

Tolerancia a la desecación en semillas de nanche (*Byrsonima crassifolia* L.) Kunth*

Desiccation tolerance in seeds of nanche (*Byrsonima crassifolia* L.) Kunth

Camelia Jaimes Albiter^{1§}, Gabino García de los Santos¹, Aquiles Carballo Carballo¹, Guillermo Calderón Zavala¹, Fermín Jaimes Albiter² y Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez³

¹Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. Tel: 015959520200. (cjaimes@colpos.mx; garciag@colpos.mx; aquiles.carballo@gmail.com; cazagu@colpos.mx). ²Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km. 38.5, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. Tel: 015959521500 (fjaimes@taurus.chapingo.mx). ³Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco, km 38.5, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. Tel: 015959521500. (jaxayacatl@gmail.com). [§]Autora para correspondencia: cjaimes@colpos.mx.

Resumen

Se determinó la tolerancia a la desecación y longevidad de las semillas de nanche amarillo de Tejupilco, Estado de México (clima semicálido) y de Tuxtepec, Oaxaca (cálido húmedo) para clasificarlas como: ortodoxas, recalcitrantes o intermedias, y elegir la estrategia adecuada para conservarlas. En la primera etapa, se evaluó el efecto de la desecación en la supervivencia de las semillas. Para ello las semillas se secaron a 10, 5%, y la humedad testigo (10.1 para Tejupilco y 18.9 para Tuxtepec); se almacenaron por: cero, tres y seis meses a -20 °C y 20% de HR, en un cuarto frío. Las variables evaluadas fueron: viabilidad con tetrazolio, germinación y velocidad de emergencia. Los resultados indicaron que aunque la viabilidad se incrementó al almacenarse por seis meses, el vigor disminuyó; mientras que, la germinación y velocidad de emergencia fueron mejores cuando las semillas no se almacenaron (64.44% y 0.3 plántulas emergidas por día, respectivamente), lo que permite inferir que no toleran el almacenamiento en frío. En la segunda etapa se determinó la longevidad de las semillas almacenadas por: cero, tres y seis meses en dos ambientes: cuarto frío a 5 ± 2 °C, y 20% de HR y en una habitación a 19 °C y 58% de HR, con los mismos contenidos de humedad de la primera etapa. Se evaluaron mismas variables antes mencionadas;

Abstract

Desiccation tolerance and seed longevity of yellow nanche Tejupilco, State of Mexico (warm climate) and Tuxtepec, Oaxaca (warm wet) was determined to classify as orthodox, recalcitrant or intermediate and choosing the right strategy for You keep them. In the first stage, the effect of drying on seed survival was evaluated. For this, the seeds were dried at 10, 5%, and the moisture witness (10.1 to 18.9 for Tejupilco and Tuxtepec); were stored by zero, three and six months at -20 °C and 20% RH, in a cold room. The variables evaluated were: tetrazolium viability, germination and emergence rate. The results indicated that although the increased viability when stored for six months, the force decreased; while germination and emergence rate were better when the seeds were not stored (64.44% and 0.3 seedlings emerged per day, respectively), which allows inferring intolerant to cold storage. Zero, three and six months in two environments: In the second stage the longevity of stored seeds was determined by cold room at 5 ± 2 °C and 20% RH and in a room at 19 °C and 58% HR, with the same moisture content of the first stage. Above these variables were evaluated; the best

* Recibido: noviembre de 2013
Aceptado: marzo de 2014

el mejor comportamiento se obtuvo cuando las semillas no se almacenaron. Se concluyó que las semillas de nanche de ambos climas son recalcitrantes.

Palabras clave: *Byrsonima crassifolia*, conservación *ex situ*, conservación *in situ*, semillas recalcitrantes.

Introducción

La conservación *in situ* y/o *ex situ* de los recursos fitogenéticos es urgente para la seguridad alimentaria (Nieto, 2007). La estrategia, depende del tipo de semilla de que se trate; para conocerlo, debe determinarse la tolerancia a la desecación y la longevidad de las semillas cuando se almacenan en distintos ambientes (Hong y Ellis, 1996).

Las semillas se clasifican en tres grupos: ortodoxas o “tolerantes” a la deshidratación, recalcitrantes o “susceptibles” a la deshidratación (Roberts, 1973) e intermedias (Ellis *et al.*, 1991a). Las ortodoxas son aquellas que toleran la deshidratación hasta 5% o menos sin afectar la viabilidad, y la longevidad aumenta cuando se conservan en cuartos fríos; en cambio, las recalcitrantes son susceptibles a la deshidratación y su viabilidad sólo se conserva algunos días, meses o bien, uno o dos años si provienen de ambientes templados y toleran las bajas temperaturas (Chin *et al.*, 1984). Por otro lado, las semillas intermedias toleran la desecación más que las recalcitrantes, pero no al grado de las ortodoxas. En las intermedias la longevidad varía, ya que en las de origen tropical se reduce al disminuir la temperatura de almacenamiento por debajo de 10 °C (Ellis *et al.*, 1990), en tanto que las de origen templado toleran el mismo nivel de desecación que la tropicales, pero pueden almacenarse a temperaturas que oscilan entre 5 y -20 °C (Berjak y Pammenter, 2008).

El nanche (*Byrsonima crassifolia* L.) Kunth, pertenece a la familia Malpighiaceae (Pennington y Sarukhán, 2004). Es una especie forestal-frutícola que generalmente crece en forma silvestre y en algunas zonas geográficas en la modalidad de semicultivo. Se adapta a un amplio rango de condiciones ambientales y ha adquirido considerable importancia por los distintos satisfactores que ofrece: alimento, licores, medicina tradicional, ornamental, combustible, curtiente, colorante, apícola, elemento reforestador y componente de sistemas agrosilvopastoriles (Martínez *et al.*, 2008); sin embargo, la información disponible respecto al comportamiento de sus semillas durante el almacenamiento es limitada e imprecisa.

performance was obtained when the seeds were not stored. It was concluded that seeds of both climates nanche are recalcitrant.

Keywords: *Byrsonima crassifolia*, *ex situ* conservation, *in situ* conservation, seeds recalcitrant.

Introduction

The conservation *in situ* and/or *ex situ* plant genetic resources is urgent for food security (Nieto, 2007). The strategy depends on the type of seed in question; to know, the desiccation tolerance and seed longevity when stored should be determined in different environments (Hong and Ellis, 1996).

