



Protocolo para germinar y conservar semillas de plantas nativas cubanas: un enfoque con rasgos funcionales de semillas

Protocol for germinate and conserve seeds of native Cuban plants:
an approach with functional seed traits

Jorge A. Sánchez^{1*}, Mayté Pernús^{1*}, Daniel Barrios², Alejandra Gutiérrez³

¹ Instituto de Ecología y Sistemática, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), La Habana, Cuba.

² Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana, Ministerio de Educación Superior (MES), Cuba

³ Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

*Correspondencia: jasanchez@ecologia.cu, mayte.pernus@gmail.com

Recibido: 10 de junio de 2024

Aceptado: 20 de agosto de 2024

CONFLICTO DE INTERESES: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES:

JAS: conceptualización, metodología y redacción del borrador original. **JAS, MP, DB y AG:** validación, análisis formal e investigación. Todos los autores participaron en la revisión y edición final del documento.



Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia Creative Commons



<https://cu-id.com/2402/v223e08>

RESUMEN

El conocimiento ecofisiológico sobre la germinación de plantas silvestres es fundamental para entender los procesos de regeneración de las comunidades vegetales y tener éxito en proyectos de restauración ecológica y otras acciones de conservación de la biodiversidad. Sin embargo, muy poco se conoce sobre la biología de la semilla de la flora de Cuba, y en particular de los endemismos. En el presente trabajo se propone por primera vez un protocolo para mejorar la germinación y conservación de semillas de plantas nativas cubanas conforme a las tendencias actuales para el trabajo con semillas y con base a rasgos funcionales semillas de fácil obtención. El protocolo abarca etapas regenerativas relacionados con la dispersión, persistencia, germinación y establecimiento de plántulas, y consta de seis pasos: 1) caracterización morfofisiológica de las semillas; 2) determinación de requerimientos germinativos; 3) asignación de las clases de dormancia; 4) aplicación de tratamientos pregerminativos; 5) predicción de la conducta de almacenamiento de las semillas, y 6) determinación de rasgos de plántulas. La aplicación de este protocolo facilitará la propagación por semillas, la selección de especies idóneas para restaurar sitios ambientales específicos y ahorrar recursos materiales en etapas de vivero o siembra directa en campo. También con la implementación de esta metodología se lograrían estandarizar los estudios de ecofisiología de la germinación en Cuba, el Caribe Insular y en otras áreas tropicales con poca información sobre semillas de plantas silvestres.

Palabras clave: dormancia seminal, germinación ecológica, plántulas, restauración

ABSTRACT

Ecophysiological knowledge about the germination of wild plants is essential to understand regeneration processes of plant communities, and to be successful in ecological restoration projects and other biodiversity conservation actions. However, very little is known about the seed biology of the flora of Cuba, and in particular about the endemic species. This paper proposes for the first time a protocol to improve the germination and conservation of Cuban native plant seeds in accordance with current trends for working with seeds and based on easily obtained functional seed traits. The protocol covers regenerative stages related to the dispersion, persistence, germination and establishment of seedlings, and consists of six steps: 1) morphophysiological characterization of the seeds; 2) determination of germination requirements; 3) identification of dormancy classes; 4) application of pregermination treatments; 5) prediction of seed storage behavior, and 6) determination of seedling traits. The application of this protocol will facilitate seed propagation, the selection of suitable species to restore specific environmental sites and save material resources in nursery stages or direct seeding in the field. Also with the implementation of this methodology, studies of germination ecophysiology in Cuba, the Insular Caribbean and in other tropical areas with little information on wild plant seeds would be standardized.

Keywords: ecological germination, restoration, seed dormancy, seedlings

INTRODUCCIÓN

La restauración ecológica basada en el empleo de semillas sigue siendo el método más utilizado para recuperar la cobertura vegetal a nivel global (Pedrini y Dixon, 2020; Martyn *et al.*, 2021; Baskin y Baskin, 2022; Dalziel *et al.*, 2022), aun cuando la regeneración natural ha ganado gran popularidad para restaurar grandes extensiones de tierras deforestadas (Chazdon y Guariguata, 2016; FAO, PNUMA, 2020). En este sentido, los estudios de ecofisiología de la germinación con base a rasgos funcionales de semillas, de amplio reconocimiento en la literatura mundial, constituyen el paso inicial para entender los mecanismos de regeneración de las plantas silvestres (Baskin y Baskin, 2014; Jiménez-Alfaro *et al.*, 2016; Saatkamp *et al.*, 2019) y obtener protocolos óptimos de germinación (Erickson *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2019; Kildisheva *et al.*, 2020). También la identificación de rasgos funcionales de semillas resulta relevante para comprender la capacidad de tolerancia de las especies nativas a las invasiones vegetales, en el ensamblaje y dinámica de las comunidades vegetales y para la implementación de ecotecnologías con semillas (Donohue *et al.*, 2010; Gioria y Pyšek, 2017; Baskin y Baskin, 2022). Por último, la cuantificación de rasgos regenerativos de semillas constituye una herramienta básica para la identificación de tipos funcionales de plantas útiles en proyectos de restauración ecológica y otras acciones de conservación (Sánchez *et al.*, 2009a; Clark *et al.*, 2012; Valliere *et al.*, 2021; Jayasuriya y Phartyal, 2023), o bien para buscar patrones de funcionamiento de las plantas bajo escenarios climáticos actuales y futuros (Seal *et al.*, 2017; Sentinella *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022).

Entonces, queda bien establecido que los estudios de biología de la semilla son de vital importancia para la conservación y restauración de ecosistemas. Súmale a esto que también se conoce que, tanto la germinación de las semillas como la supervivencia de las plántulas son etapas tempranas del ciclo de vida de las plantas muy sensibles al cambio de uso de las tierras, a la fragmentación de hábitat y al cambio climático (Sánchez *et al.*, 2011; Walck *et al.*, 2011; Barrios *et al.*, 2021).

En la República de Cuba desde hace más de 60 años se han realizado continuos esfuerzos para incrementar la superficie boscosa, lográndose hasta la actualidad

un índice de boscosidad de 32% (ONEI, 2020). Para llevar a cabo estos planes de reforestación, el sector forestal cubano ha contado fundamentalmente con el Manual de Semillas Forestales creado por un colectivo de autores de la Facultad de Ingeniería Forestal de Pinar del Río (Anónimo, 1983). En este manual se ofrece información básica para recolectar y propagar por semillas 122 especies forestales (77 nativas y 45 exóticas). También más reciente, se emplea un Manual de Vivero Forestal que recomienda 43 especies arbóreas (en su mayoría nativas) para sembrar (Grá *et al.*, 2003). Dichos manuales tienen en común, que la mayoría de las plantas nativas que se proponen para reforestar son de amplia distribución en el Caribe Insular, y se recomiendan muy pocas especies endémicas.

Sin embargo, a pesar de existir esta información básica de semillas, en la actualidad los viveros forestales cubanos utilizan menos de 20 especies arbóreas nativas (Sánchez *et al.*, 2019). Entre ellas se destacan especies con valor maderable y también se siembran frutales cubanos y plantas exóticas de interés para sistemas silvopastoriles (Pérez *et al.*, 2015). Según Sánchez *et al.* (2015a, 2018), esta situación se presenta incluso en aquellos viveros forestales que han tenido apoyo reciente de proyectos internacionales para realizar tareas de restauración ecológica. En este sentido, el escenario más crítico ocurrió en los viveros forestales que apoyaron la restauración de los corredores biológicos propuestos en los cuatros macizos montañosos de intervención del proyecto “Un enfoque paisajístico para conservar ecosistemas montañosos amenazados”, conocido en Cuba como “Conectando Paisajes”. Este proyecto se implementó en Cuba desde el 2015-2022, con la ayuda del Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo y del Fondo para el Ambiente Mundial (Sotolongo, 2016). En la letra del proyecto se propusieron 109 especies nativas multipropósito para la restauración ecológica (o conexión del paisaje), que representan una gran diversidad florística (37 familias botánicas, 80 géneros y 24 endemismos); pero la realidad es que en los viveros forestales de intervención del proyecto solo se sembraron entre dos o cuatro especies nativas, y el resto fueron plantas exóticas.

De este modo, las malas prácticas de restauración ecológica, como el empleo de pocas especies nativas, podrían disminuir la resiliencia de los ecosistemas

forestales tropicales y en consecuencia de los servicios que ofrecen (Cadotte *et al.*, 2011; FAO, PNUMA, 2020). El empleo de pocas especies nativas en los viveros forestales cubanos podría tener diferentes causas, quizás la principal es la crisis económica severa que enfrenta el país desde la década del 90 del pasado siglo. Sin embargo, la otra realidad es que se conoce muy poco sobre la biología de las semillas de las plantas nativas cubanas, en particular sobre rasgos funcionales de semillas relacionados con sus características morfofisiológicas, tiempo y modo de dispersión, clases de dormancia, requerimientos germinativos, tolerancia a la desecación, establecimiento de plántulas, entre otros (Sánchez *et al.*, 2019). Aún menos se conoce sobre el comportamiento de estos rasgos de semillas a nivel de comunidad, entre especies de diferentes grupos funcionales de plantas (pioneras/no pioneras), formas de vida (árboles, arbustos, lianas, hierbas), o especies de diferentes formaciones vegetales (Sánchez *et al.*, 2019).

Además, en Cuba se emplean metodologías no estandarizadas para trabajar con semillas silvestres, lo que hace que muchos resultados sean incorrectos y pocos precisos. Según Sánchez *et al.* (2011, 2015a, b), aparecen errores en la asignación de las clases de dormancia, la identificación de requerimientos germinativos, la aplicación de tratamientos de semillas, y en la descripción de las condiciones de siembra e interpretación de los resultados. Tampoco existe un protocolo de germinación para realizar estudios con semillas de plantas nativas; aunque sí hay normas que rigen las actividades con semillas forestales y de los sistemas agrícolas (ver e.g., Pérez *et al.*, 2015). Estas normas para el caso del sector forestal solo están disponibles para unas pocas especies nativas y se relacionan fundamentalmente con la recolección y manejo de frutos, el almacenamiento de semillas bajo condiciones no óptimas, el análisis de germinadores al aire libre y la certificación de semillas (Pérez *et al.*, 2015).

Esta situación que se presenta en Cuba es muy similar para el resto del Caribe Insular y también para otras áreas tropicales con bajos recursos como son países subdesarrollados e hispanoparlantes de América del Sur (Sánchez *et al.*, 2019). Por otra parte, en ocasiones se publican resultados sobre biología de la semilla en revistas de bajo

impacto científico en español, que, aunque presenten resultados relevantes en su mayoría son ignorados por la comunidad científica de países desarrollados. Quizás la causa fundamental sea la barrera idiomática entre especialistas, o bien el empleo de metodologías no estandarizadas para trabajos con semillas (Visscher *et al.*, 2022; Silveira *et al.*, 2024).

De acuerdo a lo anteriormente comentado, en Cuba se necesita contar con metodologías estandarizadas y actualizadas que permitan emplear de forma sostenible las semillas de las especies autóctonas para programas de restauración y conservación de diversidad biológica. De ahí, que el objetivo principal del presente trabajo fue proponer un protocolo para mejorar la germinación y conservación de plantas nativas con base a rasgos funcionales semillas. El protocolo propuesto se desarrolla en los siguientes seis pasos: 1) caracterización morfofisiológica de las semillas, 2) determinación de requerimientos germinativos, 3) identificación de las clases de dormancia, 4) aplicación de tratamientos pregerminativos óptimos, 5) predicción de la conducta de almacenamiento, y 6) determinación de rasgos de plántulas). La metodología que se presenta no solo facilitará la germinación exitosa de las especies nativas, sino también permitirá la identificación del comportamiento de las plantas en sus primeras etapas de vida (germinación y establecimiento). Esto último, favorecerá la siembra directa de las semillas en campo en dependencia de condiciones ambientales específicas, y con ello la implementación de programas de restauración exitosos. El protocolo igualmente conseguirá ahorrar recursos materiales en tareas de recolección, germinación y conservación de semillas; y proporcionará la comunicación entre científicos de países subdesarrollados y desarrollados dedicados a estudios de biología de semillas, al presentarse los resultados conforme a los estándares internacionales para el trabajo con semillas de plantas silvestres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acerca de las metodologías empleadas

En Cuba, desde la década del 90 del pasado siglo se han generado diversos trabajos científicos de ecofisiología de la germinación de un gran número de plantas nativas, que incluye especies de amplia distribución en el archipiélago cubano y también endemismos de distribución amplia y restringida.

Sánchez *et al.*: Protocolo para la germinación y conservación de semillas

La mayoría de estos resultados se han realizado (o dirigido) por el Grupo de Semillas del Instituto de Ecología y Sistemática (IES), que es el grupo líder en Cuba sobre estudios de biología de las semillas. Estas contribuciones han dado lugar a múltiples publicaciones en revistas seriadas nacionales e internacionales (ver por e.g., Muñoz *et al.*, 1994; 2001; 2004; 2006; Sánchez *et al.*, 2001; 2009a, b; 2011; 2015a, b; 2017; 2019; Montejo *et al.*, 2005; 2014; 2015; Pernús y Sánchez, 2015; 2016; 2017; Pernús *et al.*, 2018; 2020; Gutiérrez *et al.*, 2020; 2021; Barrios *et al.*, 2021), y también a tres manuales prácticos para el empleo de árboles nativos en proyectos de restauración ecológica (Muñoz *et al.*, 2012a, b; Torres-Arias *et al.*, 2022). Sin embargo, como ya se comentó, no existe un protocolo de germinación para realizar estudios con semillas de plantas silvestres, aunque sí se han desarrollado y aplicado diferentes flujos de investigación para realizar estudios de ecofisiología de la germinación (Sánchez *et al.*, 2003; 2004; 2011). Estos esquemas de investigación proponen cómo evaluar los efectos de diferentes factores del ambiente (bióticos y abióticos) sobre la germinación y el establecimiento de las plántulas mediante ensayos multifactoriales, y también diferentes salidas tecnológicas (Anexo 1).

La base teórica y práctica para el desarrollo de estos estudios de ecofisiología de la germinación han sido las contribuciones internacionales de múltiples autores en el campo de la biología de la semilla. En particular, constituyen guías indiscutibles, los trabajos clásicos desarrollados por la ecofisióloga rusa Marianna G. Nikolaeva (Nikolaeva, 1977; 1999; 2004) y por los ecofisiólogos estadounidenses Carol C. Baskin y Jerry M. Baskin (Baskin y Baskin, 2004; 2014; 2022), cuyas contribuciones son relevantes en ecología, biogeografía y evolución de la dormancia y la germinación. De hecho, Baskin y Baskin (1998, 2014) en sus dos monografías principales de semillas a nivel global destinan capítulos para exponer cómo realizar estudios de germinación ecológica y para la identificación de las clases de dormancia. Por su parte, para la aplicación de tecnología de semillas (o tratamientos pregerminativos) se revisaron, principalmente, los resultados obtenidos por el fisiólogo P. A. Henckel y otros colaboradores rusos en el campo de la imbibición parcial de las semillas en agua y su comportamiento frente al estrés ambiental (Henckel, 1964; 1982; Henckel y Tvorus, 1978; 1982). Esta

última información sirvió para desarrollar, combinar y aplicar tratamientos robustecedores de semillas a especies nativas cubanas (Sánchez *et al.*, 2001; 2003; 2020; Pernús y Sánchez, 2015).

El Grupo de Semillas del IES, además, utiliza diferentes metodologías propuestas por Las Normas Internacionales para Ensayos de Semillas (ISTA, por sus siglas en inglés). Estas normas se actualizan todos los años por un comité internacional de expertos y están concebidas fundamentalmente para semillas de especies cultivadas, pero muchos de sus métodos se emplean en plantas silvestres. Entre ellos, sobresalen los ensayos de contenido de humedad, germinación, viabilidad y vigor (Baskin y Baskin, 2014). También se consultaron las 15 páginas informativas del Royal Botanical Gardens, Kew, Reino Unido (<https://brahmsonline.kew.org/msbp/Training/Resources>) creadas en el marco del Proyecto de Banco de Semillas del Milenio y obras recientes para el empleo de semillas silvestres en proyectos de translocación, restauración y conservación *ex situ* (e.g., Pedrini y Dixon, 2020; Di Sacco *et al.*, 2020; Kildisheva *et al.*, 2020; Zanetti *et al.*, 2020; Martyn *et al.*, 2021).

¿Por qué un enfoque con rasgos funcionales de semillas?

