G. sanctum* sin comprometer su viabilidad y germinación es alrededor del 15% de humedad; además estos datos evidencian un efecto negativo del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de humedad.

En otra especie de árbol tropical nativa de Costa Rica, el roble de sabana (*Tabebuia rosea* (Bignoniaceae) Bertol D.C.), se ha encontrado que el tiempo de almacenamiento y el contenido de humedad tienen un efecto negativo en la viabilidad y germinación, presentando valores bajos de viabilidad en niveles de contenido de humedad mayores a 10%, mientras que valores menores de 10% contenido de humedad y almacenados a una temperatura de -1°C , se obtuvo la mayor germinación, sugiriendo un comportamiento ortodoxo para estas semillas (Piedrahita, 1987).

En el caso de las semillas recalcitrantes no se experimenta una deshidratación en la planta madre como ocurre en las ortodoxas; además, sin interrumpir su desarrollo, las recalcitrantes tienden a germinar directamente (Farrant et al., 1993), aun cuando pueden producirse casos de latencia (Berjak & Pammenter, 2004). Por el contrario de las semillas ortodoxas, las recalcitrantes se dispersan en una condición húmeda y metabólicamente activa, perdiendo su capacidad germinativa rápidamente al quedar expuestas a condiciones

de baja humedad en el ambiente (Leprince, Hendry & McKersie, 1993; Kainer et al., 1999; Kermodé & Finch-Savage, 2002). En el caso de *G. sanctum* la diseminación ocurre con la semilla envuelta en un arilo rojo carnosos, el cual facilita su dispersión por animales (Wendelken & Martin, 1987; Jiménez et al., 2010).

Todas las semillas difieren en sus mecanismos y procesos de desecación; además, las condiciones de temperatura y humedad relativa de almacenamiento también actúan diferente en la longevidad de las semillas (Buitrago-Rueda et al. 2004). La diferencia a la sensibilidad en la deshidratación entre semillas recalcitrantes de diversas plantas es claramente evidenciado por sus distintas respuestas cuando se les aplica el mismo régimen de secado, ya que algunas especies toleran solamente un ligero grado de desecación, aunque otras perduran a contenidos de agua mucho menores (Berjak & Pammenter, 2004).

Existen mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en la pérdida de humedad, la sensibilidad a la deshidratación y la viabilidad en semillas recalcitrante. Algunos de estos mecanismos que presentan las semillas son la composición de azúcares y otras sustancias compatibles en el embrión y el endospermo, presencia de antioxidantes, la concentración de ácido abscísico (ABA) que influye en la síntesis de varias clases de proteínas que promueven el estado latente y la tolerancia a la deshidratación, así como las cubiertas de la semilla (testa y fruto) son importantes para la prevención de la deshidratación después de la dispersión de las semillas, funcionando como barreras mecánicas que evitan la deshidratación (Magnitskiy & Plaza, 2007), en el caso del guayacán el arilo podría funcionar como barrera mecánica que evita la deshidratación de la semillas durante su dispersión.

Por otro lado, el vigor de un lote de semillas es el resultado de la interacción de toda una serie de características de las semillas que le permiten a la planta mantener su viabilidad y permanecer en un estado de latencia para posteriormente germinar de forma normal. Pérez-García & Pita-Villamil (2001) mencionan características como lo son la constitución química y genética, las condiciones ambientales y nutricionales a que ha estado sometida la planta madre durante el periodo de formación, el grado de madurez, el tamaño, el peso y la densidad de la semilla, la integridad mecánica, el grado de deterioro y envejecimiento del embrión; y además, la contaminación por organismos patógenos puede influir en el vigor de semillas.

Es muy probable que muchos de los factores mencionados anteriormente hayan influido en la germinación y el vigor de los diferentes lotes de *G. sanctum*, siendo los lotes con periodos de almacenamiento más largos (12 y 24 meses) los que presentaron un menor contenido de humedad, germinación y vigor en sus semillas, y además, exhibieron mayor grado de contaminación por hongos a pesar de haber sido aplicado el agente fungicida.

Cabe mencionar que se observó una mayor viabilidad y germinación en el experimento con semillas frescas que en las semillas almacenadas por más tiempo, lo cual puede ser tomado en cuenta como un indicador relacionado a su viabilidad. Al transcurrir el tiempo de almacenamiento, los embriones consumen las reservas en las semillas y, además se deterioran las enzimas que intervienen en el proceso de germinación, afectando tanto el vigor como la tasa como el porcentaje final de germinación (Bewley & Black, 1994; Shafii & Price, 2001).

Efecto de la temperatura y luz en la germinación de semillas de *Guaiacum sanctum*

González-Rivas et al. (2009) evaluaron la germinación de semillas de tres especies de árboles tropicales de bosque seco a temperatura constante de 20, 25, 30 y 35 °C, las especies fueron *C. odorata*, *G. sanctum* y *Calycophyllum candidissimum* (Vahl) DC. (Rubiaceae) y encontraron que la germinación de *C. candidissimum* fue significativamente mayor en condiciones de luz que sombra; mientras que para *C. odorata* y *G. sanctum* presentaron una gran variación en condiciones de luz y sombra, siendo más importante la temperatura en la germinación para estas dos últimas especies. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los encontrados en el trabajo de González-Rivas et al. (2009) ya que las semillas de *G. sanctum* germinaron tanto en condiciones de luz como de oscuridad, no obstante el porcentaje de germinación y vigor fue mayor a una temperatura más elevada.

A pesar de encontrar diferencias en los porcentajes de germinación entre las temperaturas de 25°C y 30°C, no se encontró diferencia entre la germinación de semillas de *G. sanctum* en condiciones de luz y oscuridad, lo cual indicaría que las semillas presentan una respuesta fotoblástica neutral, ya que la germinación no se vio favorecida por la presencia o ausencia de luz (Lindow-López et al., 2018), sino por el aumento en la temperatura como se mencionó anteriormente.

El porcentaje de germinación obtenido a 30 °C fue mayor que el esperado en la prueba de TZ con base en la prueba de Chi-cuadrado, mientras que a 25 °C la germinación obtenida fue muy similar a lo esperado en la prueba de TZ. El índice de germinación demuestra que los ensayos con temperatura de 30°C las semillas germinaron con un mayor vigor independientemente de la condiciones de luz. Se ha demostrado en otras especies de plantas que la temperatura juega un papel muy importante en activación de enzimas en el proceso de la germinación (Bewley & Black, 1994; Shafii & Price, 2001), por lo cual la temperatura influyó en el vigor y los porcentajes finales de germinación para *G. sanctum* y es muy probable que algunos embriones con daños leves fueran capaces de germinar bajo esas condiciones (Bewley & Black, 1994).