Seeds were classified into three groups: orthodox or “tolerant” to dehydration, recalcitrant or “susceptible” to dehydration (Roberts, 1973) and intermediate (Ellis *et al.*, 1991a). The orthodox are those that tolerate dehydration to 5% or less without affecting the viability and longevity increases when stored in cold rooms, whereas recalcitrant are susceptible to dehydration and its feasibility is preserved only a few days, months or well, one or two years if they come from temperate environments and tolerate low temperatures (Chin *et al.*, 1984). Furthermore, the intermediate seed tolerate more recalcitrant desiccation, but not to the degree of orthodox. Longevity in intermediate variable, as in tropical origin is reduced by lowering the storage temperature below 10 °C (Ellis *et al.*, 1990), whereas the origin tempered tolerate the same level of drying the tropics, but can be stored at temperatures ranging from 5 to -20 °C (Berjak and Pammenter, 2008).

The nanche (*Byrsonima crassifolia* L.) Kunth, belongs to the family Malpighiaceae (Pennington and Sarukhan, 2004). It is a forest-fruit species which usually grows wild and in certain geographical areas in the form of semi-culture. Fits a wide range of environmental conditions and has acquired considerable importance by different satisfactions offered: food, spirits, traditional, ornamental medicine, fuel, tanning, dye, beekeeping, reforester element and component of agroforestry systems (Martínez *et al.*, 2008); however, the available information about the behavior of their seeds during storage is limited and imprecise.

En 42 genotipos de nanche (*B. crassifolia* L.) de la colección del CATIE, en Costa Rica, se reporta que las semillas son recalcitrantes (Guignard, 1991). Por otro lado, Villachica (1996) sólo menciona que las semillas de indano o murici (*Byrsonima crassifolia* L.) Rich, soportan el secado y congelamiento y son conservadas normalmente en el almacén. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la tolerancia a la desecación y la longevidad en almacén, de las semillas de nanche de Tejupilco, Estado de México (clima semicálido) y Tuxtepec, Oaxaca (cálido húmedo), para clasificarlas como: ortodoxas, recalcitrantes o intermedias y elegir el método de conservación más apropiado para este recurso fitogenético, bajo la hipótesis de que las semillas de nanche de clima semicálido y clima cálido húmedo, muestran diferente grado de recalcitrancia.

Materiales y métodos

Colecta de frutos, acondicionamiento y determinaciones previas

Los frutos se colectaron en Tejupilco, Estado de México y Tuxtepec, Oaxaca, durante julio a septiembre de 2011. Se eligieron aquellos que de manera natural se desprendieron del árbol para homogeneizar el grado de madurez. Para acondicionarlos y limpiarlos, se colocaron durante cinco días en recipientes de plástico que permitieron la aireación, sin embargo, hubo cierto grado de fermentación. Para disponer de las semillas contenidas en el endocarpio, los frutos se despulparon mediante fricción en un tamiz metálico y se enjuagaron con abundante agua.

Posteriormente, utilizando el método de la estufa, se determinó el contenido de humedad inicial de los propágulos (endocarpio conteniendo a la semilla) de ambos climas, y el resultado se reportó en porcentaje (ISTA, 2005). A la par, se determinó la viabilidad de las semillas botánicas mediante tinción del embrión con 2, 3, 5, Cloruro de Trifenil Tetrazolio al 1% (ISTA, 2005); se usaron tres repeticiones de 10 semillas cada una. Se calificaron como viables y de alto vigor las que presentaron coloración rosa intenso, de baja viabilidad, aquellas cuya coloración fue rosa pálido; y como no viables las que no se tiñeron. En el primer sitio, el nanche se encuentra en forma silvestre, mientras que en el segundo, los árboles crecen en los solares de los domicilios.

Nanche in 42 genotypes (*B. crassifolia* L.) collection CATIE in Costa Rica, it is reported that the seeds are recalcitrant (Guignard, 1991). Furthermore, Villachica (1996) mentions only that the seeds or murici indane (*Byrsonima crassifolia* L.) Rich, support drying and freezing and are normally kept in stock. Therefore, the objective of this research was to determine the desiccation tolerance and longevity in storage, seed nanche Tejupilco, State of Mexico (warm climate) and Tuxtepec, Oaxaca (hot and humid) to classify them as: orthodox, recalcitrant or intermediate and choose the most appropriate method for this plant genetic resource conservation, under the hypothesis that seeds nanche of warm climate and warm humid climate, show different degrees of recalcitrance.

Materials and methods

Collection of fruits, conditioning and previous determinations

The fruits were collected in Tejupilco, State of Mexico and Tuxtepec, Oaxaca, during July to September 2011. Those naturally fell off the tree to standardize the degree of maturity were chosen. To clean and condition them, were placed for five days in plastic containers that allowed aeration, however, there was some degree of fermentation. To dispose of the seeds in the endocarp, the fruit depulped friction in a metal sieve and rinsed with water.

Subsequently, using the oven method, the initial moisture content of propagules (endocarp containing the seed) of both climates are determined, and the result is reported as a percentage (ISTA, 2005). Alongside, we determined the botanical seed viability by staining embryo with 2, 3, 5, triphenyl tetrazolium chloride, 1% (ISTA, 2005); three replications of 10 seeds each were used. Those that showed intense pink color, were scored as viable and high vigor low viability; those whose color was pale, pink; non-viable and which were not stained. In the first place, the nanche is wild, while in the second, the trees grow in the solar homes.

In a climate prevails Tejupilco (A)C (w2) semiwarm group C, the wettest sub-humid, with average annual temperature and precipitation of 19 °C and 1 338.9 mm, respectively;

En Tejupilco prevalece un clima (A) C (w2) semicálido del grupo C, el más húmedo de los subhúmedos, con temperatura y precipitación media anuales de 19 °C y 1 338.9 mm, respectivamente; en contraparte, Tuxtepec, corresponde al tipo cálido húmedo (Am) con temperatura y precipitación media anual de 24.9 °C y 2 304.3 mm, respectivamente (García, 1988). La investigación contempló dos etapas: en la primera se determinó la tolerancia a la desecación y en la segunda, se evaluó la longevidad de la semilla almacenada en diferentes ambientes.

Primera etapa: tolerancia a la desecación

Se determinó conforme al protocolo de Hong y Ellis (1996). Como el contenido de humedad inicial de las semillas de Tuxtepec fue mayor que el de las de Tejupilco, el proceso de desecación para las primeras, inició con secado natural a la sombra a temperatura entre 25-27 °C y 60 a 70% de HR, durante 38 horas, tiempo en el que el contenido de humedad disminuyó a 10%.