La determinación de los rasgos funcionales de semillas informa de los factores ambientales (abióticos o bióticos) que favorecen o limitan el establecimiento de las plantas (Jiménez-Alfaro *et al.*, 2016; Dalziel *et al.*, 2022; Nieto Guzmán *et al.*, 2023). De acuerdo con Saatkamp *et al.* (2019), una buena selección de rasgos funcionales de semillas debe incluir las funciones básicas del espectro ecológico de las semillas, i.e., la dispersión, la persistencia, la germinación y el establecimiento. Dichos rasgos seminales están muy correlacionados entre sí y por consiguiente, un solo rasgo puede influir en todas (o varias) de las funciones ecológicas de las semillas (Westoby *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2013; Moles, 2018). En el presente protocolo se presentan rasgos funcionales de semillas que se reconocen en publicaciones clásicas del tema (Jiménez-Alfaro *et al.*, 2016; Saatkamp *et al.*, 2019); pero también se incluyeron otros rasgos descritos en la literatura científica que ayudan a predecir el funcionamiento ecológico de las plantas (Tabla 1). Los rasgos funcionales de semillas empleados se clasificaron como: 1)

Sánchez *et al.*: Protocolo para la germinación y conservación de semillas

rasgos morfofisiológicos; 2) rasgos de germinación, y 3) rasgos de establecimiento. Dicho agrupamiento de rasgos representa una secuencia experimental lógica que va desde la recolecta de semillas/frutos hasta la obtención de plántulas. Cabe señalar que la

nomenclatura de rasgos morfofisiológicos, empleada también por autores como Saatkamp *et al.* (2019) y Dalziell *et al.* (2022), se corresponde con los rasgos de semillas de tipos morfológicos y biofísicos propuestos por Jiménez-Alfaro *et al.* (2016).

Tabla 1. Principales rasgos funcionales estudiados. El término semilla se refiere a una verdadera semilla, o bien a la unidad completa de dispersión (i.e., semillas más estructuras de frutos). Significado funcional de los rasgos conforme a Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013) y Jiménez-Alfaro *et al.* (2016).

Table 1. Main functional features studied. The term seed refers to a true seed, or to a complete dispersal unit (i.e., seeds plus fruit structures). Functional meaning of traits according to Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013) and Jiménez-Alfaro *et al.* (2016).

Términos	Significado funcional
Rasgos morfofisiológicos	
Viabilidad	Capacidad de producir semillas que germinan. Se asocia con las respuestas de las plantas al disturbio, a la disponibilidad de recursos en el suelo y la competencia.
Contenido de humedad inicial	Germinación, supervivencia, longevidad en el suelo.
Tamaño (o masa) de la semilla	Dispersión, persistencia, germinación, establecimiento de las plántulas.
Forma de la semilla	Capacidad de enterramiento, supervivencia en el suelo.
Distribución de la biomasa seminal	Asignación a las estructuras de defensas o de reservas.
Permeabilidad de la semilla	Tolerancia al fuego, defensa contra los depredadores, persistencia en el suelo, vinculación con la dormancia.
Tipo de embrión	Dormancia, germinación.
Relación embrión: semilla	Dormancia, germinación.
Tolerancia a la desecación	Persistencia en suelo, envejecimiento en diferentes hábitats.
Tiempo de dispersión	Estación de dispersión de las semillas.
Modo de dispersión	Potencial de dispersión desde la planta madre.
Rasgos de germinación	
Capacidad de germinación	Capacidad de colonización, vigor de la semilla, viabilidad.
Velocidad de germinación	Habilidad competitiva, tiempo de reclutamiento.
Sincronización de la germinación	Detección de condiciones idóneas para la germinación.
Temperaturas de germinación (máxima, mínima y óptima)	Adaptación climática, detección estacional, amplitud del nicho de germinación.
Fluctuación de la temperatura	Detección de claros en hábitats naturales, adaptación a la alternancia de temperatura entre el día y la noche.
Requerimiento de choque térmico	Respuesta al fuego, capacidad para germinar después de un choque térmico.
Requerimiento de luz	Persistencia en el suelo, detección de claros, señal de profundidad de las semillas en el suelo, reclutamiento después del disturbio.
Tolerancia a la salinidad	Capacidad para germinar bajo condiciones de salinidad.
Tolerancia a la sequía	Capacidad para germinar bajo condiciones de sequía.
Dormancia seminal	Se debe a características inherentes de las semillas, que evitan la germinación cuando las condiciones ambientales no son favorables para la supervivencia de las plántulas. Existen cinco clases de dormancia que reflejan las condiciones ambientales necesarias para promover su eliminación.
Longevidad seminal	Tiempo de vida de las semillas después de madurar y dispersarse.
Rasgos de establecimiento	
Tipo de plántula	Caracteriza las estrategias regenerativas de las plantas, capacidad de tolerancia a la herbívora, capacidad de persistencia y velocidad de crecimiento.

DESARROLLO

Aspectos generales

Recolección del material vegetal

Todas las metodologías que a continuación se describen deben proceder de recolecta de semillas frescas para evitar sesgos en la información obtenida; y en consecuencia, errores en la interpretación de los resultados. Para ello, se deben identificar plantas saludables de al menos tres individuos por especie, pero si es posible la recolecta debe realizarse de la mayor cantidad de individuos posibles para asegurar la variabilidad genética de la población. Se recolectará directamente de la planta madre de forma completamente al azar y de todas sus partes, solo se tomarán frutos saludables y maduros por medio de una vara telescópica o con las manos. También se pueden recolectar frutos/semillas recién caídos, sobre la superficie del suelo, para su posterior extracción (o limpieza) en el laboratorio (Torres-Arias *et al.*, 2022). En todos los casos se debe tomar no más del 20% de las semillas sanas disponibles, lo que asegura que haya suficientes semillas para la regeneración natural, pero en ocasiones es especialmente crítico para especies en peligro de extinción o que producen pocas semillas y con baja viabilidad (Dayrell *et al.*, 2016; Di Sacco *et al.*, 2020).

Extracción de las semillas

Debido a la gran diversidad de frutos que existen se emplean diversos métodos de extracción de semillas. No obstante, básicamente se utilizan dos métodos, uno para frutos secos (e.g., cápsulas, legumbres, silicuas) y otro para frutos húmedos (e.g., bayas, drupas, siconos). Las semillas procedentes de frutos secos se retiran manualmente del resto del fruto y se colocan en frascos herméticos a temperatura ambiente hasta su uso. Se recomienda nunca secar los frutos al sol para facilitar su apertura, ya que esto puede afectar la viabilidad de las semillas. En el caso de frutos húmedos conviene limpiarlos bajo agua corriente y secar a la sombra durante 72 horas. Los frutos húmedos y carnosos deben procesarse rápidamente debido a que las semillas corren el riesgo de deteriorarse con la fermentación de las cubiertas del fruto, aunque en ocasiones este proceso de fermentación ayuda a la limpieza y obtención de las semillas. Un lector interesado en conocer con mayor profundidad métodos de extracción de semillas puede revisar obras publicadas recientemente por Di Sacco *et al.* (2020), Frischie *et al.* (2020) y Torres-Arias *et al.* (2022).

Caracterización morfofisiológica de las semillas

Viabilidad

Las pruebas de viabilidad se realizan para determinar el porcentaje de semillas que son viables en un lote; por ende, para determinar cuántas semillas tienen potencial para germinar y producir plántulas. Entre los métodos más extendidos, a nivel mundial, se encuentra el ensayo de corte y de tetrazolio (ISTA, 2007; AOSA, 2019), que son técnicas indirectas para determinar viabilidad de las semillas. En contraste, las pruebas simples de germinación a temperatura ambiente se consideran una técnica directa para este propósito.

Ensayo de corte

Es un método muy simple y efectivo para estimar la viabilidad (o calidad) de las semillas. Consiste en dar cortes transversales o longitudinales a la semilla con un bisturí, o con tijeras, con el fin de exponer el embrión. Se recomienda una muestra de 100 semillas escogidas al azar (Pedrini y Dixon, 2020); pero se puede emplear un tamaño menor de la muestra (50, 20 o 10 semillas) en dependencia del tamaño de la recolecta (Pritchard *et al.*, 2004a; Di Sacco *et al.*, 2020). Posterior al corte de las semillas, se deben examinar sus estructuras bajo la lupa o el estereoscopio. Las semillas aparentemente sanas contienen un embrión blanco y firme, y las semillas muertas presentan un embrión suave o gris indicativo de no viabilidad (Baskin y Baskin, 2014; Pedrini y Dixon, 2020). Los resultados de este ensayo se expresan en porcentaje con relación a la cantidad de semillas cortadas. También se pueden registrar con esta técnica las semillas vacías (sin embrión) y las infestadas, estas últimas se reconocen por daños causados por los insectos en la testa (e.g., brúquidos).

Es importante señalar que, aunque existe una creencia generalizada de que las semillas con embriones blancos y firmes son viables, no todos los embriones viables presentan este color. De hecho, hay embriones frescos y viables que pueden variar desde amarillos y marrones hasta verdes, e incluso algunos presentan incrustaciones o glándulas (Fig. 1), lo que podría dar la falsa impresión de que están enfermos o muertos. Para evitar falsos negativos, es necesario que los investigadores se relacionen con la especie y con las estructuras internas de las semillas, previo a la valoración de su viabilidad (Baskin y Baskin, 2014; Frischie *et al.*, 2020). Por último, cuando la prueba

de corte solo se emplea al final del experimento de germinación para estimar la viabilidad del lote (i.e., semillas germinadas y semillas vivas no germinadas) debe hacerse con cautela, pues las condiciones de siembra y/o los tratamientos pregerminativos a los que se someten las semillas, pueden provocar pérdida de la viabilidad seminal. Según Lamont (2022), este error es muy frecuente, y puede afectar tanto la estimación del porcentaje de germinación final con base al número de semillas viables como el porcentaje de semillas dormantes al final del experimento (semillas vivas no germinadas). Por tanto, se recomienda hacer pruebas de corte tanto al inicio como al final del experimento de germinación.

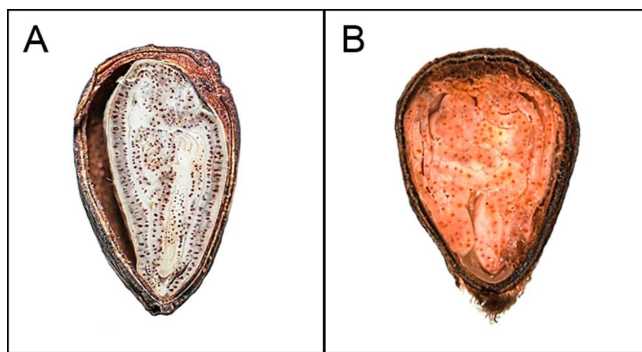


Figura 1. Corte longitudinal de semillas frescas de *Thespesia cubensis* (A) y *Thespesia populnea* (B), donde se muestran los embriones plegados con las glándulas de Gosipol (puntos), que son cavidades típicas de la tribu Gossypieae (Malvaceae) con funciones de defensas contra herbívoros (Fryxell, 1968; Bell *et al.*, 1975). Fotos: Melisa García-Méndez y Jorge A. Sánchez.

Figure 1. Longitudinal section in fresh seeds of *Thespesia cubensis* (A) and *Thespesia populnea* (B), showing the folded embryos with Gosypol glands (points), which are typical cavities of the tribe Gossypieae (Malvaceae) with defense functions against herbivores (Fryxell, 1968; Bell *et al.*, 1975). Photos: Melisa García-Méndez and Jorge A. Sánchez.

Ensayo de tetrazolio

Es uno de los métodos más completos para estimar la viabilidad de las semillas (Cottrell, 1947), aunque consume tiempo, destruye las semillas y requiere experiencia por los investigadores (Baskin y Baskin, 2014). Se puede hacer directamente con embriones aislados o semillas cortadas que se ponen en contacto con solución 2, 3, 5-trifenil cloruro de tetrazolio (TZ) (ISTA, 2007), y se basa en la actividad de enzimas deshidrogenasas (enzimas de respiración) que producen iones de hidrógeno al ser hidratadas las semillas viables. La liberación de estos iones en las células reduce la solución de TZ incolora

a una solución de 2, 3, 5-trifenil formazán (de color rojo), que tiñe tejidos metabólicamente activos (Lakon, 1949). Por el contrario, en zonas de tejidos muertos del embrión, el tetrazolio conserva su color blanco o incoloro, debido a que las enzimas han sido desnaturalizadas o degradadas (Lakon, 1949). De ahí, que la viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración. Los embriones teñidos de rojo carmín o rosa intenso se clasifican como viables, mientras que los teñidos de color blanco o blanco amarillento se consideran no viables. Embriones que se tiñan de rosado pálido uniforme pueden ser clasificados como semillas no viables, pero también como semillas con dormancia profunda. En este último caso la baja actividad metabólica de las semillas dormantes no permite su tinción rosa intenso (Vivrette y Meyr, 2002). La velocidad de reducción del tetrazolio también se ve afectada por la concentración de la solución, la temperatura de incubación, la duración del preacondicionamiento y la tinción y el nivel de deterioro de las semillas (Da Costa y Marcos-Filho, 1994). De este modo, se propone que el procedimiento de tetrazolio debe ser estandarizado para cada especie, para obtener los mejores resultados, y en casos necesarios combinar sus resultados con ensayo de corte para evitar falsos negativos (Baskin y Baskin, 2014). El tetrazolio se emplea en concentraciones entre 0.1 al 1% (Baskin y Baskin, 2014); pero generalmente la concentración más utilizada es al 1% (10 g del tetrazolio en 1000 ml de agua destilada).

Se deben emplear entre 50 a 100 semillas para realizar la prueba de tetrazolio, o bien tres réplicas de 25 o 50 semillas cada una. Los pasos para la tinción de los embriones son los siguientes: 1) sumergir las semillas en agua, durante 12 a 24 horas, para favorecer su hidratación y con ello, la actividad de las enzimas deshidrogenasas; 2) realizar un corte transversal o pinchazo de las semillas para facilitar la entrada de la solución de TZ en el embrión; 3) incubar las semillas en oscuridad por uno o dos días en un rango de 25-35°C, o bien a temperatura ambiente y 4) contar las semillas que muestran tinción en el embrión conforme a la coloración descrita previamente. Los resultados del ensayo de tetrazolio se expresan como porcentaje de semillas viables o porcentajes de semillas muertas con relación al total de semillas empleadas.

Prueba de germinación

Una prueba de germinación a temperatura ambiente bajo luz difusa se considera la técnica más directa para comprobar la viabilidad inicial de las semillas (Davies *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando las semillas no germinan hay que combinar esta prueba con un ensayo de corte para determinar la cantidad de semillas vivas no germinadas (o dormantes) al final del experimento. Se emplean tres réplicas de 25 o 50 semillas cada una y se colocan en placas de Petri sobre papel de filtro humedecido con agua destilada durante cuatro semanas (Baskin y Baskin, 2014), y lo ideal sería emplear las condiciones óptimas de germinación para cada especie. Los resultados de la prueba de germinación se expresan en porcentaje de germinación final con relación al número de semillas sembradas o viables.

Contenido de humedad inicial

El contenido de humedad de las semillas es la cantidad de agua que hay en una semilla, que puede estar presente en forma libre o combinada con los compuestos químicos de las células (Bewley y Black, 1994), y debe ser el primer rasgo morfofisiológico a determinar una vez procesadas las semillas para evitar pérdidas de la humedad. El método gravimétrico es la forma más tradicional para medir el contenido de humedad de las semillas (ISTA, 2007). Esta técnica es destructiva y requiere precisión en el pesaje de las semillas para certificar sus resultados. Consiste en determinar la masa fresca y seca de las semillas en una balanza analítica digital (si es posible con precisión 10^{-4} g). Para registrar la masa seca de las semillas se puede emplear el método de secado a baja temperatura constante a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 17 horas, o bien el método de alta temperatura a $130 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2, 3 o 4 horas (ISTA, 2007). Previo al pesaje, las semillas secas deben permanecer al menos 20 minutos en un desecador (o campana cerrada con gel de sílice) a temperatura ambiente para estabilizar su peso. Esta variable se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$CH(\%) = \frac{MFS - MSS}{MFS} \times 100$$

Donde *CH* representa el contenido de humedad, mientras que *MFS* y *MSS* indican la masa fresca y seca de la semilla, respectivamente. El número de réplicas a utilizar depende básicamente de la cantidad de semillas recolectadas y de su tamaño. Siempre

que el tamaño de las semillas lo permita, la masa fresca y seca de las semillas deben determinarse individualmente (i.e., por unidad de dispersión) con una muestra entre 25 a 100 semillas. Mientras que si son semillas muy pequeñas (< 2 mg) se aconseja tomar tres o cinco réplicas de varias semillas cada una, y el número de semillas por réplica dependerá de la especie. En el caso de que las unidades de dispersión sean frutos de tipo drupa o baya, debe retirarse el mesocarpo previo a la determinación de su masa fresca y seca, y cuando las semillas posean testas muy duras se aconseja romperlas o hacerles cortes para facilitar la determinación del contenido de humedad inicial (Gold y Hay, 2014).