Los porcentajes de germinación para *G. sanctum* con semillas frescas (1 mes) en este estudio revelan una germinación media de 60-80%. En otros árboles tropicales nativos del país como el Copalchí (*Croton niveus* Jacq.) (Euphorbiaceae) (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2015c), el Cirrío rojo (*Mauria heterophylla* Kunth) (Anacardiaceae) (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2015b) y el Dama (*Citharexylum donnell-smithii* Greenm) (Verbenaceae) (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2016) se han reportado porcentajes de germinación similares con valores entre 60-80%, presentando variaciones considerables entre repeticiones y la germinación es muy heterogénea iniciando entre los días 9-40 después de la siembra. Al comparar el tiempo de germinación del guayacán con otras especies forestales, este es relativamente más rápido con un periodo corto de germinación entre 5-10 días y obteniendo su máximo vigor entre los días 8 y 14 días posterior a la siembra. Por ejemplo, en la Caoba la emergencia de la raíz en la germinación se experimenta entre 40 a 78 días (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2008), en el Cenízaro entre 14-36 días después de la siembra (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2014a), en la Ceiba entre 18-41 días después de la siembra (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2014b) y en el Gavilancillo entre 13-27 días (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2017).

Presentar una emergencia rápida en la germinación posee ventajas ecológicas, debido a que las especies pueden desarrollarse y establecerse antes que otras plantas que tienen una germinación más lenta y de esta manera aprovechar primero los recursos como la luz y el agua disponibles en el ambiente (Guariguata, 2000). En el caso de *G. sanctum*, es

posible que al habitar en ambientes secos su germinación esté restringida al corto periodo de lluvias donde el agua está disponible, por lo cual sus semillas poseen un gran potencial germinativo en un corto periodo de tiempo.

En muchos de los estudios sobre germinación propagativa a veces no se reportan las curvas de germinación, las cuales son muy importantes para analizar la germinación a través del tiempo (Shafii, Price, Swensen & Murray, 1991). Las curvas de germinación permiten evaluar el vigor de distintos lotes de semillas y tratamientos experimentales a diferencia de los porcentajes de germinación, por ello es importante evaluar el vigor y la calidad de las semillas ya que estas pueden describir el comportamiento de la germinación de los lotes y semillas en el tiempo (Shafii, Price, Swensen & Murray, 1991).

Las curvas de germinación acumulada para los ensayos de luz y temperatura presentaron una forma en “S” llamada curva sigmoidea. De acuerdo a Tseng & Hsu (1989) y Ritz, Phipper & Streibig (2013), este tipo de curvas en la germinación se caracterizan por las siguientes tres fases: 1) Fase de retardación - ocurre cuando los embriones comienzan activar las enzimas durante el proceso de germinación y a medida que se desarrolla el embrión se van consumiendo las reservas de la semilla, 2) Fase logarítmica - en ella el crecimiento se da rápidamente y de forma lineal, y 3) Fase de establecimiento - el crecimiento comienza a decrecer disminuyendo por ende número de semillas germinadas. Se ha reportado especies de árboles que presentan este tipo de curva, como el abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Lindl.) Carrière) (Pinaceae) el cual alcanzó su máximo vigor entre los días 7-14 y su capacidad germinativa se encuentra entre los 75% y 86% (Mápula-Larreta, López-Upton, Vargas-Hernández & Hernández, 2008). Asimismo, la palma *Socratea exorrhiza* (Martius) Wendland (Arecaceae) presentó este tipo de comportamiento sigmoideal en su germinación; sin embargo, su germinación fue más lenta iniciando aproximadamente al día 59 (Bocanegra-Torres, 2010). Este tipo de comportamiento concuerda con el experimentado en este estudio para *G. sanctum* en un periodo de 21 de germinación.

Por otra parte, el crecimiento en altura de las plántulas de *G. sanctum* fue mayor en condiciones de oscuridad que en condiciones de luz durante el periodo de germinación; sin embargo, a temperatura de 30°C se registró un crecimiento hasta de 9 cm, mientras que en condiciones de luz a 25°C las plántulas crecieron en un rango de 4 - 6 cm de altura.

Probablemente estas diferencias en alturas son explicadas por la etiolación de las plántulas. La etiolación es un proceso que ocurre durante el crecimiento de las semillas o plantas en condiciones de oscuridad y se caracteriza por la carencia tanto de clorofila como de desarrollo de los cloroplastos, además por el alargamiento del tallo y por la escasez de lignificación (Rogel-Castellanos, Muñoz-Pérez & Cruz-Castillo, 2000). Estas características fueron evidentes en las plántulas de *G. sanctum* en el ensayo de oscuridad donde las plantas presentaron mayor altura de los vástagos durante las primeras semanas. En plantas de tomate se encontró el mismo patrón que en este trabajo, con un mayor crecimiento de altura y área foliar en condiciones de sombra que en luz, y por la carencia de clorofila consecuencia de la etiolación (Páez, Paz & López, 2000). Por otro lado, González-Rivas y colaboradores (2009) encontraron que el crecimiento de plantas jóvenes de *G. sanctum* se ve favorecida en áreas abiertas con un aumento significativo en el diámetro de las raíces. En este trabajo no se observó un crecimiento significativo de los arbolitos de guayacán, ya que durante un periodo de 60 días no se encontró diferencia en el crecimiento semanal en altura de las plántulas y tampoco en el número de foliolos nuevos por individuo, coincidiendo con López-Toledo, Burslem, Martínez-Ramos & García-Naranjo (2008) que describen un crecimiento muy lento para especie, debido al crecimiento lento de las células de la planta esto provoca que la especie posea una alta densidad de la madera (1.12-1.35 densidad específica) (Jiménez 2002).

Efecto del estrés hídrico en la germinación de semillas de *Guaiacum sanctum*

El estrés hídrico afectó de manera negativa el vigor y la germinación de las semillas sometidas a potenciales hídricos de -0.5 MPa y -1.1 MPa, los cuales presentaron porcentajes de germinación por debajo del 20% y con una emergencia de la radícula más lenta que en los otros ensayos, tal como lo demostró el coeficiente de velocidad de germinación. En varios experimentos se ha determinado que la mayoría de plantas son sensibles a cierto grado de estrés hídrico durante la germinación presentando una disminución en los porcentajes finales, en todos los casos analizados el vigor de las semillas también ha sido afectado; disminuyendo la velocidad de emergencia de la plántula, tanto de la raíz como del tallo (Biasutti & Galiñanes, 2001; Harsh, Bohra, Khan, & Tewari,

2004; González, Argente, Zaldívar & Ramírez, 2005; Rodríguez-Rivera, Sosa, Fernández, Reale & Villarreal, 2007; Rodríguez-Morales, Guillén & Casas, 2013).

En ensayos con maíz (*Zea mays* L., Poaceae) el porcentaje de germinación difiere aproximadamente un 80% en semillas que fueron sometidas a estrés hídrico de -1.5 MPa y el control (0 MPa) (Biasutti & Galiñanes, 2001). En *Bulnesia retama* (Gill. ex. Hook.) Griseb. (Zigophyllaceae), se presentó porcentajes de germinación cercanos al 50% a -1.0 MPa y a -1.5 MPa la germinación fue completamente inhibida, siendo una especie que tolera significativamente el déficit hídrico (Rodríguez-Rivera et al., 2007). *Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob (Cactaceae) es una especie más sensible al estrés hídrico ya que la germinación a potenciales hídricos de -0.2 MPa disminuye más de un 40% en comparación del control, y a valores de -0.6 y -0.8 MPa la germinación es menor al 5% (Rodríguez-Morales et al., 2013). Estos últimos resultados se aproximan a los encontrados en el presente estudio, ya que las semillas de *G. sanctum* presentaron porcentajes de germinación muy bajos a potenciales de -0.5 y -1.1 MPa, lo cual sugiere que esta especie es sensible al estrés hídrico y la sequía en el momento de la germinación.