Posteriormente, para disminuir el contenido de humedad de las semillas de ambos sitios a 5%, se usó Sílica gel en proporción 1:2 (v/v) semilla-Sílica gel. La pérdida de humedad se monitoreó periódicamente mediante el método gravimétrico (Hong y Ellis, 1996). Como la viabilidad de las semillas no se afectó con la deshidratación, éstas se almacenaron en frascos con tapa hermética durante: cero (no se almacenaron), tres y seis meses a -20 °C en el Banco Nacional de Germoplasma Vegetal ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, Estado de México.

Se usó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (2 x 3 x 3), los factores y niveles fueron: origen del germoplasma (Tejupilco, Estado de México y Tuxtepec, Oaxaca), contenido de humedad de la semilla (10 y 5% y la humedad testigo que fue de 10.1% en las Tejupilco de, y 18.9% para las de Tuxtepec) y período de almacenamiento (cero, tres y seis meses) se obtuvieron 18 tratamientos con tres repeticiones de 25 semillas cada una.

Aunque el protocolo indica almacenar las semillas sólo por tres meses (Hong y Ellis, 1996), con el objeto de obtener información adicional, se almacenaron también durante seis meses. Después del almacenamiento se hicieron: 1) prueba de viabilidad con Tetrazolio (2, 3, 5, Cloruro de Trifenil Tetrazolio al 1%), se usaron tres repeticiones de 10 semillas cada una, para cada tratamiento y el resultado se reportó en porcentaje, y 2) prueba de germinación a 25 °C

in contrast, Tuxtepec, type corresponds to the warm wet (Am) with mean annual temperature and precipitation of 24.9 °C and 2 304.3 mm, respectively (García, 1988). The research included two stages: first the desiccation tolerance was determined and in the second, the longevity of the seed stored in different environments was evaluated.

First stage: desiccation tolerance

Was determined according to the protocol of Hong and Ellis (1996). As the initial moisture content of the seed was greater than Tuxtepec of Tejupilco, the drying process for the first, initiated by natural drying in the shade at room temperature between 25-27 °C and 60 to 70% RH, for 38 hours, during which the moisture content decreased to 10%.

Subsequently, to reduce the moisture content of the seeds of both sites at 5%, silica gel was used in a 1:2 ratio (v/v) seed-silica gel. Moisture loss is periodically monitored by the gravimetric method (Hong and Ellis, 1996). As the seed viability was not affected by dehydration, they were stored in jars with tight lid for: zero (not stored), three and six months at -20 °C in the National Germplasm Plant Bank, located at Chapingo Autonomous University, Chapingo, State of Mexico.

An experimental design was completely randomized factorial arrangement of treatments (2 x 3 x 3) with, factors and levels were: origin of the germplasm (Tejupilco, State of Mexico and Tuxtepec, Oaxaca), moisture content of the seed (10 and 5% and moisture control was 10.1% in Tejupilco of, and 18.9% for Tuxtepec) and storage period (zero, three and six months) 18 treatments with three replicates of 25 seeds each were obtained.

Although the protocol indicates they store seeds for only three months (Hong and Ellis, 1996), in order to obtain additional information is also stored for six months. After storage were made: 1) viability testing tetrazolium (2, 3, 5, triphenyl tetrazolium chloride 1%), three replicates of 10 seeds were used each for each treatment and the results are reported in percentage; and 2) germination test at 25 °C; as plastic containers experimental units 15 x 15 cm were used, with moss and perlite 1:2 v / v at 15 seeds each were sown. The tests were conducted at the Seed Testing Laboratory and greenhouse, respectively, of the Graduate College of Agricultural Sciences, Campus Montecillo, Montecillo, State of Mexico.

de temperatura; como unidades experimentales se usaron recipientes de plástico de 15 x 15 cm, con agrolita y musgo en proporción 1:2 v/v y en cada una se sembraron 15 semillas. Las pruebas se hicieron en el Laboratorio de Análisis de Semillas e invernadero, respectivamente, del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo, Montecillo, Estado de México.

Variables evaluadas

1) viabilidad con Tetrazolio. Se evaluó mediante el proceso mencionado anteriormente; 2) germinación. Se cuantificó el total de semillas germinadas y el resultado se expresó en porcentaje; se consideró como semilla germinada la que originó una plántula con todas sus estructuras; y 3) velocidad de emergencia. Se cuantificó el número de plántulas emergidas por día (Maguire, 1962):

$$VE = \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i}{N_i} \right)$$

Donde: VE= velocidad de emergencia; X_i = número de plántulas emergidas en el i -ésimo conteo; N_i = Número de días después de la siembra en el i -ésimo conteo; y n = número de conteos; 1,2,..., n conteos.

Para el análisis estadístico, los datos se transformaron mediante la función Arcoseno (Castillo, 2000); se realizó el análisis de varianza para cada variable con $\alpha \leq 0.05$, y la comparación múltiple de medias, con la prueba de Tukey, mediante el paquete estadístico SAS para Windows Versión 9.0 (2001).

Segunda etapa: longevidad de las semillas

Se determinó la longevidad de las semillas de ambos orígenes en diferentes ambientes (Hong y Ellis, 1996); para ello, se almacenaron semillas con los mismos contenidos de humedad que en la primera etapa (10 y 5% y la humedad testigo que fue de 10.1% para Tejupilco y 18.9% para Tuxtepec%), en dos condiciones ambientales: 1) cuarto frío a 5 ± 2 °C, y 20% de HR, en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo; y 2) temperatura ambiente (19 °C) y 58% H R, en una habitación en Almoloya de las Granadas, Tejupilco, Estado de México. Se usó diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (2 x 3 x 2 x 3). Los factores y niveles fueron: origen de la semilla (Tejupilco, Estado de México y Tuxtepec, Oaxaca), período de almacenamiento (cero, tres y seis meses), ambiente de almacenamiento (5 °C y 20% de HR; 19 °C, y 58% de HR) y contenido de humedad (10 y

Variables evaluated

1) feasibility Tetrazolium. Was evaluated by the aforementioned process; 2) germination. Total germinated seeds was quantified and the result is expressed as a percentage; germinated seed was considered as a seedling which originated with all its structures; and 3) emergency speed. The number of seedlings emerged per day (Maguire, 1962) was quantified:

$$VE = \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i}{N_i} \right)$$

Where: VE= velocity of emergency; X_i = number of seedlings emerged in the i th counting; N_i = Number of days after sowing in the i th counting; n = number of counts; 1,2,..., n counts.