Masa y forma de la semilla**Masa de la semilla**

Es el rasgo seminal más empleado en estudios de ecología funcional de las plantas. Representa la masa de una semilla seca en estufa, y se expresa generalmente en miligramos (mg). El peso seco de las semillas se puede obtener conforme a las metodologías descritas previamente en las normas internacionales para trabajar con semillas (e.g., ver ISTA, 2007); pero también suele determinarse secando las semillas a 80°C durante 48 horas (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2013).

Forma de la semilla

La forma de la semilla se establece por la varianza de las dimensiones seminales mediante el empleo de su longitud, ancho y grosor. Estas variables se determinan con un pie de rey (si es posible con precisión de 0.02 mm) y cada valor de dimensión se divide entre el valor de la longitud; así la longitud es igual a la unidad. Seguidamente se calcula la varianza seminal según el método de Thompson *et al.* (1993), dividiendo la suma de las desviaciones cuadráticas de los valores individuales con relación a la media por el número de dimensiones ($n = 3$):

$$n = 3; \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}$$

De esta manera, una semilla esférica (similar magnitud en longitud, ancho y grosor) presentará un valor de varianza de 0; mientras que en una alargada o achatada su varianza puede ser hasta 0.33. Thompson *et al.* (1993) proponen la media de cinco semillas por especie como un tamaño estándar para calcular la varianza de las semillas.

Sin embargo, dado la variabilidad seminal encontrada a nivel intraespecífico en las especies tropicales, se propone medir al menos 25 semillas por especie (Sánchez *et al.*, 2009b). Las dimensiones de las semillas muy pequeñas (e.g., *Muntingia calabura*) se pueden determinar con microscopio equipado con micrómetro, o bien mediante registro fotográfico y posterior procesamiento digital.

Es necesario destacar que para algunas especies es fácil identificar la longitud de las semillas cuando coincide con su eje más largo y la región hilar (Fig. 2). Sin embargo, en ocasiones para semillas aplanadas, triangulares, subglobosas o globosas no es fácil determinar cuál es su eje mayor. Por lo que se recomienda, tomar como eje mayor de la semilla (o longitud) aquel que coincida con la posición del embrión dentro de la semilla (Fig. 3), excepto para las semillas con embrión de tipo ancho donde el embrión es más ancho que largo. Finalmente, el ancho de la semilla se mide en la porción media y más ancha de la semilla al igual que su grosor (Fig. 2 y 3).

Distribución de la biomasa seminal

Para calcular la fracción de la masa seca seminal destinada a las estructuras de cubiertas (testa/endocarpo) o reservas (embrión/endospermo) se divide el valor de cada componente entre la masa seca total de la unidad de dispersión. La masa seca total de la unidad de dispersión resulta de la suma de sus dos partes componentes (Pritchard *et al.*, 2004b; Daws *et al.*, 2006). Estas variables se calculan mediante las siguientes fórmulas:

$$MRC = \frac{MSC}{MSS} \quad MRR = \frac{MSR}{MSS}$$

Donde *MRC* y *MRR* representan la masa relativa de las cubiertas y las reservas respectivamente, *MSS* se refiere en este caso a la masa seca total de la unidad de dispersión, mientras que *MSC* y *MSR* indican la masa seca de las estructuras de las cubiertas (i.e. endocarpo y testa) y las reservas (i.e. embrión y endospermo) seminales en el mismo orden. Según Daws *et al.* (2006), se debe emplear un mínimo de 8 semillas (o unidad de dispersión) para determinar individualmente estas variables; pero otros autores recomiendan 25 o 100 semillas por especie (Pritchard *et al.*, 2004b; Sánchez *et al.*, 2018). También se puede calcular la fracción destinada a otras partes de la semilla/fruto, por ejemplo al embrión o al

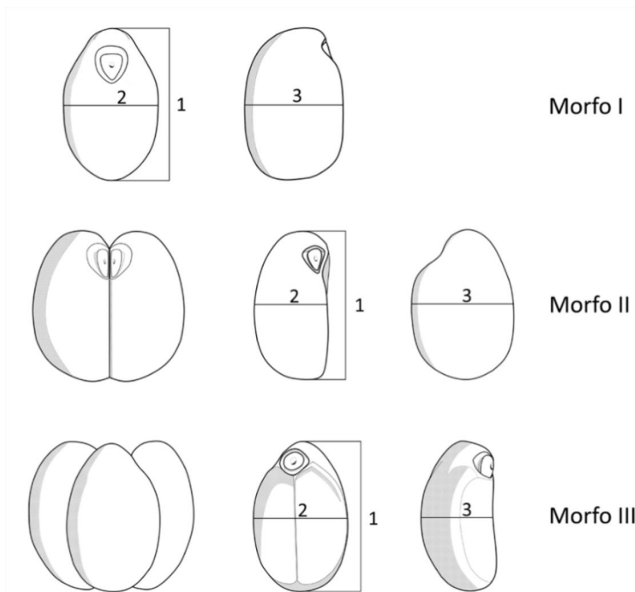


Figura 2. Representación esquemática de los tipos de semillas de *Sideroxylon foetidissimum*. Medidas: 1 (longitud), 2 (ancho) y 3 (grosor). Morfo I: presente en frutos con una semilla, Morfo II: presente en frutos con dos semillas y Morfo III: presente en frutos con tres semillas. Datos tomados de Sánchez *et al.* (1997). Dibujo: Arley Acosta Estévez.

Figure 2. Schematic representation of the seed types of *Sideroxylon foetidissimum*. Measurements: 1 (length), 2 (width) and 3 (thickness). Morpho I: present in fruits with one seed, Morpho II: present in fruits with two seeds and Morpho III: present in fruits with three seeds. Data taken from Sánchez *et al.* (1997). Drawing: Arley Acosta Estevez.

endospermo con relación a la masa seca total de la unidad de dispersión. Los valores resultantes de todas estas variables representan una proporción, pero se pueden multiplicar por 100 para facilitar su interpretación.

Permeabilidad de las semillas

Para determinar si las semillas son permeables al agua, un simple experimento de imbibición (o prueba de permeabilidad) se debe realizar con semillas frescas e intactas (no escarificadas). Esta variable se calcula para tres réplicas de 25 semillas cada una, pero igual se puede establecer para cada unidad de dispersión. Las semillas se colocan en placas Petri sobre papel de filtro humedecido con agua destilada a temperatura ambiente. La masa de las semillas se determina previo a su imbibición en agua (tiempo cero) y posterior a su contacto con el agua durante los tiempos de imbibición que establezca el investigador. Se puede utilizar una secuencia de tiempos (e.g., desde 24 hasta 96 horas)

Sánchez *et al.*: Protocolo para la germinación y conservación de semillas

o un solo tiempo de imbibición (e.g., 24 horas). El porcentaje de incremento en masa de las semillas se calcula por la siguiente fórmula propuesta por Baskin *et al.* (2004):

$$IMS(\%) = \frac{MSH - MFS_0}{MFS_0} \times 100$$

Donde *IMS* (%) se refiere al porcentaje del incremento en masa de la semilla, *MSH* representa la masa de la semilla después del contacto con el agua y *MFS₀* indica la masa fresca inicial de la semilla. Un considerable incremento en la masa de las semillas intactas (> 20%) (Martyn *et al.*, 2021) indica que las cubiertas seminales son permeables al agua; mientras que si las semillas no incrementan en masa, significa que sus cubiertas son impermeables al agua (Baskin *et al.*, 2004). Este comportamiento igualmente se puede visualizar por medio de una curva de imbibición de semillas intactas y escarificadas (Fig. 4). Si las semillas intactas son impermeables al agua, entonces sucede un incremento significativo de su masa cuando son sometidas a tratamientos de escarificación. El incremento en masa de las semillas escarificadas suele ser muy rápido como ocurre en muchas semillas de Fabaceae (Baskin y Baskin, 2014). Pero en otras especies este proceso es lento e irregular, lo cual depende de las características inherentes de las semillas de cada especie (o lote) y de las condiciones ambientales durante la imbibición (Bewley y Black, 1994). Por consiguiente, el típico patrón trifásico de absorción de agua que se presenta en muchas semillas cultivadas sin dormancia (Bewley y Black, 1994), en ocasiones no se observa para semillas de especies silvestres (Pereira *et al.*, 2022).

Tipos de embriones y relación embrión/semilla (E:S)

El tipo de embrión que puede presentar una semilla tiene implicaciones relevantes en la dormancia y germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Mattana *et al.*, 2014). La descripción de los tipos de embriones se efectúa por su morfología (forma) y grado de desarrollo mismo (tamaño) (Martin, 1946; Baskin y Baskin, 2007). Según este criterio de clasificación, Baskin y Baskin (2007) documentan 13 tipos de embriones, que se identifican por la clave dicotómica propuesta por dichos autores (Tabla 2).

El desarrollo del embrión se determina a partir de la relación entre el largo del embrión con

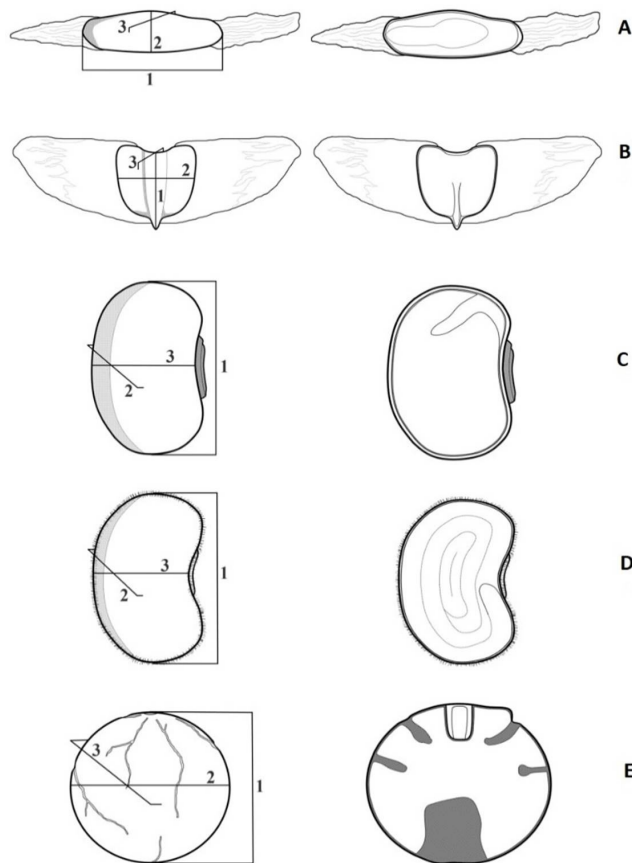


Figura 3. Representación esquemática de semillas de plantas nativas cubanas. (A) *Calycophyllum candidissimum*, (B) *Spirotecoma holguinensis*, (C) *Erythrina cubensis*, (D) *Talipariti elatum*, (E) *Coccothrinax crinita*. Medidas: 1 (longitud), 2 (ancho) y 3 (grosor). Dibujo: Arley Acosta Estévez.

Figure 3. Schematic representation of Cuban native plant seeds. (A) *Calycophyllum candidissimum*, (B) *Spirotecoma holguinensis*, (C) *Erythrina cubensis*, (D) *Talipariti elatum*, (E) *Coccothrinax crinita*. Measurements: 1 (length), 2 (width) and 3 (thickness). Drawing: Arley Acosta Estevez.

respecto al largo interno de la semilla (E:S). Para determinar la relación E:S se puede utilizar una muestra de 20 o 30 semillas a las que se les realizan cortes longitudinales con bisturí o pinzas, para medir la longitud del embrión con respecto al largo de la semilla (Baskin y Baskin, 2007). Se considera que una semilla presenta embrión poco desarrollado cuando este es pequeño, pero tiene órganos diferenciados (i.e., radícula y cotiledones), y la relación entre el tamaño del embrión con respecto al largo total de la semilla (E:S) solo abarca una fracción ($E:S \leq 0.5$). Estos embriones, según su forma, pueden ser rudimentarios, lineales o espatulados, aunque es válido aclarar que no todas las semillas con embriones pequeños (baja E:S)

son subdesarrollados (Baskin y Baskin, 2005). Los embriones subdesarrollados deberán crecer antes de que ocurra la emergencia de la radícula. Por su parte, se considera que un embrión es totalmente desarrollado cuando ocupa más del 50% de la cavidad seminal ($E:S > 0.5$), o la totalidad de la semilla. Los embriones desarrollados pueden ser lineales, espatulados, invertidos, doblados o plegados.

Con la relación $E:S$ también se puede determinar la dinámica de crecimiento del embrión, para la cual se toman los valores de esta relación en diferentes tiempos. Igualmente, el porcentaje de desarrollo del embrión hasta que rompe la testa (o endocarpo) se determina mediante la siguiente fórmula propuesta por Athugala *et al.* (2020):

$$DE(\%) = \frac{ET:ST - E:S}{E:S} \times 100$$

Donde DE (%) representa el porcentaje de desarrollo del embrión, $ET:ST$ indica la relación entre el embrión y la semilla cuando el embrión rompe la testa durante la germinación y $E:S$ es la relación embrión/semilla inicial.

Baskin y Baskin (2014) señalan la importancia que tiene identificar el tipo de embrión de las semillas en la determinación de los mecanismos de dormancia que puede presentar cada especie. Se conoce que semillas con embriones rudimentarios, lineales subdesarrollados o espatulados subdesarrollados pueden tener dormancia morfológica (MD, por sus siglas en inglés) o dormancia morfofisiológica (MPD) (Baskin y Baskin, 2007). En cambio, semillas con embriones de tipo lineal desarrollado, espatulado desarrollado, invertido, doblado y plegado, pueden presentar semillas no dormantes, o con dormancia fisiológica (PD), dormancia física (PY) o dormancia combinada (PY+PD) (Baskin y Baskin, 2007). Por último, especies con embriones anchos, capitados, laterales o periféricos, pueden tener semillas no dormantes o con dormancia fisiológica (Baskin y Baskin, 2014; Martyn *et al.*, 2021).

En Cuba se ha documentado el tipo de embrión en más 100 especies nativas pertenecientes a árboles, arbustos y trepadoras (e.g., ver Montejo *et al.*, 2014; López *et al.*, 2016; Pernús *et al.*, 2020). Se registran 10 de los 13 tipos de embriones conocidos, siendo los tipos invertido, espatulado desarrollado y doblado los que se presentan con mayor frecuencia en especies

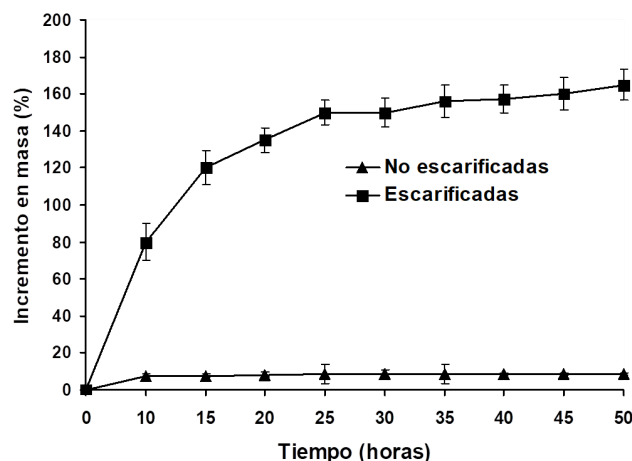


Figura 4. Curva de imbibición de agua de semillas intactas y escarificadas de *Vachellia* spp. (datos no publicados de J. A. Sánchez).

Figure 4. Water imbibition curve of intact and scarified seeds from *Vachellia* spp. (unpublished data from J. A. Sánchez)

arbóreas no pioneras y pioneras (Fig. 5 y 6), aunque en especies no pioneras también se han identificado embriones rudimentarios, lineales no desarrollados y espatulados no desarrollados (Montejo *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2019).