Efectos negativos asociados al estrés hídrico están relacionados con el crecimiento y alargamiento de las células, además de las relaciones hídricas en la planta (hojas, tallos y raíces), la transpiración y la asimilación de minerales (Farooq, Hussain, Wahid & Siddique, 2012), como respuesta a la falta de agua la planta cierra sus estomas para disminuir la pérdida de agua, no obstante esto genera un cese de la fotosíntesis ya que la planta no puede asimilar CO₂ (Jaleel et al., 2009). En consecuencia, las plantas han desarrollado distintas respuestas para sobrellevar al estrés hídrico y la sequía, algunas adaptaciones se presentan tanto en la anatomía como la fisiología, entre ellos: disminución del área foliar, aumento del sistema radicular y cambios en la concentración de los pigmentos fotosintéticos (Jaleel et al., 2009). Los cambios en los pigmentos fotosintéticos son de suma importancia para la tolerancia al estrés hídrico y la sequía, especialmente la generación de pigmentos carotenoides y antioxidantes (Anjum et al., 2011). Desarrollar este tipo de estrategias es indispensable para las plantas ya que les permite sobrevivir en condiciones adversas aunque posea efectos negativos (Jaleel et al., 2009). Es importante evaluar la sensibilidad al estrés hídrico y la sequía en plantas durante la germinación y el establecimiento ya que existen muchas especies, principalmente árboles, que se desconoce su respuesta ante este estrés

abiótico y que cada día toma más relevancia por los efectos del calentamiento global, el cual podría generar una gran mortalidad de plántulas durante la germinación producto de la disminución en las precipitaciones (García-Fayos et al., 2000).

Mortalidad y establecimiento de plántulas

La mortalidad de plántulas fue mayor durante el periodo de germinación que el periodo de establecimiento (Cuadro 3), principalmente en los tratamientos de estrés hídrico donde la mortalidad de plántulas alcanzó valores entre 10 - 80% causado posiblemente por el estrés hídrico posterior a la germinación y por la presencia de hongos patógenos en las testas que infectaron las plántulas. En los ensayos de luz y temperatura la mortalidad registrada fue entre 11 y 14%, respectivamente, con menor presencia de contaminación. En muchos experimentos clásicos de germinación no se evalúa o se reporta la sobrevivencia a posteriori de las plantas, lo cual es importante ya que las plántulas durante la germinación y la fase de establecimiento pueden morir a causa de la competencia intraespecífica y/o por la incidencia de patógenos como bacterias y hongos que crecen en la testa o el sustrato y causan daños o inclusive la muerte (Valverde-Cerdas, Rojas-Vargas & Hine-Gómez, 2008; Billard et al., 2014; Montiel-Frausto, Enríquez del Valle & Cisneros, 2016).

En una investigación de propagación *in vitro* con semillas de *G. sanctum* se reportaron porcentajes variables de germinación y mortalidad de embriones mediante el método de embriogénesis, obteniendo porcentajes de germinación entre 5-30% y un grado de contaminación que varió entre 2.5-75% (Valverde-Cerdas et al., 2008). En diversos ensayos de propagación *in vitro* de plantas se han registrado porcentajes variables de contaminación desde 0 hasta 100%, relacionados con el tipo de desinfección utilizada y el tipo de explante, siendo efectivo el método de embriogénesis de semillas inmaduras para algunas especies de árboles y orquídeas (Prehn, Serrano, Berrios, & Arce-Johnson, 2003; Valverde-Cerdas et al., 2008; Montiel-Frausto et al., 2016). En estos ensayos de propagación los autores sugieren la presencia de microorganismos endógenos en las plantas que podría causar estas altos índices de contaminación, lo cual podría ser la causa de la contaminación en semillas de *G. sanctum* observado en este estudio. Por lo tanto, se debe trabajar en desarrollar nuevas técnicas de desinfección y mejorar los rendimientos.

La tasa de mortalidad de las plántulas en los recipientes individuales en el laboratorio fue de 6,67%, registrándose un porcentaje de 4% de individuos muertos durante los primeros siete días. La causa de la mortalidad durante el trasplante varía y depende de varios factores como el tamaño de la plántula, la densidad, el tipo de trasplante, la edad de las plántulas y del tejido blando requerido para su rápido desarrollo (Kitajima & Fenner, 2000). Se ha demostrado en experimentos de campo y laboratorio que el trasplante tiene un efecto positivo en las plántulas ya que disminuye la competencia y aumenta la supervivencia y crecimiento; además se menciona que el sustrato y la intensidad lumínica pueden influir en el establecimiento de las plantas (Harms, Wright, Calderón, Hernández & Herre, 2000; Montemayor-Trejo et al., 2006; Negreros–Castillo, Apodaca–Martinez & Mize, 2010; Fuchs et al., 2013). Por ejemplo, Casanova, Ramírez y Solorio (2007) y Negreros–Castillo y colaboradores (2010) mencionan que el aumento de la densidad y la competencia en plántulas de cedro, caoba y roble tienen un efecto negativo en el desarrollo de las raíces, el área foliar específica, el diámetro y la altura; mientras que si aplica un trasplante y se disminuye la densidad la probabilidad de supervivencia es mayor entre las plántulas, como probablemente ocurrió con el ensayo de *G. sanctum* ya que la mortalidad fue cercana al 7% y se obtuvo una alta supervivencia.

6. Conclusiones

Con los resultados de esta investigación se puede concluir que el almacenamiento de semillas a 12 y 24 meses a una temperatura ambiente promedio de 25 °C ejerce un efecto negativo en la germinación de semillas de *G. sanctum* incidiendo en la viabilidad de embriones y en los porcentajes finales de germinación.

Las semillas de *G. sanctum* podrían clasificarse con un comportamiento recalcitrante ya que el almacenamiento de sus semillas durante más de 12 meses a temperatura ambiente generó porcentajes de viabilidad y germinación muy bajos. Además, los resultados encontrados demuestran que el contenido de humedad crítico que toleran las semillas de *G. sanctum* sin comprometer su viabilidad y germinación es cerca del 15%.

Los experimentos de germinación demostraron una emergencia relativamente rápida de las plántulas y una germinación media entre 60-80% de semillas, similar a lo reportado para otras especies de árboles de interés forestal y comercial nativos de Costa Rica.

La temperatura jugó un papel más importante en la germinación que las condiciones de luz. *G. sanctum* exhibe una germinación epígea y una respuesta fotoblástica neutral en el comportamiento de su germinación, desarrollándose la plántula en mayor grado a temperaturas cercanas a 30 °C independientemente de las condiciones de luz.

En los experimentos en condiciones de 30°C se obtuvieron mayor vigor y porcentaje de germinación reflejándose en un mayor valor del índice de germinación.