For statistical analysis, data were transformed by the arc sine function (Castillo, 2000); analysis of variance for each variable with $\alpha \leq 0.05$, and multiple comparison of means with the Tukey test, using the SAS statistical package for Windows version 9.0 (2001) was performed.

Second stage: seed longevity

Longevity of seeds of both origins in different environments (Hong and Ellis, 1996) was determined; for this, seeds were stored with the same moisture content in the first stage (10 to 5% and moisture control was 10.1% and 18.9% for Tejupilco to Tuxtepec%) in two environmental conditions: 1) cold room 5 ± 2 °C and 20% RH, in the Graduate College, Campus Montecillo; and 2) room temperature (19 °C) and 58% RH in a room in Almoloya of Pomegranates, Tejupilco, State of Mexico. Experimental design was completely randomized factorial arrangement of treatments (2 x 3 x 2 x 3). The factors and levels were: seed origin (Tejupilco, State of Mexico and Tuxtepec, Oaxaca), storage period (zero, three and six months), storage room (5 °C and 20% RH, 19 °C, and 58% RH) and moisture content (10 to 5%, and moisture witness was 10.1 to 18.9 in Tejupilco and Tuxtepec). 36 treatments with three replicates of 25 seeds each were evaluated.

Variables evaluated

Were evaluated: 1) Tetrazolium viability; 2) germination; and 3) emergency speed. The methodology described in the first stage was used.

5%, y humedad testigo que fue de 10.1 para Tejupilco y 18.9 en las de Tuxtepec). Se evaluaron 36 tratamientos con tres repeticiones de 25 semillas cada una.

VARIABLES EVALUADAS

Se evaluaron: 1) viabilidad con Tetrazolio; 2) germinación; y 3) velocidad de emergencia. Se empleó la metodología descrita en la primera etapa.

Resultados y discusión

Determinaciones preliminares

Las semillas de Tejupilco, Estado de México (clima semicálido) presentaron 10.1% de humedad inicial y 62.3% de viabilidad, mientras que las de Tuxtepec, Oaxaca (clima cálido húmedo), 18.9 y 63.3% de humedad y viabilidad, respectivamente. Considerando que las semillas en general son higroscópicas, los distintos contenidos de humedad pueden ser consecuencia de las condiciones climáticas contrastantes que prevalecen en los sitios de origen de éstas; mientras en Tuxtepec, Oaxaca el clima es cálido húmedo, en Tejupilco, Estado de México es semicálido (García, 1988).

Por otra parte, la baja viabilidad inicial de la semilla de ambos sitios, probablemente se debió, a que el nanche es una especie alternante y 2011 fue año de baja producción, ya que de acuerdo con Jara (1997), los años de escasa producción se correlacionan con disminución en la viabilidad e incluso con menor tolerancia a la desecación en las semillas de especies forestales, y el nanche es una especie forestal-frutícola. También es posible que la rapidez del proceso de desecación (tanto el secado natural como el artificial con Sílica gel) probablemente influyó de manera negativa en las variables evaluadas (Hong y Ellis, 1996; Berjak y Pammenter, 2008), ya que, las semillas de Tuxtepec perdieron 8.9% de humedad en 38 h y después, en 18 h 5% más. De igual forma, las semillas de Tejupilco también disminuyeron 5.1% su contenido de humedad en 18 h.

Primera etapa: tolerancia a la desecación

En el Cuadro 1 se aprecia que para la viabilidad, resultaron significativos el período de almacenamiento (PA) ($p \leq 0.0001$) y el contenido de humedad (CH) ($p \leq 0.05$), y las

Results and discussion

Preliminary determinations

Tejupilco seeds, State of Mexico (warm climate) had 10.1% initial moisture and 62.3% viability, while Tuxtepec, Oaxaca (warm humid climate), 18.9 and 63.3% moisture and viability, respectively. Whereas seed are generally hygroscopic, different moisture contents may result from the contrasting climatic conditions prevailing at the sites of origin of these; while in Tuxtepec, Oaxaca climate is hot and humid in Tejupilco, State of Mexico is semiwarm (García, 1988).

Moreover, the low initial seed viability of both sites, probably due to the nanche is an alternating and 2011 species was year of low production, since according to Jara (1997), years of low production correlate with decreased viability and even less desiccation tolerance in seeds of forest species and forest-nanche is a species of fruit. It is also possible that speed the drying process (both natural drying and artificial with silica gel) probably influenced negatively on the variables evaluated (Hong and Ellis, 1996; Berjak and Pammenter, 2008) because the seeds Tuxtepec lost 8.9% moisture in 38 hours and then in 18 h 5% more. Similarly, seeds Tejupilco also decreased 5.1% moisture content in 18 h.

First stage: desiccation tolerance

The Table 1 shows that for viability, were significant storage period (PA) ($p \leq 0.0001$) and moisture content (CH) ($p \leq 0.05$), and interactions Origin*moisture content (ORI*CH)* storage period and moisture content (PA*CH) were also significant ($p \leq 0.05$); promoted indicating that any effect on the response variable.

Moreover, the speed of germination and emergence, behaved similarly to one another, resulting in significant ($p \leq 0.0001$) by the simple effect of the three main factors (ORI, PA and CH) and by the interactions. Which means for the three variables assessed, at least one of the levels of the factors promoted a different effect. Because the interactions were significant, a Tukey test (Table 2) was made considering only the interaction of three main factors.

interacciones origen*contenido de humedad (ORI*CH) y periodo de almacenamiento*contenido de humedad (PA*CH) también fueron significativas ($p \leq 0.05$); lo que indica que promovieron algún efecto en la variable respuesta.

Cuadro 1. Cuadrados medios y significancia estadística para las variables evaluadas en semillas de nanche de Tejupilco, Estado de México y Tuxtepec, Oaxaca, con diferente contenido de humedad y períodos de almacenamiento a -20 °C.
Table 1. Mean squares and statistical significance for the variables evaluated in seeds nanche Tejupilco, State of Mexico and Tuxtepec, Oaxaca, with different moisture content and storage period at -20 °C.