Tiempo y modo de dispersión

Tiempo de dispersión

Se corresponde con la estación de dispersión de las semillas/frutos. El tiempo de dispersión en ocasiones coincide con la época de recolección, pero por lo general el primero puede abarcar varios meses. Albert-Puentes *et al.* (1993) recomiendan observaciones mensuales durante tres o cinco años, a cinco individuos saludables, para determinar el tiempo de dispersión. Sin embargo, en estudios de ecofisiología de la germinación a nivel de comunidad diversos autores (Garwood 1983; Sautu *et al.*, 2006; 2007; Montejo *et al.*, 2015) reconocen grupos de especies según el momento en que ocurre la dispersión (i.e., época de dispersión). Por ejemplo, Sánchez *et al.* (2009b, 2015b) proponen tres grupos de especies conforme a la cantidad y distribución de las lluvias en los bosques siempreverdes tropicales estacionales de la Sierra del Rosario que son: especies que se dispersan en la estación seca (diciembre-mayo), a comienzos de la estación lluviosa (abril-julio), y finales de la estación lluviosa (agosto-noviembre). Esta clasificación se puede ajustar a muchos sitios del archipiélago cubano, dada la

Tabla 2. Clave para la identificación de tipos de embriones según Baskin y Baskin (2014)
Table 2. Key for the identification of embryo types according to Baskin and Baskin (2014).

Endospermo generalmente presente y definitivamente amiláceo (ausente en algunas cactáceas y en <i>Salicornia</i>, <i>Sarcobatus</i> y <i>Salsola</i>, que tienen embriones enrollados en espiral); embrión periférico o al menos parcialmente con respecto al endospermo	Tipo de embrión
Embrión globular, más ancho que largo, semilla globular	Ancho
Embrión capitado o turbinado	Capitado
Embrión basal-lateral o lateral, evidente desde el exterior	Lateral
Embrión evidentemente dicotiledóneo (excepto en <i>Claytonia</i> y <i>Abronia</i>), alargado o grande	Periférico
Endospermo, si está presente, no amiláceo, excepto en algunas formas con embrión lineal	
Embrión no diferenciado en órganos	Indiferenciado
Embrión diferenciado en órganos	
Embrión pequeño con respecto al largo del endospermo y la semilla, la relación E:S ≤ 0.5	
Embrión tan ancho como largo	Rudimentario
Embrión más largo que ancho	Lineal subdesarrollado
Embrión en forma de cuchara	Espatulado subdesarrollado
Embrión grande con respecto al endospermo o el endospermo ausente, la relación E:S > 0.5	
Cotiledones no expandidos, el embrión más largo que ancho	Lineal totalmente desarrollado
Cotiledones expandidos y más anchos que el pedículo	
Embrión recto	
Pedículo no revestido ni envuelto por los cotiledones o solo ligeramente	Espatulado totalmente desarrollado
Pedículo revestido o envuelto por los cotiledones hasta la mitad de su longitud o más	Invertido
Embrión doblado en forma de navaja	Doblado
Embrión con los cotiledones plegados	Plegado

estacionalidad del clima en casi todo el territorio nacional, incluso entre países como sucede para formaciones vegetales similares entre Panamá y Cuba (Sautu *et al.*, 2006; 2007; Sánchez *et al.*, 2015b). No obstante, esto puede cambiar entre formaciones vegetales.

El modo o síndrome de dispersión

Se refiere a los principales mecanismos de dispersión que emplean las especies para dispersar sus diásporas (frutos/semillas). Según Van der Pijl (1982) y Casanoves *et al.* (2011) desde un punto de vista funcional se reconocen cuatro categorías de síndromes de dispersión: anemocoría (viento), autocoría (explosiva y gravedad), hidrocoría (por el agua) y zoocoría (dispersión por animales). Dichas categorías se determinan básicamente por las características morfológicas de las unidades de dispersión y observaciones de campo. También se recomienda que si una especie presenta varios síndromes de dispersión se toma como el principal

aquel con el que recorre mayor distancia (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2013).

Procesamiento de datos

Para calcular muchos de los rasgos morfofisiológicos previamente comentados se puede emplear la planilla de Excel que recientemente proponen Sánchez *et al.* (2024). Esta herramienta calcula 18 rasgos funcionales de semillas con su estadística básica de tendencia central y dispersión.

Determinación de requerimientos germinativos

Experimentos en condiciones de laboratorio

Muchos son los factores del ambiente, abióticos y bióticos que influyen en el funcionamiento de las semillas. Sin embargo, se reconoce que el agua, la temperatura y la iluminación son los principales factores del ambiente edáfico que intervienen en la germinación o eliminación de la dormancia de muchas plantas cultivadas o silvestres (Bewley *et al.*, 2013; Baskin y Baskin, 2014). Por tanto, conocer

Sánchez *et al.*: Protocolo para la germinación y conservación de semillas

cómo dichos factores regulan los mecanismos de germinación permitirá tener mayor éxito en la propagación de las plantas nativas. También sería factible realizar ensayos de germinación bajo condiciones de estrés hídrico y salinidad, e igual conviene determinar los requerimientos germinativos de cada especie en un escenario multifactorial.

Procedimientos experimentales generales

Las semillas recolectadas se mezclan y se siembran dentro de los tres primeros días después de su limpieza. Previo a la siembra se determina la viabilidad inicial de las semillas (por pruebas de Tetrazolio o cortes), y la permeabilidad de las semillas por ensayos de imbibición. Las semillas antes de la siembra se esterilizan con hipoclorito de sodio (1%, 10 min) para prevenir la contaminación fúngica. Cinco réplicas de 25 o 50 semillas cada una se pueden emplear por tratamiento (ISTA, 2007), pero se pueden usar dos réplicas de 13 semillas cada una para pruebas de germinación simples de especies amenazadas que produzcan pocas semillas (Pritchard *et al.*, 2004a). La siembra se realiza sobre papel de filtro en placas de Petri esterilizadas de diferentes tamaños en correspondencia con el tamaño de la semilla. También se pueden emplear como medio de siembra el agar hidrostático al 1%, la arena, el algodón, las toallas de papel y el suelo del sitio de recolecta. La elección de un medio u otro dependerá de las características de las semillas de cada especie y de los objetivos del investigador.

La duración de cada experimento de germinación depende de los intereses del estudio que se realice, aunque está establecido que 30 días es tiempo suficiente para determinar la presencia de dormancia (Baskin y Baskin, 2014). En el caso de las semillas iluminadas, el conteo de germinación se efectúa diariamente, y para semillas expuestas a condiciones continuas de oscuridad total el conteo de la germinación se realiza tres días después de haber concluido la germinación a la luz. La localización de las placas en las incubadoras se debe cambiar regularmente, y el criterio para la germinación es la protrusión visible de la radícula. Al terminar las pruebas de germinación, a todas las semillas que no germinaron se les determina su viabilidad mediante la prueba de TZ o de corte (ISTA, 2007), tal como se describió previamente.

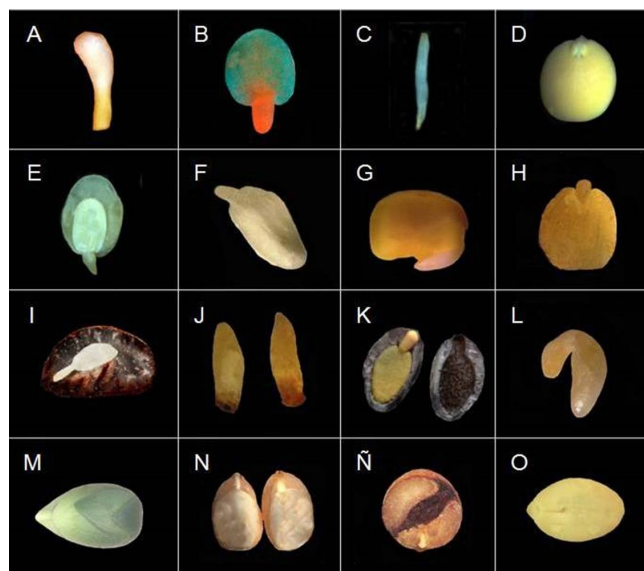


Figura 5. Tipos de embriones en semillas maduras de especies arbóreas no-pioneras: (A) *Acrocomia crispera* (lineal subdesarrollado), (B) *Alchornea latifolia* (espatulado desarrollado), (C) *Ardisia dentata* (lineal desarrollado), (D) *Caesalpinia cubensis* (invertido), (E) *Cayaponia racemosa* (espatulado desarrollado), (F) *Chrysophyllum cainito* (espatulado desarrollado), (G) *Clitoria ternatea* (doblado), (H) *Colubrina arborescens* (invertido), (I) *Diospyros grisebachii* (espatulado desarrollado), (J) *Dracaena cubensis* (lineal subdesarrollado), (K) *Guaiacum officinale* (espatulado desarrollado), (L) *Leptocereus nudiflorus* (periférico), (M) *Ouratea agrophylla* (invertido), (N) *Sideroxylon foetidissimum* (espatulado desarrollado), (Ñ) *Thrinax radiata* (lineal subdesarrollado), (O) *Vachellia belairioides* (invertido). Fotos: Jorge A. Sánchez y Mayté Pernús.

Figure 5. Embryo types in mature seeds of non-pioneer tree species: (A) *Acrocomia crispera* (linear underdeveloped), (B) *Alchornea latifolia* (spatulate fully developed), (C) *Ardisia dentata* (linear fully developed), (D) *Caesalpinia cubensis* (investing), (E) *Cayaponia racemosa* (spatulate fully developed), (F) *Chrysophyllum cainito* (spatulate fully developed), (G) *Clitoria ternatea* (bent), (H) *Colubrina arborescens* (investing), (I) *Diospyros grisebachii* (spatulate fully developed), (J) *Dracaena cubensis* (linear underdeveloped), (K) *Guaiacum officinale* (spatulate fully developed), (L) *Leptocereus nudiflorus* (peripheral), (M) *Ouratea agrophylla* (investing), (N) *Sideroxylon foetidissimum* (spatulate fully developed), (Ñ) *Thrinax radiata* (linear underdeveloped), (O) *Vachellia belairioides* (investing). Photos: Jorge A. Sánchez and Mayté Pernús.

Ensayo en diferentes condiciones de temperaturas y luz

Se recomienda diseñar un experimento factorial que simule las variaciones de luz y temperatura que sufren las semillas al llegar al suelo desde el dosel de la vegetación hasta un claro. En Cuba, para especies de bosques siempreverdes estacionales y bosques semidecíduos se han ensayado cinco escenarios de

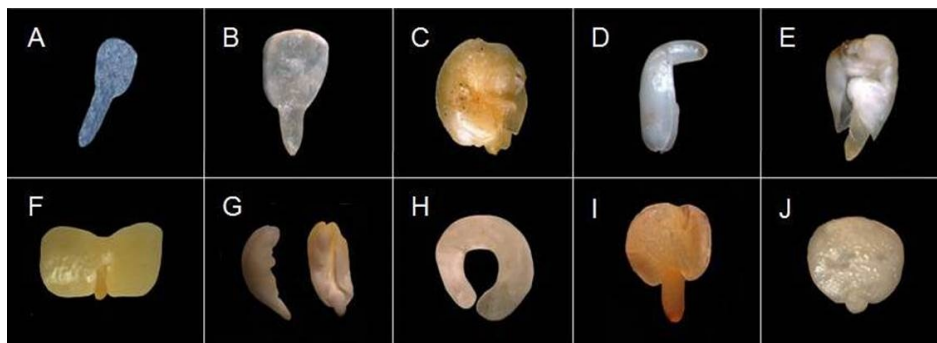


Figura 6. Tipos de embriones en semillas maduras de especies arbóreas pioneras: (A) *Calycophyllum candidissimum* (espatulado), (B) *Cecropia antillarum* (espatulado), (C) *Ceiba pentandra* (plegado), (D) *Ficus maxima* (doblado), (E) *Guazuma ulmifolia* (plegado), (F) *Spirotecoma holguinensis* (invertido), (G) *Talipariti elatum* (plegado), (H) *Trema micranthum* (doblado), (I) *Trichospermum mexicanum* (espatulado), (J) *Zanthoxylum martinicense* (espatulado). Fotos: Jorge A. Sánchez, Mayté Pernús y Alejandra Gutiérrez.

Figure 6. Embryo types in mature seeds of pioneer tree species: (A) *Calycophyllum candidissimum* (spatulate fully developed), (B) *Cecropia antillarum* (spatulate fully developed), (C) *Ceiba pentandra* (folded), (D) *Ficus maxima* (bent), (E) *Guazuma ulmifolia* (folded), (F) *Spirotecoma holguinensis* (investing), (G) *Talipariti elatum* (folded), (H) *Trema micranthum* (bent), (I) *Trichospermum mexicanum* (spatulate fully developed), (J) *Zanthoxylum martinicense* (spatulate fully developed). Photos: Jorge A. Sánchez, Mayté Pernús and Alejandra Gutiérrez.

temperaturas y dos de iluminación. Se emplea una temperatura constante de 25°C y cuatro regímenes de temperatura alterna de 25/30°C, 25/35°C, 25/40°C y 25/45°C (8 horas para la temperatura más alta del termoperíodo y 12 horas a 25°C, con transición entre estas de 4 horas). Los tratamientos de iluminación serán: exposición a la luz (8 horas de aproximadamente 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, longitud de 400-700 nm) coincidente con el período de mayor temperatura dentro de cada termoperíodo; y oscuridad constante, que se logra envolviendo las placas con semillas en dos capas de papel de aluminio.

Por su parte, en el caso de plantas que habitan sitios más abiertos (e.g., matorrales), la alternancia de temperatura a emplear debe ser mayor que la descrita para los bosques cubanos. Por consiguiente, se debe caracterizar el clima del sitio de recolecta, para obtener valores promedios de las temperaturas máximas y mínimas por meses. Dicha información también se puede obtener de estaciones meteorológicas cercanas al área de estudio, o bien de datos bioclimáticos del WorldClim 2 (Fick y Hijmans, 2017). Igualmente, en los ensayos de germinación bajo diferentes condiciones de temperaturas y de luz se pueden emplear temperaturas que simulen posibles escenarios ambientales inducidos por el cambio climático (Sánchez *et al.*, 2011; Dürr *et al.*, 2015) y otras condiciones de iluminación a la que pueden estar expuestas las semillas; por ejemplo, bajo condiciones adversas de iluminación (luz roja lejana)

(Baskin y Baskin, 2014; Sánchez *et al.*, 2017). En caso de que no se cuente con incubadoras refrigeradas los ensayos de germinación se pueden realizar a temperatura ambiente de laboratorio siempre que se registre este factor, así como la iluminación.

Ensayo bajo estrés hídrico y salino

Las semillas se colocan en placas de Petri con papel de filtro que contengan agua destilada estéril o solución osmótica. Para crear estrés hídrico se utilizan soluciones de Manitol y de polietilenglicol (PEG-6000), y para estrés salino soluciones de cloruro de sodio (NaCl) y diferentes concentraciones de agua de mar. El potencial osmótico de las soluciones de Manitol y NaCl a una temperatura fija (seleccionada por el investigador) se calcula por la ecuación de van't Hoff (Swagel *et al.*, 1997), y en el caso del PEG-6000 se utiliza la cantidad de soluto que recomiendan Villela *et al.* (1991) para cada temperatura y potencial osmótico. En los ensayos de germinación se establecen por lo general seis soluciones de los siguientes potenciales: 0 (agua), -0.20, -0.40, -0.60, -0.80 y 1.00 MPa, que representan rangos críticos de potenciales de agua para la germinación (Dürr *et al.*, 2015).

Las placas de Petri deben sellarse para evitar variaciones del potencial osmótico, y en caso de que no se sellen las soluciones se cambiarán en días alternos. Algunos autores también recomiendan no emplear papel de filtro para mantener estables

las soluciones (Hardegree y Emmerich, 1990). Los experimentos bajo estrés hídrico y salino se pueden realizar en una sola temperatura fija del sustrato (Sánchez *et al.*, 2003; 2020; Saedipour, 2010); pero se recomienda emplear diferentes rangos de temperaturas para determinar los efectos combinados de las temperaturas con diferentes potenciales osmóticos sobre la germinación (Flores *et al.*, 2017; Gurvich *et al.*, 2017; Barrios *et al.*, 2021).

Ensayo de avance de diferentes temperaturas

Los ensayos de avance de diferentes temperaturas o *move-along experiment* se diseñaron para determinar los efectos de una secuencia de temperaturas para romper la dormancia profunda en semillas permeables al agua (Baskin y Baskin, 1998; 2003). Por lo tanto, previo al inicio de este experimento se debe determinar si las semillas intactas son permeables o no, y si tienen dormancia. Estos experimentos son fáciles de hacer y no requieren de grandes volúmenes de semillas, pues un mismo lote de semillas se somete a varias secuencias de temperaturas para simular las variaciones de temperaturas que sufren las semillas cuando llegan al suelo. En Cuba, sería conveniente diseñar siembras en el laboratorio que simulen cambios de temperaturas desde finales de la estación de invierno hasta la llegada del verano, para determinar los efectos de la estratificación en caliente sobre la ruptura de la dormancia y la germinación. También se podrían implementar estudios de fenología de la germinación que muestren todas las variaciones ambientales (e.g., temperatura, humedad, luz) que sufren las semillas desde que llegan al suelo hasta su germinación.