El estrés hídrico simulado influyó negativamente en la germinación y las semillas demostraron una clara sensibilidad durante este proceso.

La mortalidad de las plántulas germinadas fue mayor durante el periodo de germinación que durante el periodo de establecimiento individual después del trasplante.

El crecimiento de las plántulas durante el periodo de germinación fue significativamente mayor en condiciones de oscuridad independientemente de la temperatura, generando plantas con tallos más largos que en condiciones de luz, esto último causado por efecto de la etiolación de las plántulas durante el experimento de oscuridad.

7. Recomendaciones

Es recomendable experimentar con la germinación y viabilidad de semillas de *G. sanctum* almacenadas en diferentes condiciones de laboratorio, ya que estas prácticas podrían determinar mejores condiciones de almacenamiento de su germoplasma.

Es preciso desarrollar estudios sobre el almacenamiento en diferentes contenidos de temperatura y humedad, ya que uno de los principales desafíos en el almacenamiento de semillas tropicales a largo plazo es evitar la pérdida de viabilidad, por lo cual se requiere conocer a profundidad las condiciones óptimas de almacenamiento, campo de estudio aún por explorar mediante investigación práctica para muchas especies de árboles y plantas tropicales, especialmente con aquellas en estado amenazado o en peligro de extinción.

Es necesario e importante registrar el contenido de humedad de las semillas posterior a la cosecha hasta su siembra y, de esta manera cuantificar la pérdida de humedad en función del tiempo ya que este factor influye en la viabilidad y la germinación.

Es necesario desarrollar distintos métodos de desinfección para evitar la presencia de patógenos en los estudios de propagación de plantas, ya que estos pueden ejercer un efecto negativo indirectamente en la germinación.

Además, sería interesante desarrollar ensayos de fertilización e inoculación de microorganismos como hongos micorrízicos y algas cianófitas para evaluar su efecto simbiótico en el crecimiento y desarrollo de los árboles, esto con el fin de obtener mejores rendimientos en el crecimiento en condiciones de vivero.

Asimismo, se recomienda aumentar los esfuerzos de conservación e incluir a la especie estudiada en programas de reforestación y restauración de bosque seco, con el objetivo de establecer nuevas poblaciones ya que el número de árboles en estado natural es muy bajo, además su distribución es limitada a ciertas áreas de la provincia de Guanacaste y principalmente reportada en áreas silvestres protegidas.

8. Bibliografía

- Alves, M.M, Alves, E. U., Rodrigues de Araújo, L., dos Santos Lima M. L. & Ursulino, M. M. 2018. Germination and vigor of *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. seeds under different light and temperature conditions. *Ciência Rural*, 48 (8), 1-7. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170741>
- Andrade, A.C.S., Cunha, R., Souza, A.F., Reis, R.B. & Almeida, K.J. 2003. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree *Eugenia dysenterica* DC. *Seed Sci. Tech.*, 31, 125-137.
- Andrade-Rodríguez, M., Ayala-Hernández, J. J, Alia-Tejacal, I., Rodríguez-Mendoza, H., Acosta-Durán, C. M. & López-Martínez, V. 2008. Efecto de promotores de la germinación y sustratos en el desarrollo de plántulas de papayo. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 25 (4), 617-635.
- Andreu, L. G. I., Mora, I. & Martínez, J. L. C. 2006. Morfometría, viabilidad y variabilidad de las semillas de la población de *Pinus hartwegii* del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Cuadernos de biodiversidad: publicación cuatrimestral del Centro Iberoamericano de la Biodiversidad*, 19, 14-18.
- Anjum, S. A., X. Y. Xie, L. C. Wang, M. F. Saleem, C. Man, & W. Lei. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026-2032.
- AOSA. 1997. Rules for testing seeds. *Association of Official Seed Analysts*, Beltsville.
- Arif, M., Jan, M. T., Mian, I. A., Khan, S. A., Hollington, P. & Harris, D. 2014. Evaluating the impact of osmopriming varying with polyethylene glycol concentrations and durations on soybean. *International Journal of Agriculture & Biology*, 16 (2), 349-364.
- Augspurger, C. K. 1979. Irregular rain cues and the germination and seedling survival of a Panamanian shrub (*Hybanthus pruniifolius*). *Oecologia*, 44, 53-59.
- Ayala-Cordero, G., Terrazas, T., López-Mata, L. & Trejo, C. 2004. Variación en el tamaño y peso de la semilla y su relación con la germinación en una población de *Stenocereus beneckeii*. *Interciencia*, 29 (12), 692-697.

- Baskin, C.C. & Baskin, J.H. 1998. Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination, Academic Press, San Diego.
- Benito-Matías, L. F., Sierra, N. H., Jiménez, I., & Rubira, J. P. 2004. Aplicación de métodos colorimétricos para la determinación de la viabilidad en semillas de *Pinus pinea*: Test de Tetrazolio e Índigo Carmín. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 17, 23-28.
- Berjak, P. & Pammenter, N. 2004. Recalcitrant seeds. En: Benech-Arnold, R. y R. Sánchez (eds.). Handbook of seed physiology. Food Products Press, New York. pp. 305-345.
- Betancourt Barroso, A. 1987. Silvicultura especial de árboles maderables tropicales. Havana, Cuba. Editorial Científico-Técnico. 427p.
- Bewley, J.D. & Black, M. 1982. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Viability, dormancy and environmental control*. Vol. II Springer-Verlag, Berlín. 375 p.
- Bewley, J.D. & Black, M. 1994. Seeds. Physiology of development and germination, 2nd ed, Plenum Press, New York.
- Biasutti, C.A. & Galiñanes, V.A. 2001. Influencia del ambiente de selección sobre la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) bajo estrés hídrico. Relaciones entre caracteres de plántula con el rendimiento a campo. *Agriscientia*, 18, 37-44
- Billard, C. E., Dalzotto, C. A. & Lallana, V. H. 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica*, 38, 145-157.
- Bisigato, A.J. & Bertiller, M.B. 1999. Seedling emergence and survival in contrasting soil microsites in Patagonian Monte shrubland. *Journal of Vegetation Science*, 10, 335-342.
- Bocanegra-Torres, L. 2010. Ensayo de germinación de *Socratea exorrhiza* (Martius) Wendland, con cuatro sustratos y dos tipos de tinglado. (Tesis de Licenciatura). Escuela de Ingeniería Forestal, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú.
- Bravo, C. F., Urdaneta, N., Silva, W., Poliszuk, H. & Marín, M. 2006. Germinación de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv 'Río Grande sembradas en