F.V.	G.L.	Viabilidad (%)	Germinación (%)	Velocidad de emergencia [†]
ORI	1	0.0119	1.3065	0.1799
PA	2	1.8735	0.1890	0.0233
CH	2	0.1083	0.3064	0.0335
ORI*PA	2	0.0806	0.1203	0.0132
ORI*CH	2	0.1582	0.1231	0.0153
PA*CH	4	0.0765	0.0592	0.0065
ORI*PA*CH	4	0.0575	0.0918	0.0101
ERROR	36	0.0282	0.0128	0.0016
TOTAL	53			
C.V. (%)		16.1902	18.4782	4.4709

*= $p \leq 0.05$; *** = $p \leq 0.0001$; †= número de plántulas emergidas por día; ORI= origen de la semilla; PA= período de almacenamiento; CH= contenido de humedad de la semilla; C.V.= coeficiente de variación.

Por otra parte, la germinación y velocidad de emergencia, se comportaron de manera similar entre sí, resultando significativas ($p \leq 0.0001$) por el efecto simple de los tres factores principales (ORI, PA y CH) y por las interacciones de estos. Lo que significa que para las tres variables evaluadas, al menos uno de los niveles de los factores promovió un efecto diferente. Como las interacciones fueron significativas, se hizo una prueba de Tukey (Cuadro 2), considerando solo la interacción de los tres factores principales.

Viabilidad

La viabilidad incrementó con el almacenamiento durante seis meses (Cuadro 2); sin embargo, como la intensidad de tinción de los tejidos del embrión fue rosa pálido, indica que las semillas fueron poco vigorosas y sin la capacidad para originar una plántula para establecerse en el campo (Moreno, 1996). El incremento pudo deberse a que estas unidades experimentales por azar estuvieron integradas por semillas con alta viabilidad inicial, que se conservó durante el almacenamiento, ya que como lo mencionan Berjak y Pammenter (2008), el comportamiento varía aun en semillas de un mismo lote.

Viability

The viability increased with storage for six months (Table 2); however, as the intensity of staining of the tissues of the embryo was pale pink, indicating that the seeds were

less vigorous and without the ability to originate a seedling to be set in the (Moreno, 1996) field. The increase could be due to these experimental units at random were composed seeds with high initial viability, which was kept in storage since as mentioned Berjak and Pammenter (2008), the behavior varies even seeds from the same lot.

On the other hand, when there was a decrease of viability could be due to variability in the shape, size, etc. The endocarps, especially those lots with small endocarps that may have dried quickly, causing the seed contained therein not tolerate dehydration and therefore, only the seeds of larger endocarps survived (Berjak and Pammenter, 2008), for example, where this size for Tejupilco predominates. Also, it is possible that the fermentation which occurred during seed conditioning (Ellis *et al.*, 1991b), and the method and rate of drying, have been crucial in the response (Hong and Ellis, 1996).

Germination and emergence rate

In these variables, for both origins on average, the seeds had their best performance when not stored (Table 2). The best results were obtained in the germplasm Tuxtepec (64.44%

Cuadro 2. Promedios de las variables evaluadas en las semillas de nanche, de Tejupilco, Estado de México y Tuxtepec, Oaxaca, con diferente contenido de humedad y períodos de almacenamiento a -20 °C.

Table 2. Averages of the variables evaluated in nanche seeds of Tejupilco, State of Mexico and Tuxtepec, Oaxaca, with different moisture content and storage period at -20 °C.

Interacción	Descripción	Viabilidad (%)		Germinación (%)		Velocidad de emergencia [†]	
1	TJ 0M TES	62.33	abcd	11.11	e	0.04	d
2	TJ 0M 10%	60.6	abcd	13.33	e	0.04	d
3	TJ 0M 5%	65.33	abcd	28.89	bcde	0.11	bcd
	Promedio	62.75		17.78		0.06	
4	TJ 3M TES	36.33	d	8.89	e	0.04	d
5	TJ 3M 10%	34	d	24.44	cde	0.09	cd
6	TJ 3M 5%	51.33	bcd	8.89	e	0.04	d
	Promedio	40.55		14.07		0.06	
7	TJ 6M TES	100	a	13.33	e	0.04	d
8	TJ 6M 10%	96.67	a	11.11	e	0.04	d
9	TJ 6M 5%	92.33	ab	17.78	de	0.05	d
	Promedio	96.34		14.07		0.04	
DMS		43.5		30.18		0.11	
Interacción	Descripción	Viabilidad (%)		Germinación (%)		Velocidad de emergencia [†]	
10	TX 0M TES	63.33	abcd	64.44	a	0.23	A
11	TX 0M10%	70.67	abcd	62.22	a	0.23	A
12	TX 0M 5%	68	abcd	62.22	a	0.22	A
	Promedio	67.33		62.96		0.23	
13	TX 3M TES	36.33	d	4.44	e	0.01	d
14	TX 3M 10%	46.33	cd	55.56	ab	0.2	abc
15	TX 3M 5%	83.33	abc	57.78	ab	0.21	ab
	Promedio	55.33		39.26		0.14	
16	TX 6M TES	72.67	abcd	2.22	e	0	d
17	TX 6M 10%	99.67	a	44.44	abcd	0.17	abc
18	TX 6M 5%	96.67	a	48.89	abc	0.18	abc
	Promedio	89.67		31.85		0.12	
DMS		43.5		30.18		0.11	

Medias con la misma letra dentro de cada variable, no son estadísticamente diferentes (Tukey 0.05). †= número de plántulas emergidas por día; TJ= Tejupilco; TX= Tuxtepec; 0M= sin almacenar; 3M= 3 meses de almacenamiento, 6M= 6 meses de almacenamiento; TES= testigo, 10%= semillas con 10% de contenido de humedad; 5%= semillas con 5% de contenido de humedad.

Por otro lado, cuando hubo disminución de la viabilidad, pudo deberse a la variabilidad en la forma, tamaño, etc., de los endocarpios, en especial aquellos lotes con endocarpios pequeños que pudieron haberse secado rápidamente., ocasionando que la semilla contenida en ellos no tolerara la deshidratación y por ende, sólo las semillas de los endocarpios de mayor tamaño sobrevivieron (Berjak y Pammenter, 2008), Por ejemplo, para Tejupilco donde este tamaño predomina. También, cabe la posibilidad de que el fermentado que ocurrió durante el acondicionamiento de las semillas (Ellis *et al.*, 1991b), así como el método y velocidad de secado, hayan sido determinantes en la respuesta obtenida (Hong y Ellis, 1996).

and 0.3 seedlings emerged per day, respectively), which is attributed by a party to the nanche on this site has a higher degree of domestication (Cubero, 2003); and on the other, they have fewer endocarps vain that Tejupilco seeds, which is a disadvantage in advance germplasm latter origin (Jaimes, 2009). These variables still show behavior consistent with viability, since the seeds of Tejupilco performed best when grown with 5% moisture content; however, for Tuxtepec, there were no significant differences. This confirms greater desiccation tolerance of seeds Tejupilco (warm climate).