Obtención de variables germinativas

Como rasgos germinativos se determinan el porcentaje de germinación final a la luz y a la oscuridad. En las semillas germinadas a la luz se realiza el conteo diario de la germinación, y se establece además el día de inicio de la germinación (DIG) y el coeficiente de velocidad de germinación (CVG) como medida de velocidad de germinación. El CVG se calculará para cada réplica dividiendo el número final de semillas germinadas (N) por la sumatoria del número de semillas germinadas en un día particular (n_i) multiplicado por el número de días correspondiente (d_i) desde el comienzo del experimento (Alm *et al.*, 1993): $CVG = N / \sum n_i d_i$; los valores de CVG se encuentran entre 0 (no

germinación) y 1 (rápida velocidad de germinación). Todos los valores de velocidad de germinación se multiplicarán por 100 para facilitar la interpretación de los datos.

También se pueden determinar las seis variables germinativas que proponen Ranal *et al.* (2009). Estas variables son: porcentaje de germinación final (G), tiempo medio de germinación (TMG, días), velocidad media de germinación (VMG, días⁻¹), coeficiente de variación del tiempo medio de germinación (CVt, %), incertidumbre del proceso de germinación (U, bits) y sincronización del proceso de germinación (Z); que se calculan según las fórmulas descritas por Ranal y Santana (2006) y con la planilla electrónica elaborada por Ranal *et al.* (2009). Altos valores de TMG indican que se requiere mayor tiempo para alcanzar el 50% de las semillas germinadas. Los valores de la velocidad de germinación (VMG) se estiman como el recíproco del tiempo medio (TMG); por tanto, al aumentar el TMG disminuyen los valores de VMG que se encuentran entre 0 (no germinación) y 1 (rápida velocidad de germinación). Por su parte, bajos valores de U indican que la germinación está más concentrada en el tiempo, mientras que los valores Z miden el grado de superposición de la germinación (Ranal y Santana, 2006). Esta última variable puede alcanzar valores entre 1 (la germinación de todas las semillas ocurre en el mismo tiempo) y 0 (cuando al menos dos semillas germinan en tiempos diferentes).

Los porcentajes de germinación final a la luz y a la oscuridad de igual forma permiten calcular el índice de germinación relativa a la luz (GRL), que expresa los requerimientos de luz para la germinación (Milberg *et al.*, 2000). Este índice se calcula según la fórmula: $GRL = GL / (GD + GL)$, donde GL = porcentaje de germinación a la luz, y GD = porcentaje de germinación a la oscuridad. Los valores del índice de GRL varían entre 0 (semillas que germinan solo en la oscuridad) y 1 (semillas que germinan solo a la luz). Para obtener el índice de GRL de cada especie se utilizará el rango de temperatura óptimo (i.e., aquel en el que la especie registra el mayor porcentaje de germinación en la luz u oscuridad). El índice de GRL varía entre 0 (germinación solo en oscuridad) y 1 (germinación solo a la luz) (Milberg *et al.*, 2000). Si el índice GRL es superior a 0.75 se considera que la especie es dependiente de la luz (fotoblástica positiva); si es menor a 0.25 se considera repelente de la luz (fotoblástica negativa); y si el valor está entre

0.25 y 0.75 se establece como indiferente a la luz (Funes *et al.*, 2009).

Experimento en condiciones de vivero o campo

En el caso de los ensayos de germinación en vivero o en campo lo que se evalúa no es el porcentaje de germinación, sino el de emergencia de la plántula. La germinación *sensu stricto* ocurre en el interior de la semilla (Bewley *et al.*, 2013). Desde el punto de vista fisiológico, es suficiente la ruptura de la cubierta seminal por la radícula para dar concluido el proceso germinativo a nivel de laboratorio. Sin embargo, desde el punto de vista agronómico se requiere de plántulas sanas; por consiguiente, el criterio de germinación se amplía hasta la salida del epicótilo y exposición de los cotiledones. Como este proceso ocurre generalmente bajo tierra (i.e., la germinación), el nombre correcto para la evaluación de la cantidad de plántulas que emergen del sustrato, cuando la siembra se realiza en campo es: “pruebas de emergencia de plántulas”, y no como habitualmente se denomina refiriéndose a pruebas de germinación.

Al igual que en los ensayos de germinación en laboratorio, se debe tener en cuenta las simulaciones del ambiente. Es importante localizar o crear en cada área de vivero condiciones que permitan obtener variantes térmicas y lumínicas en los sustratos. Tres condiciones básicas resultan indispensables:

1. Área con plena exposición solar, donde exista un máximo de alternancia de temperatura.
2. Área sombreada, con muy baja fluctuación diaria de temperatura. Se debe escoger un sitio bajo la sombra natural de vegetación arbórea, donde la temperatura se mantenga lo más estable posible. También se puede lograr empleando diferentes mallas de sombra.
3. Área semiprotegida, donde la amplitud del termoperíodo sea moderada. Esta variante puede lograrse realizando dentro de un área a plena exposición solar, un tapado con ramas de árboles. Las variantes térmicas a obtener bajo dicho tapado estarán determinadas por el tipo de rama a emplear y por el cierre o apertura de las mismas; y también por las condiciones que se deseen simular en dependencia de los requerimientos térmicos y lumínicos de las especies a reproducir. En muchas especies tropicales la condición de sombra parcial resulta la más adecuada para la germinación y el crecimiento de las plántulas.

La creación de estas condiciones básicas debe realizarse de manera individual para cada vivero. Es imprescindible hacer mediciones frecuentes de temperatura, no solo para la creación de estos espacios dentro de un vivero, sino para conocer las posibles modificaciones en el porcentaje de plántulas a obtener debido a la importancia de la temperatura en los procesos germinativos y de crecimiento de las plantas. Además, las condiciones térmicas a simular también resultan particulares para cada vivero en dependencia de la época del año y de la localización del mismo. Con los resultados de las pruebas de emergencia de las plántulas también se puede calcular las variables propuestas por Ranal *et al.* (2009).

Asignación de las clases de dormancia

En primer lugar, una especie/lote de semillas se clasificará en dos categorías de acuerdo a la presencia o no de dormancia seminal. Se considerará con semillas dormantes si su germinación comienza después de 28 días bajo condiciones óptimas para la germinación (*sensu* Baskin y Baskin, 2004), si presentan semillas con embriones subdesarrollados y diferenciados (i.e., el embrión debe crecer antes de que emerja la radícula) independientemente del tiempo para iniciar la germinación, o si presentan cubiertas seminales o del fruto impermeables al agua. Por su parte, las semillas serán consideradas no dormantes si el embrión es completamente desarrollado y requieren menos de 28 días para germinar bajo un rango amplio de condiciones ambientales (Baskin y Baskin, 2004).

Seguidamente, las semillas dormantes se clasifican por el sistema de clases de dormancia seminal propuesto por Baskin y Baskin (2004), quienes reconocen cinco clases de dormancia seminal: 1) dormancia fisiológica (PD), aquellas especies con semillas permeables al agua y embrión desarrollado, pero que germinan después de los 28 días; 2) dormancia morfológica (MD), especies con embriones subdesarrollados y que germinan alrededor de los 28 días; 3) dormancia morfofisiológica (MPD), aquellas semillas con embriones subdesarrollados y con dormancia fisiológica (i.e., requieren más de 28 días para iniciar la germinación); 4) dormancia física (PY), aquellas semillas con cubiertas seminales (o del fruto) impermeables al agua, pero con embriones desarrollados y no dormantes y 5) dormancia combinada (PY + PD), son semillas con embriones completamente desarrollados,

pero presentan cubiertas seminales (o del fruto) impermeables al agua y el embrión con dormancia fisiológica. Las semillas que tienen dormancia combinada necesitan más de 28 días para germinar después de ser eliminada la PY. Las abreviaturas de las clases de dormancia se corresponden con los acrónimos conocidos internacionalmente.

Para la identificación de las clases de dormancia existe la clave dicotómica (Tabla 3) desarrollada por Baskin y Baskin (2014). Esta clave emplea información sobre: 1) morfología del embrión, es decir, si el embrión tiene órganos diferenciados (cotiledón (s) o radícula) o solo una masa de células; 2) si el embrión crece o no antes de la germinación; 3) si la unidad de dispersión es permeable; 4) si las semillas tienen la capacidad (o no) para germinar dentro de 4 semanas, y 5) si la emergencia de la radícula y el tallo emergen aproximadamente en el mismo tiempo o si la aparición del tallo se retrasa varias semanas después de la aparición de la radícula.

También se puede identificar la clase de dormancia que puede presentar una especie por su familia botánica. Se conoce que existe una relación muy cercana entre la filogenia y las clases de dormancia. La dormancia de las semillas es un rasgo filogenético altamente conservado (Willis *et al.*, 2014); lo que significa que cuando no se tiene conocimiento sobre la (s) clase (s) de dormancia que ocurre en una especie, se puede inferir con alta fiabilidad por la información disponible para el género, o bien para la familia. De ahí que especies de plantas con relaciones filogenéticas muy cercanas, presentan por lo general, similares clases de dormancia seminal y nichos de germinación (Baskin y Baskin, 2014; Sánchez *et al.*, 2019).

Cabe destacar que en un mismo lote de semillas puede existir una o varias clases de dormancia, y la profundidad de la dormancia (o nivel) puede cambiar dentro de cada clase, dependiendo de las condiciones ambientales a las que están expuestas las plantas madres durante el desarrollo de las semillas (Baskin y Baskin, 2004; Nikolaeva, 2004). La frecuencia de aparición de la dormancia puede ser muy variable, particularmente como ocurre en semillas con PY (Jaganathan, 2016), o bien las semillas pueden presentar dormancia cíclica. Esta última dormancia también llamada dormancia condicional está en función de las señales ambientales que perciben las

semillas y solo aparece en semillas con PD, MPD y PY + PD, donde el componente fisiológico de la dormancia es de tipo no profunda (Baskin y Baskin, 2014). La dormancia PD no profunda es la clase de dormancia más común a nivel mundial (Baskin y Baskin, 2014).

También las semillas sometidas a diferentes condiciones de temperaturas pueden adquirir termodormancia o termoinhibición (Baskin y Baskin, 2014). La termodormancia significa que temperaturas no adecuadas para la germinación (generalmente altas) inducen dormancia en las semillas y que aún transferidas a temperaturas óptimas de germinación no logran germinar (Geneve, 2005). Para lograr que estas semillas germinen se necesita aplicar tratamientos pregerminativos (Baskin y Baskin, 2014). En cambio, la termoinhibición significa que las altas temperaturas inhiben la germinación, pero no inducen dormancia *per se*. Es decir, en la resiembra de estas semillas a bajas temperaturas se logran altos porcentajes de germinación (Baskin y Baskin, 2014). Sin embargo, en Cuba se ha determinado termoinhibición en semillas frescas de *Coccothrinax crinita*, *Trichospermum lessertianum* y de *Solanum torvum* cuando se siembran a temperatura fija de sustrato de 25°C (temperatura no alta para Cuba), pero este fenómeno se elimina cuando se pasan a temperaturas alternas de 25/30°C o 25/35°C (Sánchez y Muñoz, 2004; Pernús y Sánchez, 2017). Por su parte, semillas con potencial para germinar en la oscuridad en algunas temperaturas son inducidas a un estado de dormancia si son mantenidas en la oscuridad por prolongados periodos a temperaturas inapropiadas para la germinación. Este tipo de dormancia inducida se llama fotodormancia, y las semillas en estas condiciones no germinan bajo luz blanca ni responden a la adición de fitohormonas (Baskin y Baskin, 2014).

Finalmente, Baskin y Baskin (2021) presentan un nuevo sistema de clasificación de dormancia de las semillas. Este sistema sigue siendo jerárquico como el propuesto en el 2014 por dichos autores, pero ahora tiene una nueva categoría: subniveles. De esta forma, la nueva clasificación de la dormancia seminal presenta siete categorías (división, subdivisión, clases, subclases, niveles, subniveles y tipos de dormancia), pero se sigue reconociendo que la clase de dormancia es la categoría principal.

Sánchez *et al.*: Protocolo para la germinación y conservación de semillas

Tabla 3. Clave dicotómica para la identificación de clases de dormancia (o carencia de dormancia) en semillas frescas. Con base a Baskin y Baskin (2014).

Table 3. A dichotomous key to classes of dormancy (or lack thereof) in freshly matured seeds. Based on Baskin y Baskin (2014).

1. EMBRIÓN DIFERENCIADO Y COMPLETAMENTE DESARROLLADO	2
2. Las semillas imbiben agua	3
3. La emergencia de la radícula ocurre en menos de 4 semanas	4
4. Luego de la emergencia de la radícula, la emergencia de la plántula ocurre en unos pocos días	SIN DORMANCIA
4. Luego de la emergencia de la radícula, la emergencia de la plántula demora de 3 a 4 semanas o más	DORMANCIA FISIOLÓGICA DEL EPICOTILO
3. La emergencia de la radícula requiere más de 4 semanas	5
5. Luego de la emergencia de la radícula, la emergencia de la plántula ocurre en unos pocos días	DORMANCIA FISIOLÓGICA REGULAR
5. Luego de la emergencia de la radícula, la emergencia de la plántula demora de 3 a 4 semanas o más ...	DORMANCIA FISIOLÓGICA DEL EPICOTILO
2. Las semillas no imbiben agua	6
6. Las semillas escarificadas comienzan rápidamente a imbibir agua (usualmente en 1 día) y germinan en menos de 4 semanas	DORMANCIA FÍSICA
6. Las semillas escarificadas comienzan rápidamente a imbibir agua (usualmente en 1 día) pero no germinan en menos de 4 semanas	DORMANCIA COMBINADA (FÍSICA + FISIOLÓGICA)
1. EMBRIÓN INDIFERENCIADO Y SÍ ES DIFERENCIADO ESTÁ POCO DESARROLLADO	7
7. Embrión no diferenciado	8
8. Luego de la dispersión de la semilla, el embrión se diferencia y crece	9
9. Las semillas germinan en menos de 4 semanas	DORMANCIA MORFOLÓGICA
9. Las semillas no germinan en menos de 4 semanas	DORMANCIA MORFOFISIOLÓGICA
8. Luego de la dispersión de la semilla, el embrión nunca se diferencia	10
10. Las semillas germinan en menos de 4 semanas	DORMANCIA MORFOLÓGICA ESPECIALIZADA
10. Las semillas no germinan en menos de 4 semanas	DORMANCIA MORFOFISIOLÓGICA ESPECIALIZADA
7. Embrión diferenciado pero poco desarrollado	11
11. Después de que la semilla es plantada en un sustrato húmedo, el embrión crece y las semillas germinan en menos de 4 semanas	DORMANCIA MORFOLÓGICA
11. Después de que la semilla es plantada en un sustrato húmedo, el embrión no crece y las semillas no germinan en menos de 4 semanas	DORMANCIA MORFOFISIOLÓGICA

No obstante, el sistema se hizo más complejo porque de 42 posibles mecanismos de dormancia pasó a 74. Los autores interesados en conocer más sobre la dormancia de las semillas a nivel mundial deben de revisar la obra de [Baskin y Baskin \(2014\)](#) donde aparece información para más 13. 000 especies de diferentes zonas de vegetación. Dichos autores encuentran que el 24% de las especies producen semillas no dormantes y el 76% semillas dormantes. Para especies cubanas se puede considerar el trabajo de [Sánchez *et al.* \(2019\)](#) que presenta una compilación de clases de dormancia para 254 especies nativas y para todas las familias botánicas (99) a los que pertenecen los árboles cubanos.

Aplicación de tratamientos pregerminativos

Los tratamientos pregerminativos son todos aquellos procedimientos necesarios para romper la dormancia de las semillas y también para incrementar la germinación de semillas frescas (sin dormancia) y las envejecidas. Los métodos pregerminativos más comunes son los siguientes:

Estratificación

Este tratamiento se utiliza para romper dormancia fisiológica o morfofisiológica, y consiste en colocar las semillas entre estratos que conservan la humedad, comúnmente arena, turba o vermiculita, en frío o calor. También hay tratamientos de estratificación en seco para eliminar dormancia física o dormancia fisiológica.