- bandejas plásticas, utilizando distintos sustratos. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23 (2), 188-195.
- Buitrago-Rueda, N., Ramírez-Villalobos, M., Gómez-Degraves, A., Rivero-Maldonado, G. & Perozo-Bravo, A. 2004. Efecto del almacenamiento de las semillas y la condición de luz postsiembra sobre la germinación y algunas características morfológicas de plantas de níspero (*Manilkara zapota* (Van Royen)(Jacq) Gill) a nivel de vivero. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 21, 343-352.
- Carvalho, S. M. C., S. B. Torres, E. C. Sousa, D. M. M. Sousa, K. T. O. Pereira, E. P. de Paiva, J. R. Matias & B. R. V. dos Santos. 2018. Viability of *Carica papaya* L. Seeds by the Tetrazolium Test. *Journal of Agricultural Science*, 10 (2), 335-340.
- Casanova, F., Ramírez, L., & Solorio, F. 2007. Interacciones radiculares en sistemas agroforestales: mecanismos y opciones de manejo. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 11 (3), 41-52.
- Castro-Montes, I. 2008. Selección *in vitro* de maíz por tolerancia al estrés osmótico (tesis de maestría). Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, México.
- Contreras, S., & Barros, M. 2005. Pruebas de vigor en semillas de lechuga y su correlación con emergencia. *Ciencia e Investigación Agraria*, 32 (1), 3-11.
- Convención Internacional para el Comercio de Especies Amenazadas (CITES). 2018. Consultado en línea el 13-5-2018 en: <https://cites.org/eng/node/17366>
- Cordero, R. A. & Di Stéfano, G. J. F. 1991. Efecto del estrés osmótico sobre la germinación de semillas de *Tecoma stans* (Bignoniaceae). *Revista de Biología Tropical*, 39, 107-110.
- Cordero, R. A., & Molano-Flores, B. 1996. Germination of *Tabebuia heterophylla* seeds (Bignoniaceae) from a wet and dry forest of Puerto Rico. *Revista de Biología Tropical*, 79-86.
- Costa, C. R. X., Pivetta, K. F. L., de Souza, G. R. B., Mazzini-Guedes, R. B., Pereira, S. T. S., & Nogueira, M. R. 2018. Effects of Temperature, Light and Seed Moisture Content on Germination of *Euterpe precatoria* Palm. *American Journal of Plant Sciences*, 9, 98-106. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.91009>

- Douterlungne, D. 2005. Establecimiento de acahuales a través del manejo tradicional lacandón de *Ochroma pyramidale* Cav. (Tesis de Maestría). El Colegio de la Frontera Sur, San Cristobal de las Casas, Chiapas, México.
- Eira, M.T.S., da Silva, E.A., de Castro, R., Dussert, S., Walters, C., Bewley, J.D. & Hilhorst, H.W. 2006. Coffee seed physiology. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18 (1), 149-163.
- Espinoza-Ocaña, L. & Orantes-García, C. 2014. Viabilidad y germinación de *Guaiacum sanctum* L. (Zygophyllaceae), árbol tropical amenazado. *LACANDONIA*, 8 (1), 37-40.
- Estrada, A., Rodríguez, A., y Sánchez, J. 2005. Evaluación y Categorización del Estado de Conservación de Plantas en Costa Rica. Museo Nacional de Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad. Sistema Nacional de Áreas de Conservación. 228p.
- Faccini, D. & Puricelli, E. 2006. Efecto de la temperatura y de la luz sobre la germinación de *Nicotiana longiflora* Cavanilles y *Oenothera indecora* Camb. *Agriscientia*, 23 (1), 15-21.
- Falusi, N., Calamasi, R. & Tocci, A. 1983. Sensitivity of seed germination on seedling root growth to moisture stress in four provenances of *Pinus halapensis* Mill. *Silvae Genetica*, 32, 4-9.
- Farrant, J.M., N.W. Pammenter y P. Berjak. 1993. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. *Seed Sci. Res*, 3, 1-13.
- Farooq, M., M. Hussain, A. Wahid, & K. H. M Siddique. 2012. Drought stress in plants: an overview. En R. Aroca (Ed). *Plant responses to drought stress*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1-33p.
- Florentine, S., Weller, S., King, A., Florentine, A., Dowling, K., Martin Westbrooke, M. & Chauhan, B.S. 2018. Seed germination response of a noxious agricultural weed *Echium plantagineum* to temperature, light, pH, drought stress, salinity, heat and smoke. *Crop & Pasture Science*, 69, 326–333.
- Florido, M., Bao L., Lara, R.M., Castro, Y., Acosta, R. & Álvarez, M. 2018. Efecto del estrés hídrico simulado con peg 6000 en la germinación en tomate (*Solanum Lycopersicon*). *Cultivos Tropicales*, 39 (1), 87-92.

- Friedman, J. 1995. Allelopathy, autotoxicity, and germination. In: Kigel J., Galili G. (eds.), Seed development and germination. Marcel Dekker, New York, pp. 629-644.
- Fuchs, E. J., & Hamrick, J. L. 2010. Genetic diversity in the endangered tropical tree, *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). *Journal of heredity*, 101 (3), 284-291.
- Fuchs, E. J. & Hamrick, J. L. 2011. Mating system and pollen flow between remnant populations of the endangered tropical tree, *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). *Conservation Genetics*, 12, 175–185.
- Fuchs, E. J., Robles, T., & Hamrick, J. L. 2013. Spatial distribution of *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae) seedlings and saplings relative to canopy cover in Palo Verde National Park, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 61 (3), 1521-1533.
- García-Fayos, P., García-Ventoso, B. & Cerdà, A. 2000. Limitations to plant establishment on eroded slopes in southeastern Spain. *Journal of vegetation Science*, 11, 77-86.
- González, L. M., Argente, L., Zaldívar, N. & Ramírez R. 2005. Efecto de la sequía simulada con PEG-6000 sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de dos variedades de trigo. *Cultivos Tropicales*, 26 (4), 49-52.
- González-Rivas, B., Tigabu, M., Castro-Marín, G. & Odén, P. C. 2009. Seed germination and seedling establishment of Neotropical dry forest species in response to temperature and light conditions. *Journal of Forestry Research*, 20 (2), 99-104.
- Grabe, D. F., Stanwood, P. C., & McDonald, M. B. 1989. Measurement of seed moisture. *Seed moisture*. 69-92p.
- Guariguata, M.R. 2000. Seed and seedling ecology of tree species in neotropical secondary forests: management implications. *Ecological applications*, 10, 145-154.
- Harms, K. E., Wright S. J., Calderón O., Hernández A. & Herre, E. A. 2000. Pervasive density-dependent recruitment enhances seedling diversity in a tropical forest. *Nature*, 404, 493-495.
- Harsh, L. N., Bohra, M. D., Khan, H.A. & Tewari, J.C. 2004. Effect of drought on seed quality and germination of *Acacia senegal* Willd. *Indian Journal of Forestry*, 27 (2), 181-185.
- Hernández-Garzón, E. 2001. Estudio poblacional de Guayacán real (*Guaiacum sanctum* L.) en el Parque Nacional Palo Verde y en Las Delicias de Garza, Guanacaste. (Tesis de