Germinación y velocidad de emergencia

En estas variables, para ambos orígenes en promedio, las semillas lograron su mejor desempeño cuando no se almacenaron (Cuadro 2). Los mejores resultados se obtuvieron en el germoplasma de Tuxtepec (64.44% y 0.3 plántulas emergidas por día, respectivamente), lo que se atribuye, por una parte a que el nanche en este sitio posee mayor grado de domesticación (Cubero, 2003); y por el otro, estos endocarpios tienen menor número de semillas vanas que los de Tejupilco, lo que de antemano pone en desventaja al germoplasma de este último origen (Jaimes, 2009). Estas variables siguen mostrando un comportamiento concordante con la viabilidad, ya que las semillas de Tejupilco, se comportaron mejor cuando se sembraron con 5% de contenido de humedad; en cambio, para las de Tuxtepec, no hubo diferencias significativas. Lo anterior, confirma mayor tolerancia a la desecación de las semillas de Tejupilco (clima semicálido).

Por otro lado, a diferencia de la viabilidad, en el porcentaje de germinación y velocidad de emergencia, se observó que en promedio, conforme el período de almacenamiento aumentó, el porcentaje de germinación y la velocidad de emergencia disminuyeron notablemente para el germoplasma de Tuxtepec; en cambio, en el de Tejupilco, el porcentaje de germinación se mantuvo sin cambios y sólo disminuyó la velocidad de emergencia cuando las semillas se almacenaron durante seis meses, lo que coincidió con el bajo vigor que mostraron (Maguire, 1962).

En general, los bajos porcentajes de germinación, pudieron ser consecuencia del bajo vigor de las semillas (Moreno, 1996). Por otro lado Chien y Lin (1997), indican que es posible que cuando las semillas están infectadas por hongos, se acelera el deterioro después del secado. De igual manera, es posible que en las semillas de Tejupilco, se haya inducido la latencia por la desecación, ya que predominaron los endocarpios pequeños, pudiendo éstos haberse secado en exceso y como consecuencia, generar latencia en las semillas; en contraste, las de Tuxtepec por provenir de un ambiente cálido húmedo, la baja temperatura del almacén pudo inducir igualmente la entrada en latencia (Wood *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos en general, no concuerdan con lo que mencionan Dussert *et al.* (2000), ya que se esperaba que las semillas de Tejupilco, donde predomina una marcada estación seca que se correlaciona con menor grado de recalcitrancia

Furthermore, unlike the viability on the percentage of germination and emergence rate is observed on average, as the storage period increased, the percentage of germination and emergence rate decreased markedly for germplasm Tuxtepec; however, in Tejupilco, the germination percentage was unchanged and only slowed emergency when seeds were stored for six months, which coincided with the vigor that showed low (Maguire, 1962).

Overall, low germination rates could be a consequence of low vigor seeds (Moreno, 1996). Furthermore Chien and Lin (1997) indicate that it is possible that when the seeds are infected by fungi, accelerates deterioration after drying. Similarly, it is possible that the seeds of Tejupilco latency has been induced by the drying, and small endocarps predominant, they may have dried too much and as a result, latency generate seeds; in contrast, Tuxtepec for coming from a warm moist environment, low temperature storage could also induce entry into latency (Wood *et al.*, 2000).

The results generally do not agree with what is mentioned Dussert *et al.* (2000), as it was expected that the seeds of Tejupilco, where a marked dry season that correlates with lower degree of recalcitrance predominates (Tweddle *et al.*, 2003; Magnitskiy and Plaza, 2007), show a behavior intermediate type; however, it was not. Instead, the results coincide with Daws *et al.* (2004, 2006), so it is possible that the geographic origin of seed affect the degree of desiccation tolerance shown. The behavior observed in the three evaluated variables suggests that the seeds of yellow nanche both sites probably are recalcitrant type (Hong and Ellis, 1996).

Second stage: longevity

The behavior of the variables evaluated after storage in different environments is presented in Table 3.

For viability, only the storage period (PA) was significant ($p \leq 0.05$), which implies that at least one of the levels it caused a different effect of the other on the response variable (Table 3). In contrast, the germination percentage showed significant ($p \leq 0.0001$) with the origin of the seeds; on the other hand, there was also significant ($p \leq 0.05$) for the period and storage environment (Table 3).

(Tweddle *et al.*, 2003; Magnitskiy y Plaza, 2007), mostraran un comportamiento de tipo intermedio; sin embargo, no fue así. En cambio, los resultados coinciden con Daws *et al.* (2004, 2006), por lo que es posible que el origen geográfico de las semillas repercute en el grado de tolerancia a la deshidratación mostrada. El comportamiento observado en las tres variables evaluadas permite pensar que las semillas de nanche amarillo de ambos sitios, probablemente son de tipo recalcitrante (Hong y Ellis, 1996).

Segunda etapa: longevidad

En el Cuadro 3 se presenta el comportamiento de las variables evaluadas después del almacenamiento en diferentes ambientes.

Cuadro 3. Cuadrados medios y significancia estadística para las variables evaluadas en la semilla de nanche, con diferente contenido de humedad, periodo y ambiente de almacenamiento.

Table 3. Mean squares and statistical significance for the variables evaluated in seed nanche with different moisture content, period and storage environment.

F.V.	G.L.	Viabilidad (%)	Germinación (%)	Velocidad de emergencia [†]
ORI	1	0.0043	6.8409 ***	0.9631 ***
PA	2	1.6741 *	0.1845 *	0.0036
AA	1	0.0565	0.1155 *	0.0283 *
CH	2	0.0699	0.0296	0.0042
ORI*PA	2	0.0384	0.0446	0.0009
ORI*AA	1	0.0323	0.0235	0.0002
ORI*CH	2	0.0188	0.0374	0.0052
PA*AA	2	0.0661	0.0289	0.0122
PA*CH	4	0.0271	0.0286	0.0035
AA*CH	2	0.0065	0.0090	0.0006
ORI*PA*AA	2	0.0082	0.0074	0.0016
ORI*PA*CH	4	0.0136	0.0265	0.0032
ORI*AA*CH	2	0.0159	0.0020	0.0013
PA*AA*CH	4	0.0269	0.0112	0.0005
ORI*PA*AA*CH	4	0.0109	0.0028	0.0006
Error	72	0.0417	0.0246	0.0053
Total	107			
C.V. (%)		17.609	23.318	7.873

*= $p \leq 0.05$; ***= $p \leq 0.0001$. †= número de plántulas emergidas por día; ORI= origen de la semilla; PA= período de almacenamiento; CH= contenido de humedad de la semilla; C.V.= coeficiente de variación.