Escarificación

Un gran número de especies forestales no germinan debido a que la testa o cubierta seminal es dura o impide la entrada de agua (dormancia física), o bien la testa/endocarpo constituye una barrera mecánica para la emergencia de la radícula. Así, la escarificación es cualquier proceso que rompa, raye, altere mecánicamente o ablande las cubiertas de las semillas (o del fruto) para hacerlas permeables al agua y a los gases. Esta puede subdividirse en dos:

Mecánica: Consiste en raspar la cubierta de las semillas con lijas, limas o quebrarlas con un martillo o pinzas. Si es a gran escala se utilizan máquinas especiales como tambores giratorios recubiertos en su interior con papel lija, o combinados con arena gruesa o grava. El tratamiento de escarificación mecánica total se ha empleado para eliminar dormancia fisiológica de tipo no profunda.

Química: La escarificación química consiste en remojar las semillas por períodos breves, en compuestos químicos. Las semillas secas se colocan en recipientes no metálicos y se cubren con ácido sulfúrico concentrado en proporción de una parte de semilla por dos de ácido. Durante el período de tratamiento las semillas deben agitarse regularmente con el fin de obtener resultados uniformes. El tiempo de tratamiento varía según la especie. Al final del período de tratamiento se escurre el ácido y las semillas se lavan con abundante agua.

Lixiviación

Las semillas son remojadas en agua corriente con la finalidad de remover los inhibidores químicos presentes en la cubierta (para eliminar dormancia fisiológica). Este tratamiento también es empleado con el objetivo de ablandar la testa. El tiempo de remojo puede ser de 12, 24, 48 y hasta 72 horas, y en algunos casos, cambiándoles el agua con cierta frecuencia. Habitualmente el remojo se efectúa en agua a temperatura ambiente, pero también se han obtenido buenos resultados con agua caliente. En este último caso, las semillas se colocan en agua hirviendo, retirando inmediatamente el recipiente de la fuente de calor y se deja enfriar hasta que alcance la temperatura ambiente.

Hormonas y otros estimulantes químicos

Existen compuestos que estimulan la germinación, entre los más usados están: ácido giberélico, nitrato de potasio, etileno, citoquinas, entre otros. Todas estas sustancias se emplean a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, dependiendo de la especie.

Tratamientos de hidratación-deshidratación de semillas (H/D)

En Cuba, los tratamientos pregerminativos de H/D se han aplicado en una gran diversidad de especies cultivas y silvestres ([Sánchez y Pernús, 2018](#)). Estos procedimientos se consideran tratamientos pregerminativos de tipo fisiológico porque influyen en muchos eventos bioquímicos-fisiológicos relacionados con la germinación, la longevidad, la dormancia, el crecimiento y los rendimientos de las plantas tanto bajo condiciones ecológicas óptimas como adversas. Dichos tratamientos se conocen fundamentalmente, en la terminología científica, como acondicionadores de semillas o *seed priming*, revigorizadores de

semillas o *seed reinvigoration* y robustedores de semillas o *seed hardening* (Sánchez *et al.*, 2001; 2006), y los procedimientos completos de cómo se aplican dichos tratamientos se describen por Sánchez y Pernús (2018). Básicamente su aplicación se corresponde con el nivel de hidratación que alcanzan las semillas conforme al patrón de imbibición de cada lote de semillas y los procesos pregerminativos que activan. La deshidratación se realizará a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (45% de humedad relativa) durante 48 h hasta alcanzar aproximadamente el contenido inicial de humedad de las semillas (con base a la masa fresca).

Combinación de tratamientos

Muchas son las combinaciones de tratamientos que pueden generarse de acuerdo a los requerimientos de las semillas y a los propósitos de los investigadores; aunque por lo general, se emplean en semillas que tengan más de un tipo de dormancia. Quizás la combinación más común que se pueda aplicar en semillas de especies arbóreas tropicales es un método de escarificación (mecánica o ácida) con un tratamiento pregerminativo de H/D. Ambos tratamientos son efectivos para mejorar la germinación y el posterior desarrollo de las plantas. Sin embargo, las combinaciones de tratamientos suelen ser más complejas, y se basan fundamentalmente en las tecnologías disponibles y en los conocimientos que tengan los productores de semillas sobre ecofisiología vegetal y las respuestas de las plantas al estrés. Estas combinaciones podrían ser muy diversas, pero todas deben ser superiores a un simple tratamiento, para que justifique su coste de producción y mejore las oportunidades de germinación y de establecimiento. Además, en especies silvestres tropicales probablemente se requiera de una estandarización previa para cada lote de semillas, dado la gran diversidad de formas, tamaños y tipos funcionales de semillas que existe en diferentes lotes de una misma especie o variedad, e incluso dentro de un mismo lote.

Flotación

Si bien no constituye un tratamiento pregerminativo *per se*, la separación de las semillas vanas de las semillas llenas es aconsejable como un primer paso previo a la determinación de los requerimientos germinativos, clases de dormancia y aplicación de tratamientos pregerminativos. La semilla vana o vacía por lo general corresponde a la porción que queda flotando en superficie. Pero se debe tener una

noción previa de la especie, pues hay semillas que naturalmente usan las corrientes de agua como medio de dispersión y presentan alta flotabilidad. Siempre es recomendable realizar cortes a las semillas que flotan para conocer si se trata de semillas vanas o semillas con flotabilidad.

Predicción de la conducta de almacenamiento de las semillas

Los bancos de semillas constituyen el principal camino y el más económico para la conservación *ex situ* de la diversidad vegetal, tanto de especies cultivadas como silvestres. Para ello, el primer paso para la formación de bancos de semillas es conocer cómo responden estas al proceso de almacenamiento (Hong y Ellis, 1996). De ahí, que la desecación de semillas, previa a la conservación sin que haya pérdida de viabilidad, es uno de los procesos que se debe garantizar para la conservación a largo plazo. En base a la tolerancia a la desecación las semillas han sido clasificadas como recalcitrantes y ortodoxas. Las semillas recalcitrantes mueren durante el secado por debajo del 20 a 30% de humedad y no pueden ser almacenadas en frío (Chin *et al.*, 1984), a diferencia de las semillas ortodoxas que toleran la deshidratación a bajos contenidos de agua (<7% peso fresco) sin afectar su viabilidad (Roberts, 1973) y se conservan sin ningún inconveniente durante mucho tiempo (Daws *et al.*, 2006; Gold y Hay, 2014). Existe un tercer grupo de semillas que se reconocen como intermedias. Como su nombre lo indica, su comportamiento es intermedio entre las recalcitrantes y las ortodoxas (Hong y Ellis, 1996), pero son tolerantes a la desecación. Por tanto, para algunos autores (e.g., Tweddle *et al.*, 2003) desde un punto de vista ecológico estas semillas también son ortodoxas, lo que implica que pueden ser almacenadas por un tiempo.

A nivel mundial, se estima que solo el 8% (28. 240 especies) tienen semillas recalcitrantes, y en consecuencia la mayoría de las plantas con flores (92%) tienen semillas ortodoxas (Wyse y Dickie, 2017). Sin embargo, determinar si las semillas son ortodoxas o recalcitrantes no es una tarea sencilla ya que los protocolos desarrollados consumen mucho tiempo y semillas, y requieren, además, que las semillas tengan una respuesta germinativa adecuada para llevar a cabo varios ensayos de germinación. En este sentido, el protocolo internacional creado por Hong y Ellis (1996) (Anexo 2) es el más utilizado

para determinar la conducta de almacenamiento de las semillas, y se ha implementado en diversas especies cultivadas y silvestres (Hong *et al.*, 1998). Pero para muchas especies silvestres tropicales resulta una tarea muy difícil obtener gran número de semillas (Daws *et al.*, 2006; Lan *et al.*, 2014), y en particular para aquellas que son raras o amenazadas, que por lo general también producen semillas con profundos mecanismos de dormancia (Pritchard *et al.*, 2004a; Sánchez *et al.*, 2019). De esta manera, cuando la disponibilidad de semillas constituye una limitante, se propone emplear modelos predictivos que combinan múltiples criterios como la ecología de las plantas, su clasificación taxonómica, así como rasgos morfofisiológicos de semillas (Hong y Ellis, 1996; Tweddle *et al.*, 2003; Daws *et al.*, 2006; Pelissari *et al.*, 2018; Wyse y Dickie, 2018; Sommerville *et al.*, 2021) para identificar la más probable respuesta a la desecación de las semillas y por consiguiente su conducta de almacenamiento.

Modelos de tolerancia a la desecación

Para predecir la tolerancia a la desecación (o conducta de almacenamiento) de las semillas de forma rápida y segura se sugieren dos modelos probabilísticos que emplean datos biométricos de las semillas. Uno fue desarrollado por Daws *et al.* (2006) y el otro por Pelissari *et al.* (2018). Ambos modelos se han validado en especies arbóreas tropicales con un amplio rango de masa de la semilla (0.01 mg a 24 g) (e.g., Lan *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2018); aunque el modelo de Daws *et al.* (2006) ha sido más empujado a nivel mundial en diferentes formas de vida (Sommerville *et al.*, 2021).

En el modelo propuesto por Daws *et al.* (2006), la probabilidad de la sensibilidad a la desecación $P(D-S)$ de las semillas se obtiene de acuerdo a la fórmula:

$$P(D-S) = \frac{e^{3,269 - 9,974a + 2,156b}}{1 + e^{3,269 - 9,974a + 2,156b}}$$

Donde a representa la fracción de la masa seminal destinada a las cubiertas seminales (es decir la masa relativa de la cubierta descrita previamente, MRC) y b es el log10 de la masa seca total de la semilla (g).

En el modelo de Pelissari *et al.* (2018), la probabilidad de la tolerancia a la desecación $P(TD)$ de las semillas se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$P(TD) = \frac{1}{(1 + (-0,1627245A + 1,372784B - 0,4599876C + 4,348336))}$$

Donde A representa el contenido humedad inicial de la semilla, B la MRC y C es la masa seca total de la semilla (g).

El modelo propuesto por Pelissari *et al.* (2018), conlleva el cálculo del contenido de humedad inicial del embrión + endospermo. Sin embargo, esta variable se hace difícil establecer para semillas de muchas especies, por lo que Sánchez *et al.* (2018) la sustituyen por el contenido de humedad inicial de las semillas como se describe arriba. De hecho, ambos contenidos de humedad están correlacionados positivamente entre sí (Pelissari *et al.*, 2018; Sánchez *et al.*, 2018); y es más fácil calcular el contenido de humedad de las semillas intactas, que separar previamente el embrión + endospermo, para luego calcular su contenido de humedad. Según Sánchez *et al.* (2018), en 32 especies nativas cubanas los resultados obtenidos son similares para este índice cuando se calculan por ambas variables de contenido de humedad.

En los dos modelos se considera probable que las semillas sean sensibles a la desecación (i.e., recalcitrantes), si los valores de P son superiores a 0.5; y tolerantes a la desecación, si los valores de P son inferiores a 0.5 (i.e., ortodoxas). Un mínimo de 8 a 15 semillas por especie se recomienda por Daws *et al.* (2006) y Pelissari *et al.* (2018), respectivamente para determinar estos modelos; pero Sánchez *et al.* (2018) proponen emplear entre 50 a 100 semillas por especie, pues se conoce que la sensibilidad o tolerancia a la desecación puede ser muy variable entre y dentro lotes de semillas de una misma especie (Ellis *et al.*, 1991; Souza *et al.*, 2016). Estos dos índices también se pueden calcular por la planilla de Excel que propone Sánchez *et al.* (2024).

Esquema predictivo para evaluar la conducta de almacenamiento

Recientemente Sommerville *et al.* (2021) presentan un esquema predictivo para la identificación de la conducta de almacenamiento de las semillas para cuando estas son escasas y difíciles de germinar. El procedimiento original creado por estos autores contiene siete pasos que funcionan como una clave, pero a continuación se muestra una versión

modificada con solo cinco pasos (Tabla 4). También del esquema original se propone sustituir el índice de tolerancia/sensibilidad a la desecación de Daws *et al.* (2006) por el de Pelissari *et al.* (2018), este último tiene mayor precisión en especies arbóreas tropicales (Sánchez *et al.*, 2018).

Si con este esquema no se puede identificar la probable tolerancia/sensibilidad a la desecación de las semillas, se sugiere emplear el protocolo propuesto por Hong y Ellis (1996) si hay suficientes semillas, o bien el protocolo propuesto por Pritchard *et al.* (2004a) que solo consume 100 semillas. No obstante, una simple prueba de tolerancia a la desecación de las semillas igualmente permitirá conocer si son sensibles o tolerantes a la desecación, y en consecuencia su conducta de almacenamiento (Hong y Ellis, 1996; Sommerville *et al.*, 2021; Jaganathan, 2023). Conforme a Hong y Ellis (1996), las semillas que fallan en germinar después de bajar su contenido de humedad hasta 10-12% son recalcitrantes.

Determinación de rasgos de plántulas

Identificación de tipos de plántulas

El tipo funcional de plántula es un carácter categórico que puede ser utilizado para caracterizar la estrategia regenerativa de la planta. Garwood (1996) estableció las siguientes cinco categorías de plántulas basadas en tres características de los cotiledones con importancia ecológica (exposición, posición, función) (Fig. 7): (1) Fanerocotilar epígeo con cotiledones foliáceos (FEF); (2) Fanerocotilar epígeo con cotiledones de tipo reservante (FER); (3) Fanerocotilar hipógeo con cotiledones de tipo reservante (FHR); (4) Criptocotilar hipógeo con cotiledones de tipo reservante (CHR) y (5) Criptocotilar epígeo de tipo reservante (CER). Estos tipos de plántulas son el resultado de la combinación de las diferentes posibilidades en relación a la exposición del cotiledón (criptocotilar o fanerocotilar), posición (epígeo o hipógeo) y a su función (foliáceo o con almacenamiento de reservas).

Tabla 4. Esquema predictivo para evaluar el comportamiento de almacenamiento de las semillas cuando son escasas y difíciles de germinar. DS (sensible a la desecación), DT (tolerante a la desecación). Modificado de Sommerville *et al.* (2021).

Table 4. Predictive scheme to evaluate the storage behavior of seeds when seeds are scarce and difficult to germinate. DS (desiccation sensitive), DT (desiccation tolerant). Modified from Sommerville *et al.* (2021).

Paso 1: Buscar información sobre el comportamiento de almacenamiento de las semillas para otras especies del género		
El comportamiento de almacenamiento en el género es ortodoxo y la especie no probada tiene frutos y semillas de apariencia similar a las especies probadas previamente	Probable DT	
El comportamiento de almacenamiento en el género es recalcitrante y la especie no probada tiene frutos y semillas de apariencia similar a las especies probadas previamente	Probable DS	
El comportamiento de almacenamiento en el género es inconsistente o no se ha probado ninguna especie previamente	Paso 2	
Paso 2: Diseccionar la semilla con un bisturí y examinar la cubierta de la semilla		
Cubierta de la semilla dura, difícil de diseccionar	Paso 3	
Cubierta de la semilla suave, fácil de diseccionar	Paso 4	
Paso 3: Determinar si la cubierta de la semilla es impermeable por una prueba de imbibición		
Cubierta de la semilla impermeable	Probable DT	
Cubierta de la semilla permeable	Paso 4	
Paso 4: Determinar la masa seca y el contenido de humedad de la semilla fresca (sobre la base de la masa fresca)		
Masa seca < 20 mg o contenido de humedad < 20%	Probable DT	
Masa seca ≥ 20 mg y contenido de humedad de la semilla ≥ 50%	Probable DS	
Masa seca ≥ 20 mg y contenido de humedad 20% a < 50%	Paso 5	
Paso 5: Determinar la probabilidad de la tolerancia a la desecación <i>P(TD)</i> (siguiendo a Pelissari <i>et al.</i>, 2018)		
<i>P(TD)</i> > 0.5	Probable DS	
<i>P(TD)</i> < 0.5	Probable DT	

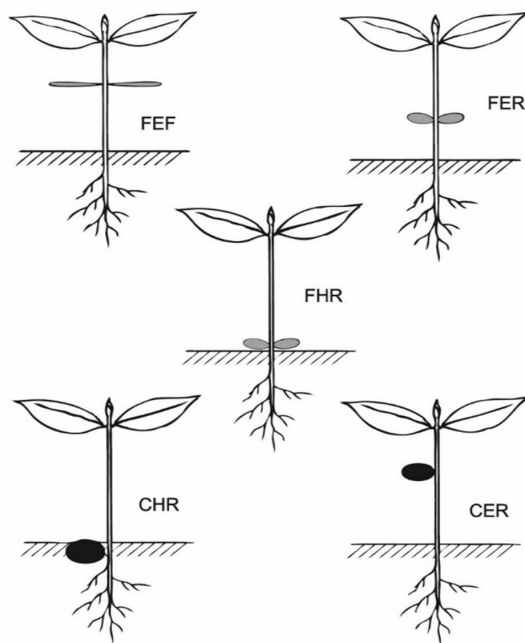


Figura 7. Tipos funcionales de plántulas: FEF: Phanerocotilar epígeo con cotiledones foliáceos; FER: Phanerocotilar epígeo con cotiledones de reserva; FHR: Phanerocotilar hipógeo con cotiledones de reserva; CHR: Criptocotilar hipógeo con cotiledones de reserva; CER: Criptocotilar epígeo con cotiledones de reserva (CER). Modificado de Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013).