- Licenciatura en Ciencias Forestales). Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Ambientales, Heredia, Costa Rica.
- Hoekstra, P.E., Merkel, E.P. & Powers, Jr. H.R. 1986. Producción de semillas de árboles forestales. En: Semillas. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América. Editorial CECOSA. 417-428p.
- Isselstein, J., Tallowing, J.R.B. & Smith, R.E.N. 2002. Factors affecting seed germination and seedling establishment of fen-meadow species. *Restoration Ecology*, 10, 173-184.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2013. International Rules for Seed Testing. Edition 2013. Bassendorf: International Seed Testing Association. Zurich, Suiza.
- Jaleel, C. A., P. Manivannan, A. Wahid, M. Farooq, H. J. Al-Juburi, R. Somasundaram & R. Panneerselvam. 2009. Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11 (1), 100-105.
- Javaid, M.M., Florentine, S., Ali H.H. and Weller S. 2018. Effect of environmental factors on the germination and emergence of *Salvia verbenaca* L. cultivars (*verbenaca and vernalis*): An invasive species in semi-arid and arid rangeland regions. *PLOS ONE*, 13 (3), 1-20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194319>
- Jiménez, Q. 1999. Árboles maderables en peligro de extinción en Costa Rica. INBio Ed., Heredia, Costa Rica. 121 p.
- Jiménez, Q., Rojas, F., Rojas, V., & Rodríguez, L. 2002. Árboles maderables de Costa Rica: Ecología y silvicultura. INBio Ed., Heredia. 199p.
- Jiménez, Q., Rojas, F., Rojas, V. & Rodríguez, L. 2010. Árboles maderables de Costa Rica: Ecología y silvicultura. 2 Ed. INBio Ed., Heredia. 361p.
- Kainer, K., Duryeaa, M., Malavasi, M., Rodrigues da Silva, E. & Harrison, J. 1999. Moist storage of Brazil nut seeds for improved germination and nursery management. *Forest Ecol. Manag*, 116, 207-217.
- Karssen C.M. & Hilhorst W.M. 1992. Effect of chemical environment on seed germination. In: Fenner M. (ed.), Seeds. *The ecology of regeneration in plant communities*. CAB International, Wallingford. 327-348p.

- Kermode, A.R. y W.E. Finch-Savage 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: Black, M. y H.W. Pritchard, editors. *Desiccation and survival in plants. Drying without dying*. CABI Publishing. 149-184p.
- Kitajima, K. & Fenner, M. 2000. Ecology of Seedling Regeneration. In: M. Fenner (ed), *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. Wallingford: CABI Publishing, 331–359p.
- Lallana, V. H & García, L. F. 2013. Efecto de pretratamientos en la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). *Investig. Agrar.*, 15 (2), 129-132.
- Leprince, O., Hendry, G.A. & McKersie, B.D. 1993. The mechanism of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res*, 3, 231-246.
- Lima, C. B, A. C. Boaventura & T. T. Villela. 2018. Comparing procedures for performing tetrazolium test on carrot seeds. *Horticultura Brasileira*, 36, 240-245. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620180216>
- Lindow-López, L., Galíndeza, G., Aparicio-González, M., Sühring, S., Rojas-Aréchigab, M., Pritchard, H.W. & Ortega-Baes, P. 2018. Effects of alternating temperature on cactus seeds with a positive photoblastic response. *Journal of Arid Environments*, 148, 74-77.
- Lobo, M., Delgado, O., Cartagena, J. R., Fernández, E., & Medina, C. I. 2007. Categorización de la germinación y la latencia en semillas de chirimoya (*Annona cherimola* L.) y guanábana (*Annona muricata* L.), como apoyo a programas de conservación de germoplasma. *Agronomía Colombiana*, 25 (2), 231-244.
- Lobos, J., Miranda, H. & Mera, M. 2008. Weight and volume gain by hydrated grains of bitter albus lupins grown in Chile. In: J.A. Palta y J.B. Berger (eds.). *Lupins for Health and Wealth*. International Lupin Association. Canterbury, New Zealand. 105-107p.
- López-Toledo, L., Burslem, D. F., Martínez-Ramos, M., & García-Naranjo, A. 2008. Non-detriment findings report on *Guaiacum sanctum* in Mexico. In *NDF Workshop case studies*. 25p.

- López-Toledo, L., Ibarra-Manríquez, G., Burslem, D. F., Martínez-Salas, E., Pineda-García, F., & Martínez-Ramos, M. 2012. Protecting a single endangered species and meeting multiple conservation goals: an approach with *Guaiacum sanctum* in Yucatan Peninsula, Mexico. *Diversity and Distributions*, 18 (6), 575-587.
- López-Toledo, L., Ibarra-Manríquez, G., & Martínez-Ramos, M. 2013. Guayacán. *Biodiversitas*, 107, 12-16.
- Maciel, N., Bautista, D. & Aular, J. 1996. Características morfológicas del fruto y la semilla y procesos de germinación y emergencia del Níspero, *Manilkara achras* (Miller) Fosberg. *Proceedings of the Interamerican Society For Tropical Horticulture*, 40, 188- 194.
- Magnitskiy, S.V. & Plaza, G.A. 2007. Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agronomía Colombiana*, 25 (1), 96-103.
- Mápula-Larreta, M., López-Upton J., Vargas-Hernández, J. J. & Hernández A. 2008. Germinación y vigor de semillas en *Pseudotsuga menziesii* de México. *Ra Ximhai*, 4 (1), 119-134.
- Marrero, J. 1949. Tree seed data from Puerto Rico. *Caribbean Forester*, 11 (3), 107-147.
- Marrero, P., D. P. Padilla, F. Valdés & M. Nogales. 2007. Comparison of three chemical tests to assess seed viability: the seed dispersal system of the Macaronesian endemic plant *Rubia fruticosa* (Rubiaceae) as an example. *Chemoecology*, 17, 47–50.
- Martins, C., Nakagawa, J. & Alves, M. 1999. Tolerância à dessecação de sementes de palmito-vermelho (*Euterpe espirosantensis*). *Rev. Brasil. Bot.*, 22 (3), 391-396.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber A. 1989. The germination of seeds, 4th. ed. Pergamon Press, Oxford, U.K.
- Michel, B. E. 1983. Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant physiology*, 72 (1), 66-70.
- MINAE (Ministerio del Ambiente y Energía, CR). 1997. Decreto Ejecutivo N° 25700-MINAE. La Gaceta. Diario Oficial (CR). Enero. 16:9-10. (Vol. 119, no. 11. Veda de 18 especies forestales).