Para la viabilidad, sólo el periodo de almacenamiento (PA) fue significativo ($p \leq 0.05$), lo que implica que al menos uno de los niveles de éste, causó un efecto diferente de los demás en la variable respuesta (Cuadro 3). En cambio, el porcentaje de germinación mostró significancia ($p \leq 0.0001$) con el origen de las semillas; por otro lado, también hubo efectos significativos ($p \leq 0.05$) del periodo y ambiente de almacenamiento (Cuadro 3). Luego entonces, el comportamiento de dicha

After then, the behavior of this variable is attributed solely to the single effects of at least one of the levels of the aforementioned factors.

Emergency speed as germination, were significant ($p \leq 0.0001$) with the origin factor and by the effect of any of the levels of factor storage environment. Therefore, the comparison of means of the effects of the main factors that were significant (Table 4) was made.

In Table 4, the main effect of some of the factors shown in the variables evaluated to determine the longevity of seeds nanche Tejupilco, State of Mexico and Tuxtepec, Oaxaca, in two different storage environments.

Viability

The behavior of the viability was determined by the storage period, which, as shown in Table 4 the best percentage was obtained when stored for six months. However, the result should be taken with caution, since the staining of tissues was pale pink indicating that the seed had little effect after storage, and therefore, low probability of establishment in the field (Moreno, 1996).

variable se atribuye exclusivamente a los efectos simples de al menos uno de los niveles de los factores antes mencionados.

La velocidad de emergencia al igual que la germinación, fueron significativas ($p \leq 0.0001$) con el factor origen y también por el efecto de alguno de los niveles del factor ambiente de almacenamiento. Por lo anterior se hizo la comparación de medias de los efectos de los factores principales que resultaron significativos (Cuadro 4).

En el Cuadro 4, se muestra el efecto principal de algunos de los factores en las variables evaluadas para determinar la longevidad de las semillas de nanche de Tejupilco, Estado de México y Tuxtepec, Oaxaca, en dos ambientes distintos de almacén.

Cuadro 4. Promedio de las variables evaluadas en semillas de nanche de Tejupilco, Estado de México y Tuxtepec, Oaxaca, almacenadas por tres períodos en dos ambientes distintos.

Table 4. Ratio variables evaluated in seeds nanche Tejupilco, State of Mexico and Tuxtepec, Oaxaca, stock for three periods in two different environments.

Factores	Viabilidad (%)	Germinación (%)	Velocidad de emergencia [†]
Ambiente de almacenamiento			
Cuarto frío a 5 °C			0.11981 b
Tejupilco, Estado de México 19 °C			0.14917 a
DMS			0.0227
Período de almacenamiento			
Cero meses	65.044 c	40.371 a	
Tres meses	81.970 b	37.407 a	
Seis meses	92.361 a	28.333 b	
DMS	7.6461	7.2248	
Origen del germoplasma			
Tejupilco, Estado de México			0.04604 b
Tuxtepec, Oaxaca			0.22294 a
DMS			0.0227

Letra diferente dentro de cada columna, indica diferencia significativa (Tukey $\alpha=0.05$); DMS= diferencia mínima significativa; [†]= número de plántulas emergidas por día.

Viabilidad

El comportamiento de la viabilidad estuvo determinado por el período de almacenamiento, que, como se muestra en el Cuadro 4 el mejor porcentaje se obtuvo cuando se almacenó durante seis meses. Sin embargo, el resultado debe tomarse con reserva, ya que la tinción de los tejidos fue rosa pálido lo que indica que la semilla poseía poco

Germination

Germination was also determined by the storage period and was statistically better when seeds were stored for three months when stored; this behavior correspond to recalcitrant seeds type (Roberts, 1973; Hong and Ellis, 1996). This coincides with what reported Guignard (1991) in seeds nanche in Costa Rica.

Emergency speed

The behavior was statistically influenced by the origin of the germplasm and storage environment factors. The Table 4 shows that the seedlings that emerged were faster Tuxtepec, Oaxaca, when seeds were kept stored at 19 °C. This, firstly due to the behavior of recalcitrant seeds of

tropical origin, which should be stored at temperatures above 10 °C (Hong and Ellis, 1996), and secondly, that the endocarp of the fruit of that geographical origin is thinner and softer than Tejupilco, State of Mexico (Jaimes, 2009); probably the difference in thickness and hardness is due to the degree of domestication of the species (Cubero, 2003), because while in Tejupilco is wild in Tuxtepec species is tolerated and encouraged.

vigor después del almacenamiento, y por lo tanto, baja probabilidad de establecimiento en campo (Moreno, 1996).

Germinación

La germinación también estuvo determinada por el período de almacenamiento y estadísticamente fue mejor cuando las semillas se almacenaron por tres meses y cuando no se almacenaron; dicho comportamiento corresponde al de las semillas de tipo recalcitrante (Roberts, 1973; Hong y Ellis, 1996). Esto coincide con lo que reportó Guignard (1991) en semillas de nance en Costa Rica.

Velocidad de emergencia

El comportamiento estuvo estadísticamente influenciado por los factores origen del germoplasma y ambiente de almacenamiento. En el Cuadro 4 se observa que las plántulas que emergieron con mayor velocidad fueron las de Tuxtepec, Oaxaca, cuando las semillas permanecieron almacenadas a 19 °C. Esto, en primer lugar obedece al comportamiento de las semillas recalcitrantes de origen tropical, que deben almacenarse a temperaturas superiores a 10 °C (Hong y Ellis, 1996), y en segundo término, a que el endocarpio del fruto de este origen geográfico es más delgado y blando que el de Tejupilco, Estado de México (Jaimes, 2009); probablemente la diferencia en espesor y dureza se deba al grado de domesticación de la especie (Cubero, 2003), pues mientras en Tejupilco es silvestre, en Tuxtepec la especie es tolerada y fomentada.

Por lo anterior, se intuye que las semillas de ambos orígenes son poco longevas (seis meses) y que los mejores porcentajes de germinación y velocidad de emergencia ocurren cuando no se almacenan, o bien, cuando se almacenan por tres meses a temperaturas superiores a 5 °C; esto aunado a lo descrito en el Cuadro 2, coincide con el comportamiento de las semillas recalcitrantes (Roberts, 1973; Hong y Ellis, 1996). Con base a los resultados y de acuerdo con Guignard (1991), se considera que las semillas de nanche amarillo de Tejupilco, Estado de México y Tuxtepec, Oaxaca, son recalcitrantes.