Figure 7. Seedling functional types: FEF: phanerocotylar epigeal with foliaceous cotyledons; FER: phanerocotylar epigeal with storage cotyledons; FHR: phanerocotylar hypogeal with storage cotyledons; CHR: cryptocotylar hypogeal with storage cotyledons; CER: cryptocotylar epigeal with storage cotyledons. Modified from Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013).

La morfología de la plántula se describe cuando al menos cinco individuos despliegan las dos primeras hojas verdaderas. Luego de esto las especies son asignadas a una de las categorías indicadas arriba en la presente sección y según se describe a continuación:

Exposición del cotiledón: será fanerocotilar si la cubierta seminal se abre y ambos cotiledones emergen de la semilla; criptocotilar, si permanecen dentro de la semilla.

Posición del cotiledón: será epígeo cuando el hipocótilo se desarrolla al menos 2 cm por encima de la superficie del suelo, e hipógeo cuando el hipocótilo se desarrolla sobre la superficie del suelo.

Función del cotiledón: son cotiledones de reserva cuando son carnosos o gruesos, y cotiledones foliáceos (también llamado paracotiledón) cuando son primariamente fotosintetizantes.

Se conoce que los tipos morfo-funcionales de plántulas se relacionan con otros caracteres de las plantas como tamaño de la semilla, cantidad de nutrientes de las semillas, capacidad de tolerancia a la herbívora (o defoliación), contenido de humedad de las semillas, etc. Por ejemplo, semillas de gran tamaño (o masa seminal) están relacionadas con plántulas con cotiledones de tipo reservante, mientras que semillas pequeñas con cotiledones foliáceos y fotosintetizantes. Las primeras a su vez tienden a presentar menor velocidad de crecimiento relativo y menos capacidad fotosintética. También el tipo de plántula es un rasgo filogenéticamente conservado (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2001), pero puede cambiar dentro un mismo género como ocurre en especies de *Prunus* y *Trichilia* de un bosque siempreverde mesófilo de la Sierra del Rosario (Sánchez *et al.*, 2013). El tipo de plántulas más común en especies arbóreas tropicales es el fanerocotilar epígeo foliáceo (Garwood, 1996; Ibarra-Manríquez *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2013). Por lo general, este tipo funcional de plántula es típico de especies de rápido crecimiento y de estadios primarios de la sucesión como las especies pioneras, pero se presenta también en especies de estadios intermedios o finales de la sucesión.

Por su parte, para el caso de las palmas tres tipos morfológicos de plántulas se reconocen: remota-tubular, remota-ligular y adyacente ligular. Estos tipos de plántulas están determinados principalmente por la extensión variable del peciolo cotiledonar y la presencia o no de lígula (proyección distal de la vaina de la hoja) (Tomlinson, 1960; Henderson, 2006).

Otros rasgos de plántulas

Las plántulas muestran gran variabilidad de vigor y tamaño entre especies arbóreas (Poorter y Garnier, 2007; Sánchez *et al.*, 2011-2012); por tanto, resulta interesante determinar su vigor y características de crecimiento. El vigor de las plántulas recién germinadas se puede determinar por diferentes expresiones biológicas. Sobresale la combinación del porcentaje de germinación final multiplicado por la masa seca o altura de las plántulas (Šerá, 2023).

También se pueden calcular variables de crecimiento, como la altura total, el área foliar, la distribución de la biomasa en las plántulas, la velocidad de crecimiento relativo en función de sus reservas seminales, y el índice de plasticidad fenotípica de las plantas bajo condiciones de estrés (Milberg *et al.*, 1997; Poorter y Garnier, 2007; Valladares *et al.*, 2000). Todas estas variables permiten una caracterización más completa de las plántulas, y por lo general son fáciles de medir.

CONSIDERACIONES FINALES

Pocas son las especies de plantas nativas cubanas que se emplean en los viveros forestales para programas de conservación, reforestación y restauración. Por consiguiente, esto afecta la diversidad funcional de los bosques para hacerle frente, entre otros problemas, a los cambios ambientales extremos y a las especies exóticas invasoras. De este modo, la metodología que se propone con base a rasgos funcionales de semillas no solo permitirá acceder a protocolos óptimos de germinación para cada especie, sino que establecerá las bases ecológicas para desarrollar estrategias de restauración para sitios con diferentes disturbios, tal como se recomienda en la actualidad en programas de restauración con base al empleo de semillas de plantas nativas a nivel mundial (Saatkamp *et al.*, 2019; Kildisheva *et al.*, 2020; Valliere *et al.*, 2021). Este enfoque ecofisiológico también permitirá identificar los principales mecanismos de germinación de especies raras o en peligro de extinción, en particular de aquellas que producen pocas semillas con profundos mecanismos de germinación y difíciles de conservar (especies vegetales conocidas como excepcionales) (Pence *et al.*, 2022).

La obtención de un protocolo óptimo de germinación será relativamente fácil si identificamos los requerimientos germinativos de las especies con semillas no dormantes, que por lo general presentan un rango amplio de germinación bajo diferentes condiciones ambientales (Baskin y Baskin, 2014). Pero si se trabaja con semillas dormantes esta actividad podría ser más difícil, porque las semillas requieren condiciones específicas y existe una gran diversidad de mecanismos de dormancia. Ahora bien, si se aplican muchos de los pasos que se proponen en el presente protocolo, podríamos identificar en primer lugar la dormancia que presenta

la especie y con ello estaríamos en condiciones de buscar un protocolo óptimo de germinación. Esta actividad será sencilla para aquellas especies con PD no profunda y PY, pues un simple tratamiento de escarificación de cubiertas podría resultar útil para eliminar ambas clases de dormancia. En cambio, para las especies que presenten dormancia combinada (morfológica + fisiológica o física + fisiológica), donde el componente fisiológico sea más profundo, será más difícil establecer un protocolo óptimo de germinación. No obstante, una combinación de tratamientos pregerminativos podría implementarse como vía óptima para obtener un protocolo para dichas especies. Se han propuesto varios esquemas metodológicos para identificar las clases de dormancia de las semillas, pero el esquema que proponen Kildisheva *et al.* (2020) es muy práctico (Fig. 8), pues no solo indica cómo identificar las clases de dormancia, sino que también brinda los tratamientos pregerminativos para romper las diferentes clases de dormancia.

La presente contribución deberá ampliar las capacidades para la conservación de especies nativas, en particular con la ejecución de las etapas de caracterización morfofisiológica de las semillas y predicción de la conducta de almacenamiento. Estos pasos de investigación se pueden realizar con pocas semillas (entre 200 a 300 por especie), y sus resultados permiten identificar si estamos en presencia de semillas ortodoxas o recalcitrantes. Por tanto, será de vital importancia para conocer cuáles especies podrán conservarse en bancos tradicionales de semillas y cuáles serán más sensibles al cambio climático (Wyse y Dickie, 2018). También con la caracterización morfofisiológica de las semillas y la identificación de los tipos de plántulas se pueden establecer grupos (o tipos) funcionales de plantas para restaurar diferentes escenarios ambientales (Sánchez *et al.*, 2018; Dalziel *et al.*, 2022). De acuerdo con lo comentado, solo queda implementar el protocolo propuesto para contribuir de forma más práctica y relevante en la conservación del patrimonio vegetal cubano. La intención de esta contribución no es brindar una única receta para realizar estudios de ecofisiología de la germinación. Simplemente se proponen varios caminos ecofisiológicos para lograr protocolos óptimos de germinación y de conservación de semillas.

Sánchez *et al.*: Protocolo para la germinación y conservación de semillas

Figura 8. Esquema metodológico para identificar las clases de dormancia y tratamientos pregerminativos. *Indica problemas con la calidad de las semillas. Tratamientos: CS, calor seco; CH, calor húmedo; E-C/F, estratificación caliente/fría; PS, postmaduración en seco; C-H/D, ciclos de hidratación/deshidratación; EQ, estimulante químico (e.g., etileno, ácido giberélico). Modificado de Kildisheva *et al.* (2020).

Figure 8. Methodological scheme to identify dormancy classes and pregermination treatments. *Indicates problems with seed quality. Treatments: CS, dry heat; CH, wet heat; E-C/F, warm/cold stratification; PS, dry after ripening; C-H/D, wet/dry cycling; EQ, chemical stimulants (e.g., ethylene, gibberellic acid). Modified from Kildisheva *et al.* (2020).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por los proyectos “Diversidad biológica asociada a ecosistemas montañosos de la región occidente y centro de Cuba” y “Acciones para la conservación de especies vegetales del matorral xeromorfo costero y subcostero de Punta Guanós, Matanzas”, del Programa Sectorial Uso Sostenible de los Componentes de la Diversidad

Biológica en Cuba (PS211LH003-030). Los autores agradecen a los colegas Laura A. Montejó y Alejandro Gamboa por la asistencia técnica en el laboratorio y el campo. Especialmente se agradece a Bárbara C. Muñoz y Ramón Orta por los múltiples debates e intercambios científicos sobre metodologías para estudios de ecofisiología de la germinación, y a Arley Acosta Estévez por la confección de los dibujos de semillas.

LITERATURA CITADA

- Albert-Puentes D, López A, Roudná M. 1993. Observaciones fenológicas en árboles tropicales. Consideraciones metodológicas. *Fontqueria* 36: 257-263.
- Alm DM, Stoller EW, Wax LM. 1993. An index model for predicting seed germination and emergence rates. *Weed Technology Journal*. 7: 560-769.
- Anónimo. 1983. Manual de semillas. Facultad de Ingeniería Forestal. Centro Universitario de Pinar del Río. Pinar del Río.
- AOSA (Association of Official Seed Analysts). 2019. Rules for seed testing-principles and procedures. <https://www.analyzeseeds.com/product/aosarules-volume-1-principles-procedures-2019/>.
- Athugala YS, Jayasuriya KMGG, Gunarathe AMTA, Baskin CC. 2020. Seed dormancy of 80 tropical montane forest species in Sri Lanka, the first dormancy profile for a tropical montane forest community. *Plan Biology*. 23: 293-299.
- Barrios D, Flores J, Sánchez JA, González-Torres LR. 2021. Combined effect of temperature and water stress on seed germination of four *Leptocereus* spp. (Cactaceae) from Cuban dry forests. *Plant Species Biology*. 36: 512-522.
- Baskin CC, Baskin JM. 1998. *Seeds: Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, San Diego.
- Baskin CC, Baskin JM. 2003. When breaking seed dormancy is a problem. Try a move-along experiment. *Native Plants Journal*. 4: 17-21.
- Baskin CC, Baskin JM. 2005. Underdeveloped embryos in dwarf seeds and implications for assignment to dormancy class. *Seed Science Research*. 15: 357-360.
- Baskin CC, Baskin JM. 2007. A revision of Martin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. *Seed Science Research* 17: 11-20.
- Baskin CC, Baskin JM. 2014. *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, New York.
- Baskin CC, Baskin JM. 2022. Mimicking the natural thermal environments experienced by seeds to break physiological dormancy to enhance seed testing and seedling production. *Seed Science and Technology*. 50: 21-29.
- Baskin JM, Baskin CC. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. 14: 1-16.
- Baskin JM, Baskin CC. 2021. The great diversity in kinds of seed dormancy: a revision of the Nikolaeva-Baskin classification system for primary seed dormancy. *Seed Science Research*. 31: 249-277.
- Baskin JM, Davis BH, Baskin CC, Gleason SM, Cordell S. 2004. Physical dormancy in seeds of *Dodonaea viscosa* (Sapindales. Sapindaceae) from Hawaii. *Seed Science Research*. 14: 81-90.
- Bell AA, Stipanovic RD, Howell CR, Fryxell PA. 1975. Antimicrobial terpenoids of *Gossypium*: hemigossypol 6-methoxyhemigossypol, and 6-deoxyhemigossypol. *Phytochemistry*. 14: 225-231.
- Bewley JD, Black M. 1994. Seed: physiology of development and germination. *Plenum Press*, New York.
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H. 2013. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Springer, New York.
- Cadotte M W, Carscadden K, Mirotchnick N. 2011. Beyond species: functional diversity and the maintenance of ecological processes and services. *Journal of Applied Ecology*. 48: 1079-1087.
- Casanoves F, Pla L, Di Rienzo JA. 2011. Valoración y análisis de la diversidad funcional y su relación con los servicios ecosistémicos. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE, Turrialba.
- Chazdon RL, Guariguata MR. 2016. Natural regeneration as tool for large-scale forest restoration in the tropics: prospects and challenges. *Biotropica*. 48: 716-730.
- Chin HF, Hor YL, Mohd Lassim MB. 1984. Identification of recalcitrant seeds. *Seed Science and Technology*. 12: 429-436.
- Clark DL, Wilson M, Roberts R, Dunwiddie PW, Stanley A, Kaye TN. 2012. Plant traits – a tool for restoration? *Applied Vegetation Science*. 15: 449-458.
- Cottrell HJ. 1947. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. *Nature*. 159: 748.
- Da Costa NP, Marcos-Filho J. 1994. Alternative methodology for the Tetrazolium test soybean seeds. *Seed Science and Technology*. 22: 9-17.
- Dalziel EL, Lewandowski W, Commander LE, Elliott CP, Erickson TE, Tudor EP, *et al.* 2022. Seed traits inform the germination niche for bio-diverse ecological restoration. *Seed Science and Technology*. 50: 103-124.
- Davies R, Di Sacco A, Newton R. 2015. *Germination testing: procedure and evaluation*. Technical Information Sheet-13a. Millennium Seed Bank Partnership, Kew.