- Montaño-Mata, N. J. & Nuñez, J.C. 2003. Evaluación del efecto de la edad de trasplante sobre el rendimiento en tres selecciones de ají dulce *Capsicum chinense* Jacq. en Jusepín, estado Monagas. *Rev. Fac. Agron.*, 20 (2), 144-155.
- Montemayor-Trejo J. A., Zermeño-González A., Olague-Ramirez J., Aldaco-Nuncio R., Fortis-Hernández M., Salazar-Sosa E., Rodríguez-Rios J. C. & Vázquez-Vázquez C. 2006. Efecto de la densidad y estructura del dosel de maíz en la penetración de la radiación solar. *Revista Internacional de Botánica Experimental PHYTON*, 75, 47-53.
- Montiel-Frausto, L. B., Enríquez del Valle, J. R. & Cisneros, A. 2016. Propagación in vitro de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose. *Biotecnología Vegetal*, 16 (2), 113-123.
- Navarro, M., Febles, G., & Torres, V. 2012. Bases conceptuales para la estimación del vigor de las semillas a través de indicadores del crecimiento y el desarrollo inicial. *Pastos y Forrajes*, 35 (3), 233-246.
- Negreros-Castillo, P., Apodaca-Martinez, M. & Mize, C. W. 2010. Efecto de sustrato y densidad en la calidad de plántulas de cedro, caoba y roble. *Madera y Bosques*, 16 (2), 7-18.
- Ortuño, F. & Echandi, Z. 1980. Efecto de condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad y vigor de la semilla de café (*Coffea arabica* L.). *Agronomía Costarricense*, 4 (2), 149-159.
- Otegui, M., Pérez, M. A. & de Souza Maia, M. 2005. Efecto de la temperatura y la luz en la germinación de semillas de *Paspalum guenoarum*. *Revista Brasileira de Sementes*, 27 (1), 190-194.
- Otterstrom, S. M., Schwartz, M. W. & Velázquez-Rocha, I. 2006. Responses to Fire in Selected Tropical Dry Forest Trees. *Biotropica*, 38 (5), 592-598.
- Páez, A., Paz, V. & López, J. C. 2000. Crecimiento y respuestas fisiológicas de plantas de tomate cv. Río Grande en la época mayo-julio. Efecto del sombreado. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 17, 173-184.
- Peréz-García, F. & Pita-Villamil, J. M. 2001. *Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaria General de Estructuras. 16 p.

- Piedrahita, E. 1987. Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad de la semilla del roble *Tabebuia rosea* (Bertol) DC. *Rev. Fac. Nac. de Agronomía, Medellín*. 40 (1), 45-61.
- Poulsen, K. 2000. Análisis de semillas. En: Técnicas para la escarificación de semillas forestales. Serie Técnica. Manual Técnico No. 36. CATIE-PROSEFORDFSC. Turrialba, Costa Rica.
- Prehn, D., Serrano, C., Berrios, C. G. & Arce-Johnson, P. 2003. Micropropagación de *Quillaja saponaria* Mol. a partir de semillas. *Bosque*, 24 (2), 3-12.
- Quesada-Monge, R. 2004. Especies forestales vedadas y bajo otras categorías de protección en Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 1 (2), 84-88.
- Quesada-Roldán, G. & Méndez-Soto, C. 2005. Evaluación de sustratos para almácigos de hortalizas. *Agronomía mesoamericana*, 16 (2), 171-183.
- Quilichini A. & Debussche M. 2000. Seed dispersal and germination patterns in a rare Mediterranean island endemic (*Anchusa crispa* Viv., Boraginaceae). *Acta Oecologica*, 21, 303-313.
- Quiroz, M. T. A. & Rentería, A. A. 2002. Efecto de la lombricomposta como sustrato alternativo en la germinación y crecimiento inicial de *Pinus oaxacana* Mirov. Y *Pinus rudis* Endl. *Foresta veracruzana*, 4 (1), 35-40.
- Reyes-Guiñones, J. 2015. Manual diseño y organización de viveros. Clusvidom, Santo Domingo, República Dominicana.
- Ritz, C., Phipper, C. B. & Streibig, J. C. 2013. Analysis of germination data from agricultural experiments. *European journal of agronomy*, 45, 1-6.
- Rodríguez-Morales, J., Guillén, S. & Casas, A. 2013. Consecuencias de la domesticación de *Stenocereus stellatus* en el tamaño de las semillas y en la germinación en un gradiente de estrés hídrico. *Botanical Sciences*, 91 (4), 485-492.
- Rodríguez-Rivera, M.F., Sosa, L.R., Fernández, E.A., Reale, M.I. & Villarreal V. 2007. Efecto del estrés hídrico a distintas temperaturas sobre la germinación de semillas de *Bulnesia retama* (Gill. ex. Hook.) Griseb. -Zigofiláceas - en San Luis, Argentina. *Revista Internacional de Botánica Experimental PHYTON*, 76, 5-17.
- Rogel-Castellanos, I., Muñoz-Pérez, R. B. & Cruz-Castillo, J. G. 2000. Propagación de aguacatero por acodo utilizando etiolación, ácido indolbutírico, y obstrucción de savia. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 6 (1), 101-104.

- Rojas-Rodríguez, F. & Torres-Córdoba, G. 2008. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Caoba. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 5 (14), 1-3.
- Rojas-Rodríguez, F. & Torres-Córdoba, G. 2012. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Balsa. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 6 (17), 64-66.
- Rojas-Rodríguez, F. & Torres-Córdoba, G. 2013. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Cedro (*Cedrela salvadorensis* Stadl.). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 10 (25), 34-35.
- Rojas-Rodríguez, F. & Torres-Córdoba, G. 2014a. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Cenízaro (*Samanea saman* (Jacq) Merril.). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 11 (27), 70-72.
- Rojas-Rodríguez, F. & Torres-Córdoba, G. 2014b. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Ceiba (*Ceiba pentandra* (L.) Gaertn.). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 11 (26), 19-21.
- Rojas-Rodríguez, F. & Torres-Córdoba, G. 2014c. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Cedro amargo (*Cedrela odorata* L.). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 11 (26), 25-217.
- Rojas-Rodríguez, F. & Torres-Córdoba, G. 2015a. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Coralillo (*Cassia moschata* Kunth). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 12 (29), 19-21.
- Rojas-Rodríguez, F. & Torres-Córdoba, G. 2015b. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Cirrí rojo (*Mauria heterophylla* Kunth.). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 12 (28), 52-54.
- Rojas-Rodríguez, F. & Torres-Córdoba, G. 2015c. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Copalchí (*Croton niveus* Jacq.). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 12 (29), 74-76.
- Rojas-Rodríguez, F. & Torres-Córdoba, G. 2016. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Dama (*Citharexylum donnell-smithii* Greenm). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 13 (33), 50-52.
- Rojas-Rodríguez, F. & Torres-Córdoba, G. 2017. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Gavilancillo (*Albizia adinocephala* (Donn. Sm.) Britton y Rose). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 14 (35), 53-55.

- Romo-Reátegui, M. 2005. Efecto de la luz en el crecimiento de plantulas de *Dipteryx micrantha* Harms "Shihuahuaco" transplantadas a sotobosque, claros y plantaciones. *Ecología Aplicada*, 4 (1-2), 1-8.
- Ruiz, M. A. 2009. El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. *Anguil Argentina*, 77, 1-19.
- Russi, D., Bartosik, R., Rodriguez, J. & Peretti, A. 2007. Adaptación del test de tetrazolio para la detección rápida de daño en la calidad del trigo por altas temperaturas durante el secado. En IX Congreso Argentino de Ingenieria Rural y I del MERCOSUR, Facultad de Ciencias Agrarias de Balcarce. Córdoba, Argentina
- Sáez, J. N. P. 1999. Utilización de sustratos en viveros. *Terra*, 17 (3), 231-235.
- Salgado-Valladares, C. A. & Flores-Rodríguez, M. 2011. Usos medicinales del guayacán (*Guajacum sanctum* L.). *Tlahui-Medic*, 30 (1), 1-6.
- Salinas, A. R., Yoldjian, A. M., Craviotto, R. M. & Bisaro, V. 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36 (3), 371-379.
- Sánchez, D., Arends, E., Villarreal, A. & Cegarra, A. 2005. Fenología y caracterización de semillas y plántulas de *Pourouma cecropiifolia* Mart. *Ecotropicos*, 18 (2), 96-102.
- Schaffer, B. & Mason, L. J. 1990. Effects of scale insect herbivory and shading on net gas exchange and growth of a subtropical tree species (*Guaiacum sanctum* L.). *Oecologia*, 84 (4), 468-473.
- Schmidt, L. H. 2007. *Tropical forest seed*. Springer Science & Business Media, Berlín, Alemania. 409 p.
- Scott, S. J., Jones, R. A. & Williams, W. 1984. Review of data analysis methods for seed germination. *Crop science*, 24 (6), 1192-1199.
- Shafii, B., Price, W.J., Swensen, J.B. & Murray, G.A. 1991. Nonlinear estimation of growth curve models for germination data analysis. *Conference on Applied Statistics in Agriculture*. Paper 3.
<http://newprairiepress.org/agstatconference/1991/proceedings/3>
- Shafii, B. & Price, W.J. 2001. Estimation of cardinal temperatures in germination data analysis. *Journal of Agricultural Biological and Enviromental Statistics*, 6, 356-366.