Conclusión

Las semillas de nanche de ambos climas, no toleran el almacenamiento a bajas temperaturas, en consecuencia, son de tipo recalcitrante.

Therefore, we sense that the seeds of both origins are short-lived (six months) and that the best germination and emergence rate occur when not stored or when stored for three months at temperatures above 5 °C; this coupled as described in Table 2, matches the behavior of recalcitrant seeds (Roberts, 1973; Hong and Ellis, 1996). Based on the results and according to Guignard (1991) considered that the seeds of yellow nanche Tejupilco, State of Mexico and Tuxtepec, Oaxaca, are recalcitrant.

Conclusion

Nanche seeds of both climates, tolerate storage at low temperatures therefore are recalcitrant type.

End of the English version



Literatura citada

- Berjak, P. and Pammenter, N. W. 2008. Review from *Avicennia* to *Zizania*: Seed recalcitrance in perspective. *Ann. Bot.* 101:213-228.
- Castillo, M. L. E. 2000. Introducción a la estadística experimental. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, Estado de México. 263 p.
- Chin, H. F.; Hor, Y. L. and Mohdlassim, M. B. 1984. Identification of recalcitrant seeds. *Seed Sci. Technol.* 12:429-436.
- Chien, C. T. and Lin, P. 1997. Effects of harvest date on the storability of desiccation-sensitive seeds of *Machilus kusanoi* Hay. *Seed Sci. Technol.* 25:361-371.
- Copeland, O. L. and McDonald, M. B. 2001. Principles of seed science and technology. 4th edition. Kluwer Press. New York. USA. 488 p.
- Cubero, J.I. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. Mundi-Prensa. 2^a. Edición. México, D. F. 567 p.
- Daws, M. I.; Gaméné, C. S.; Glidewell, S. M. and Pritchard, H. W. 2004. Seed mass variation masks a single critical water content in recalcitrant seeds. *Seed Sci. Resch.* 14:185-195.
- Daws, M. I.; Cleland, H.; Chmielarsz, P.; Gorian, F.; Leprince, O. and Mullins, C. E. 2006. Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? *Functional Plant Biology.* 33:59-66.
- Dussert, S.; Chabrilange, N.; Engelmann, F.; Anthony, F.; Louarn, J. and Hamon, S. 2000. Relationship between seed desiccation sensitivity, seed water content at maturity and climatic characteristics of native environments of nine *Coffea* L. species. *Seed Sci. Res.* 10:293-300.

- Ellis, H. R.; Hong, T. D. and Roberts, E. H. 1990. Effect of moisture content and method of rehydration on the susceptibility of pea seeds to imbibitional damage. *Seed Sci. Technol.* 18:131-137.
- Ellis, H. R.; Hong, T. D. and Roberts, E. H. 1991a. An intermediate category of seed storage behaviour? I Coffee. *J. Exp. Bot.* 41:1167-1174.
- Ellis, H. R.; Hong, T. D. and Roberts, E. H. 1991b. An intermediate category of seed storage behavior? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. *J. Exp. Bot.* 42:653-657.
- Ellis, H. R. and Hong, T. D. 1994. Desiccation tolerance and potential longevity of developing seeds of rice (*Oryza sativa* L.). *Ann. Bot.* 73:501-506.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México, D. F. 217 p.
- Guignard, L. M. 1991. Almacenamiento de semillas y descripción sistemática de 42 genotipos de Nanche (*Byrsonima crassifolia* L.) de la colección del CATIE. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba, Costa Rica. 137 p.
- Hong, T. D. and Ellis, H. R. 1990. A comparison of maturation drying, germination, and desiccation tolerance between developing seeds of *Acer pseudoplatanus* L. and *Acer platanoides* L. *New Phytologist.* 116: 589-596.
- Hong, T. D. and Ellis, H. R. 1996. A protocol to determine seed storage behavior. IPGRI. Technical Bulletin No. 1. Engels, J. M. M. and Toll, J. (Eds.). International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 62 p.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2005. International rules for seed testing. Rules. Zurich, Suiza. 300 p.
- Jaimes, A. C. 2009. Caracterización morfológica de fruto y semilla de nanche (*Byrsonima crassifolia* L.) Kunth y su relación con la capacidad germinativa. Tesis de Maestría. Recursos Genéticos y Productividad-Frucicultura. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 107 p.
- Jara, N. L. F. 1997. Secado, procesamiento y almacenamiento de semillas forestales. CATIE. Turrialba, Costa Rica. http://www.google.com.mx/search?hl=es&q=contenido+de+humedad+de+las+semillas&meta=&rlz=1R2GGLL_es&aq=f&oq=. (consultado marzo, 2013). 139 p.
- Magnitskiy, S. V. y Plaza, A. G. 2007. Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agronomía Colombiana.* 25:96-103.
- Maguire, J. D. 1962. Speed of germination-Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2:176-177.
- Martínez, M. E.; Santiaguillo, F. H. J. y Cuevas, S. J. A. 2008. Principales usos del nanche [*Byrsonima crassifolia* L.] H. B. K.]. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, Texcoco, Estado de México. 57 p.
- Moreno, M. E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 3ª (Ed.). México, D. F. 393 p.
- Nieto, A. R. 2007. Frutales nativos, un recurso fitogenético de México. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, Texcoco, Estado de México. 270 p.
- Pennington, T. D. y Sarukhán, J. 2004. Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. Fondo de Cultura Económica (FCE). 3ª Edición México, D. F. 523 p.
- Roberts, E. H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. Technol.* 1:499-514.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute. 2001. SAS user's guide. Statistics. Version 9. SAS Inst., Cary, NC. USA. Quality, and elemental removal. *J. Environ. Qual.* 19:749-756.
- Tweddle, J. C.; Dickie, J. B.; Baskin, C. C. and Baskin, J. M. 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J. Ecol.* 91:294-304.
- Villachica, H. 1996. Frutales y hortalizas promisorias de la Amazonia. Tratado de cooperación Amazónica. Secretaría Pro Tempore. Lima, Perú. 367 p.
- Wood, C. B.; Pritchard, H. W. and Amritphale, D. 2000. Desiccation-induced dormancy in papaya (*Carica papaya* L.) seeds is alleviated by heat shock. *Seed Sci. Res.* 10:135-146.