- Singh, P., Ibrahim, H. M., Flury, M., Schillinger, W. F. & Knappenberger, T. 2013. Critical water potentials for germination of wheat cultivars in the dryland Northwest USA. *Seed Science Research*, 23 (3), 189-198.
- Stevens, N., Seal, C. E., Archibald, S. & Bond, W. 2014. Increasing temperatures can improve seedling establishment in arid-adapted savanna trees. *Oecologia*, 175 (3), 1029-1040.
- Tesche, M. 1975. Germination of conifer seeds under conditions of simulated drought stress in polyethylene glycol. *Biochemie und Physiologie Der Pflanzen*, 167, 577-584.
- Toole, V. K. 1976. Light and temperature control of germination in *Agropyron smithii* seeds. *Plant Cell Physiology*, 17 (11), 1263-1267
- Tseng, S. & Hsu, J. P. 1989. A stochastic analysis of seed germination. *Bot. Bull. Academia Sinica*, 30, 201-205.
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). 2018. The IUCN Red List of Threatened Species. Consultada en línea el 17-5-2018 en: <http://www.iucnredlist.org/details/32955/0>
- Vadillo, G., Suni M. & Cano, A. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Rev. peru biol.*, 11 (1), 71-78.
- Valverde-Cerdas, L., Rojas-Vargas, A. & Hine-Gómez, A. 2008. In vitro Propagation of *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata*, *Platymiscium pinnatum* and *Guaiacum sanctum*. *Plant Tissue Cult. & Biotech.*, 18 (2), 151-156.
- Verma, P. & Majee, M. 2013. Seed Germination and Viability Test in Tetrazolium (TZ) Assay. *Bio-protocol*, 3 (17), 1-4.
- Victoria, T. J. A., Bonilla C. C. R. & Sánchez, O. M. S. 2006. Viabilidad en tetrazolio de semillas de caléndula y eneldo. *Acta Agronómica*, 55 (1), 31-41.
- Vuillemin, J. 1982. Ecophysiologie comparée du développement initial de *Quercus pubescens* Will. et *Q. ilex* L. Germination et Ecología. *Mediterranea*, 8, 147-151.
- Weiß, C.H. 2007. StatSoft Inc, Tulsa, OK.: STATISTICA, Version 8. AStA. Advances in Statistical Analysis 91 (3): 339–341. doi:10.1007/s10182-007-0038-x
- Wendelken, P. W. & Martin, R. F. 1987. Avian consumption of *Guaiacum sanctum* fruit in the arid interior of Guatemala. *Biotropica*, 19 (2) 116-121.

- Zamora, N. 2015. Zygophyllaceae. En B. E. Hammel, M. H. Grayum, C. Herrera, and N. Zamora (Eds). Manual de Plantas de Costa Rica Vol. VIII. Missouri Botanical Garden Press, 634p.
- Zavala-Chávez, F. 2015. Deseccación de bellotas y su relación con la viabilidad y germinación en nueve especies de encinos mexicanos. *CIENCIA ergo-sum*, 11 (2), 177-185.
- Zúñiga-Ortiz, A. 2016. Conservación del guayacán real (*Guaiacum sanctum* L., Zygophyllaceae) y cuál es la distribución potencial de sus poblaciones en Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 13 (30), 1-2.

9. Anexos

Anexo 1. A) Hojas de *Guaiacum sanctum*, B) Floración de *G. sanctum*, C) Frutos de *G. sanctum* y D) Frutos maduros y semillas con arilo.



Anexo 2. Localización geográfica de los árboles semilleros de *Guaiacum sanctum* ubicados en el presente estudio.

Latitud	Longitud	Elevación	Especie
10.14398	-85.45534	-	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.261267	-85.583259	-	<i>Guaiacum sanctum</i>
11.025556	-85.731944	0	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.333333	-85.352778	5	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.800000	-85.666667	10	<i>Guaiacum sanctum</i>
11.066667	-85.633333	20	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.323333	-85.306944	45	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.352778	-85.337500	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.333333	-85.352778	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.802778	-85.652778	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.286111	-85.341667	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
11.007979	-85.666981	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.345833	-85.344444	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.253385	-85.317354	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
11.025556	-85.731945	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
11.033243	-85.678986	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
11.007979	-85.666981	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
11.041667	-85.672222	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.333333	-85.352778	50	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.333333	-85.352778	110	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.333333	-85.352778	110	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.333333	-85.352778	110	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.815278	-85.611389	200	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.833333	-85.616667	250	<i>Guaiacum sanctum</i>
10.815278	-85.611389	250	<i>Guaiacum sanctum</i>
9.950000	-85.600000	250	<i>Guaiacum sanctum</i>
11.000000	-85.500000	450	<i>Guaiacum sanctum</i>

Anexo 3. Lista de materiales, equipos e instrumentos utilizados para desarrollar el presente estudio.

Materiales, equipo e instrumentos

Cámara de crecimiento vegetal Thermo Scientific modelo PR505755R
Luxómetro
Bolsas de papel
Cámara digital
Cajas plásticas
Regla 30 cm
Vernier digital
Sustratos (Tierra, arena, lombri-compost)
Balanza semi-analítica y analítica
Horno de secar modelo Herathem OMH100
Desecador
Autoclave
Tetrazolio (25g)
PEG 8000 (1000g)
Agua destilada
Pinzas
Cristalería (Beakers, frascos, etc.)
Placas Petri
Tubos eppendorf
Agitador magnético
Estereoscopio Olympus SZX16
Soluciones desinfectantes (Cloro y Vitavax)
Computadora

Anexo 4. Equipo de laboratorio utilizado durante el estudio. A) Cámara de crecimiento vegetal Thermo Scientific modelo PR505755R, B) Vernier digital y C) Horno digital Thermo Scientific.



Anexo 5. A) Condiciones de luz y oscuridad durante el periodo de germinación, B) Semillas germinadas de *G. sanctum*, C) Plántulas de *G. sanctum*.