- Daws MI, Garwood NC, Pritchard HW. 2006. Prediction of desiccation sensitivity in seeds of woody species: a probabilistic model based on two seed traits and 104 species. *Annals of Botany*. 97: 667-674.
- Dayrell RLC, Arruda AJ, Buisson E, Silveira FAO. 2016. Overcoming challenges on using native seeds for restoration of megadiverse resource-poor environments: a reply to Madsen *et al.* *Restoration Ecology*. 24. DOI: <http://doi.org/10.1111/rec.12450>.
- Di Sacco A, Way M, León Lobos P, Suárez Ballesteros CI, Díaz Rodríguez JV. 2020. Manual de recolección, procesamiento y conservación de semillas de plantas silvestres. Royal Botanic Gardens, Kew e Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Donohue K, Rubio de Casas R, Burghardt L, Kovach K, Willis CG. 2010. Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 41: 293-319.
- Dürr C, Dickie JB, Yang XY, Pritchard HW. 2015. Ranges of critical temperature and water potential values for the germination of species worldwide: Contribution to a seed trait database. *Agricultural and Forest Meteorology*. 200: 222-232.
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH, Soetisna U. 1991. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. *Seed Science Research*. 1: 99-104.
- Erickson TE, Muñoz-Rojas M, Kildisheva OA, Stokes BA, White SA, Heyes JL, *et al.* 2017. Benefits of adopting seed-based technologies for rehabilitation in the mining sector: a Pilbara perspective. *Australian Journal of Botany*. 65: 646-660.
- FAO, PNUMA. 2020. *El estado de los bosques del mundo 2020. Los bosques, la biodiversidad y las personas*. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca8642es>.
- Fick SE, Hijmans RJ. 2017. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 37: 4302-4315.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*. 171: 501-523.
- Flores J, Pérez RM, Jurado E. 2017. The combined effect of water stress and temperature on seed germination of Chihuahuan Desert species. *Journal of Arid Environments*. 146: 95-98.
- Frischie S, Miller AL, Pedrini S, Kildisheva OA. 2020. Ensuring seed quality in ecological restoration: native seed cleaning and testing. *Restoration Ecology*. 28: S239-S248.
- Fryxell PA. 1968. A redefinition of the tribe Gossypieae. *Botanical Gazette*. 129: 296-308.
- Funes G, Díaz S, Venier P. 2009. La temperatura como principal determinante de la germinación en especies del Chaco seco de Argentina. *Ecología Austral*. 19: 129-138.
- Garwood NC. 1983. Seed germination in a seasonal tropical forest in Panama: a community study. *Ecological Monographs*. 53: 159-181.
- Garwood NC. 1996. Functional morphology of tropical tree seedlings. En: Swaine MD (ed.), *The ecology of tropical tree seedlings*, 59-130, Parthenon, New York.
- Geneve RL. 2005. Some common misconceptions about seed dormancy. *Combined Proceedings International Plant Propagator Society*. 55: 9-12.
- Gioria M, Pyšek P. 2017. Early bird catches the worm: germination as a critical step in plant invasion. *Biological Invasions*. 19: 1055-1080.
- Gold K, Hay F. 2014. *Identifying desiccation-sensitive seeds*. Technical Information Sheet-10. Millennium Seed Bank Partnership, Kew.
- González-Torres LR, Palmarola A, González-Oliva L, Bécquer E, Testé E, Barrios D. 2016. *Lista roja de la flora de Cuba. Bissea 10 (NE1)*: 1-352.
- Grá H, Montalvo JM, Betancourt MA, Duarte J, Cordero E. 2003. *Manual de viveros forestales*. Instituto de Investigaciones Forestales. Ministerio de la Agricultura. La Habana.
- Gurvich DE, Pérez-Sánchez R, Bauk K, Jurado E, Ferrero MC, Funes G, *et al.* 2017. Combined effect of water potential and temperature on seed germination and seedling development of cacti from a mesic Argentine ecosystem. *Flora*. 227: 18-24.
- Gutiérrez A, Pernús M, Sánchez JA. 2020. Rasgos funcionales de semillas de *Calycophyllum candidissimum* (Rubiaceae), árbol pionero del Neotrópico. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 41: 71-77.
- Gutiérrez A, Pernús M, Sánchez JA. 2021. Predicción de la conducta de almacenamiento de semillas de *Calycophyllum candidissimum* (Rubiaceae) por sus rasgos funcionales. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 42: 221-223.
- Hardegree SP, Emmerich WE. 1990. Effect of polyethylene glycol exclusion on the water potential of solution-saturated filter paper. *Plant Physiology*. 92: 462-466.
- Henckel PA, Tvorus EK. 1978. Diferencias en sedimentación de ribosomas de embriones provenientes

- tes de semillas robustecidas o no robustecidas de trigo (en ruso). *Fiziologiya Rastienii*. 2: 236-241.
- Henckel PA, Tvorus EK. 1982. Niveles de ATP y síntesis de proteínas en embriones extraídos de granos de trigo robustecidos o no robustecidos, durante los periodos iniciales de la imbibición (en ruso). *Fiziologiya Rastienii*. 5: 972-977.
- Henckel PA. 1964. Physiology of plants under drought. *Annual Review of Plant Physiology*. 15: 363-386.
- Henckel PA. 1982. Fisiología de la resistencia de las plantas al calor y a la sequía (en ruso). Moscú. Nauka.
- Henderson FM. 2006. Morphology and anatomy of palm seedling. *The Botanical Review*. 72: 273-329.
- Hong TD, Ellis RH. 1996. *A protocol to determine seed storage behaviour*. IPGRI Technical Bulletin No.1. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Hong TD, Linington S, Ellis RH. 1998. *Compendium of information on seed storage behaviour*. Vol.1 and 2. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Ibarra-Manríquez G, Martínez Ramos M, Oyama K. 2001. Seedling functional types in a lowland rain forest in México. *American Journal of Botany*. 88: 1801-1812.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2007. *International rules for seed testing*. Bassersdorf, Zürich.
- Jaganathan GK. 2016. Influence of maternal environment in developing different levels of physical dormancy and its ecological significance. *Plant Ecology*. 217: 71-79.
- Jaganathan GK. 2023. Seed storage, dormancy, and germination behavior in *Lithocarpus glaber* (Fagaceae). *Forest Science*. <https://doi.org/10.1093/forsci/xfad026>.
- Jayasuriya KMG, Phartyal SS. 2023. Dormancy, germination, and associated seed ecological traits of 25 Fabaceae species from northern India. *Plant Biology*. 26: 41-50.
- Jiménez-Alfaro B, Silveira FAO, Fildelis A, Poschlod P, Commander LE. 2016. Seed germination traits can contribute better to plant community ecology. *Journal of Vegetation Science*. 27: 637-645.
- Kildisheva OA, Dixon KW, Silveira FAO, Chapman T, Sacco AD, Mondoni A, *et al.* 2020. Dormancy and germination: making every seed count in restoration. *Restoration Ecology*. 28: S256-S265.
- Lakon G. 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiology*. 24: 389-394.
- Lamont BB. 2022. Seed biologists beware: Estimates of initial viability based on ungerminated seeds at the end of an experiment may be error-prone. *Plant Biology*. 24: 399-403.
- Lan QY, Xia K, Wang XF, Liu JW, Zhao J, Tan YH. 2014. Seed storage behavior of 101 woody species from the tropical rainforest of southern China: test of the seed-coat ratio-seed mass (SCR-SM) model for determination of desiccation sensitivity. *Australian Journal of Botany*. 62: 305-311.
- López D, Gómez JL, Sánchez JA, González JL. 2016. Rasgos de semillas y germinación de *Spirotecoma holguinensis* (Bignoniaceae), árbol endémico de las serpentininas del este de Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 37: 191-201.
- Martin AC. 1946. The comparative internal morphology of seeds. *The American Midland Naturalist*. 36: 513-660.
- Martyn AJ, Offord CA, Meagher PF, Auld T, Bush D, Coates DJ. 2012. Seed dormancy and viability of endangered *Eucalyptus* species in relation to the timing of soil seed bank collection. In: *Seeds of hope*. Springer.
- Mattana E, Stuppy WH, Fraser R, Waller J, Pritchard HW. 2014. Dependency of seed dormancy types on embryo traits and environmental conditions in *Ribes* species. *Plant Biology*. 16: 740-747.
- Milberg P, Andersson L, Thompson K. 2000. Large seeded species are less dependent on light for germination than small-seeded ones. *Seed Science Research*. 10: 99-104.
- Milberg, P. & Lamont, B. B. 1997. Seed/cotyledon size and nutrient content play a major role in early performance of species on nutrient poor soils. *New Phytologist*. 137: 665-672.
- Moles AT. 2018. Being John Harper: Using evolutionary ideas to improve understanding of global patterns in plant traits. *Journal of Ecology*. 106: 1-18.
- Montejo LA, Muñoz BC, Sánchez JA, Gamboa A. 2014. Variabilidad seminal entre las especies de un bosque siempreverde tropical de la Sierra del Rosario, Cuba. *Bosque*. 31: 37-47.
- Montejo LA, Sánchez JA, Muñoz BC, Gamboa A. 2015. Caracterización de semillas de un bosque siempreverde tropical del oeste de Cuba. Correlaciones ecológicas entre rasgos. *Bosque*. 36: 211-222.

- Montejo LA, Sánchez JA, Muñoz BC. 2005. Dormancy and germination in *Talipariti elatum* seeds. *Botanica Complutensis*. 29: 57-62.
- Muñoz BC, Orta R, Calvo E. 1994. Potencial germinativo de semillas de *Conocarpus erectus* L. I. Efecto de la salinidad y temperatura del sustrato. *Ciencias Biológicas*. 26: 88-94.
- Muñoz BC, Sánchez JA, Aguila N, Montejo LA, González AV. 2006. Efecto de la iluminación y el termoperíodo sobre la respuesta germinativa heteromórfica de *Uniola paniculata*. *Acta Botánica Cubana*. 194: 11-16.
- Muñoz BC, Sánchez JA, Almaguer W. 2004. Germinación, dormancia y longevidad potencial de semillas de *Guazuma ulmifolia*. *Pastos y Forrajes*. 27: 25-33.
- Muñoz BC, Sánchez JA, Montejo LA, Herrera P, Gamboa A. 2012a. *Reproducción de plantas nativas y naturalizadas del ecosistema Sabana-Camagüey*. Editorial AMA, La Habana.
- Muñoz BC, Sánchez JA, Montejo LA, Herrera P, Gamboa A. 2012b. *Guía técnica para la reproducción de especies arbóreas pioneras*. Editorial AMA, La Habana.
- Muñoz BC, Sánchez JA, Montejo LA, Herrera R. 2001. Características morfológicas y fisiológicas de semillas de *Pr. Phytologia*.
- Nieto Guzmán MN, Beltrán LC, Rodríguez CH, Roa-Fuentes L. 2023. Functional seed traits as predictors of germination and seedling growth for species with potential for restoration in Caquetá, Colombia. *Trees*. 37: 947-961.
- Nikolaeva MG. 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. En: Khan AA (Ed.), *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*, 51-74, North-Holland, Amsterdam.
- Nikolaeva MG. 1999. Patterns of seed dormancy and germination as related to plant phylogeny and ecological and geographical conditions of their habitats. *Russian Journal of Plant Physiology*. 46: 369-373.
- Nikolaeva MG. 2004. On the criteria to use in studies of seed evolution. *Seed Science Research*. 14: 315-320.
- Offord CA, McKensy ML, Cuneo PV. 2004. Critical review of threatened species collections in the New South Wales Seedbank: implications for ex situ conservation of biodiversity. *Pacific Conservation Biology*. 10: 221-236.
- ONEI (Oficina Nacional de Estadísticas e Información). 2020. Anuario Estadístico de Cuba 2020. Oficina Nacional de Estadística e Información, La Habana. Cuba.
- Oviedo R, Gonzalez-Oliva L. 2015. *Lista nacional de plantas invasoras y potencialmente invasoras en la República de Cuba*. Bissea 9 (NE 2): 5-91.
- Pedrini S, Dixon KW. 2020. International principles and standards for native seeds in ecological restoration. *Restoration Ecology*. 28: S286-S303.
- Pelissari F, Cleiton A, Leite MA, Batista AC, Souza WV, Rocha JM. 2018. A probabilistic model for tropical tree seed desiccation tolerance and storage classification. *New Forests*. 49: 143-158.
- Pence VC, Meyer A, Linsky J, Gratzfeld J, Pritchard HW, Westwood M, *et al.* 2022. Defining exceptional species—A conceptual framework to expand and advance ex situ conservation of plant diversity beyond conventional seed banking. *Biological Conservation*. 266: 109440.
- Pereira WVS, Jose AC, Tonetti OAO, de Melo LA, Faria JMR. 2022. Imbibition curve in forest tree seeds and the triphasic pattern: theory versus practice. *South African Journal of Botany*. 144: 105-114.
- Pérez MH, Sordo L, Álvarez O. 2015. *Guía para el manejo de semillas forestales. Manual Técnico*. Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, La Habana.
- Pérez-Harguindeguy N, Díaz S, Garnier E, Lavorel S, Poorter H, Jaureguiberry P, *et al.* 2013. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*. 61: 167-234.
- Pernús M, Sánchez JA, Álvarez JC, Oviedo R. 2018. Rasgos funcionales de semillas de *Pachira emarginata* (Bombacaceae), un árbol en Peligro Crítico del occidente de Cuba. *Acta Botánica Cubana*. 217: 189-192. <https://cu-id.com/2402/ojs256>
- Pernús M, Sánchez JA, Álvarez JC. 2020. Germination strategies of three palms that coexist in the white sands of western Cuba. *Palms*. 64: 94-101.
- Pernús M, Sánchez JA. 2015. Salinidad en Cuba y tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de semillas. *Pastos y Forrajes*. 38: 379-392.
- Pernús M, Sánchez JA. 2016. Efecto de la procedencia sobre rasgos seminales y requerimientos germinativos de *Cedrela odorata* (Meliaceae). *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 37: 203-211.
- Pernús M, Sánchez JA. 2017. Germinación y dormancia seminal de *Coccothrinax crinita* subsp. *crinita* (Arecaceae), palma endémica del occidente de

- Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 38: 49-56.
- Planos E, Vega R, Guevara A. 2013. *Impacto del cambio climático y medidas de adaptación en Cuba*. Editorial AMA, La Habana.
- Poorter H, Garnier E. 2007. *Ecological significance of inherent variation in relative growth rate and its components*. En: Pugnaire FI, Valladares F. (eds.), *Functional plant ecology*, 67-100, CRC Press, London.
- Pritchard HW, Daws MI, Fletcher BJ, Gaméné CS, Msanga HP, Omondi W. 2004b. Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees. *American Journal of Botany*. 91: 863-870.
- Pritchard HW, Wood CB, Hodges S, Vautier HJ. 2004a. 100-seed test for desiccation tolerance and germination: a case study on eight tropical palm species. *Seed Science and Technology*. 32: 393-403.
- Ranal MA, Santana DG, Ferreira WR, Mendes-Rodrigues C. 2009. Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. *Brazilian Journal of Botany*. 32: 849-855.
- Ranal MA, Santana DG. 2006. How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*. 29: 1-11.
- Roberts EH. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*. 1: 499-514.
- Saatkamp A, Cochrane A, Commander L, Guja LK, Jimenez-Alfaro B, Larson J. *et al.* 2019. A research agenda for seed-trait functional ecology. *New Phytologist*. 221: 1764-1775.
- SaediPour S. 2010. Comparative Effects of NaCl and polyethylene Glycol on germination and early seedling growth of Safflower. *International Journal of Applied Agricultural Research*. 5: 251-260.
- Sánchez JA, Gutiérrez A, Pernús M. 2024. Planilla de Excel para cálculo rápido de rasgos morfofisiológicos de semillas. *Acta Botánica Cubana*. 223. <https://cu-id.com/2402/v223e04>.
- Sánchez JA, Martínez J, Pernús M, Barrios D. 2017. Efecto de la temperatura y la iluminación sobre la germinación de semillas no dormantes de *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae). *Acta Botánica Cubana*. 216: 116-121. <https://cu-id.com/2402/ojs175>
- Sánchez JA, Montejo LA, Gamboa A, Albert-Puentes D, Hernández F. 2015b. Germinación y dormancia de arbustos y trepadoras del bosque siempreverde de la Sierra del Rosario, Cuba. *Pastos y Forrajes*. 38: 11-28.
- Sánchez JA, Montejo LA, Hernández L. 2013. Efectos del tamaño de la semilla y la herbivoría sobre el establecimiento de plántulas arbóreas en diferentes suelos. *Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*. 3: 1-29.
- Sánchez JA, Montejo LA, Pernús M. 2015a. Germinación de nuestras semillas: factor de éxito en la restauración ecológica. En: Menéndez L, Arellano M, Alcolado PM. (eds.), *¿Tendremos desarrollo socioeconómico sin conservación de la biodiversidad? Experiencias del Proyecto Sabana-Camagüey en paisajes productivos*, 130-145, Editorial AMA. La Habana.
- Sánchez JA, Muñoz BC, Hernández L, Montejo LA, Suárez A, Torres-Arias Y. 2006. Tratamientos robustecedores de semillas para mejorar la emergencia y el crecimiento de *Trichospermum mexicanum*, árbol tropical pionero. *Agronomía Costarricense*. 30: 7-26.
- Sánchez JA, Muñoz BC, Montejo L, Herrera RH. 2009a. Ecological grouping of tropical trees in an evergreen forest of the Sierra del Rosario, Cuba. *Acta Botánica Cubana*. 204: 14-23.
- Sánchez JA, Muñoz BC, Montejo LA, Lescaille M, Herrera-Peraza RA. 2011-2012. Tamaño y nutrientes de semillas en 32 especies arbóreas de un bosque tropical siempreverde de Cuba y su relación con el establecimiento de las plántulas. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 32-33: 181-204.
- Sánchez JA, Muñoz BC, Montejo LA. 2003. Efectos de tratamientos robustecedores de semillas sobre la germinación y establecimiento de árboles pioneros bajo condiciones de estrés. *Ecotropicos*. 16: 91-112.
- Sánchez JA, Muñoz BC, Montejo LA. 2009b. Rasgos de semillas de árboles en un bosque siempreverde tropical de la Sierra del Rosario, Cuba. *Pastos y Forrajes*. 32: 141-16.
- Sánchez JA, Muñoz BC, Orta R, Calvo E, Herrera-Peraza RA. 1997. Correlación entre el heteromorfismo somático y la respuesta germinativa de semillas de *Mastichodendron foetidissimum* (Jacq.) Cronq. *Acta Botánica Mexicana*. 38: 1-7.
- Sánchez JA, Muñoz BC. 2004. Effects of hydration and scarification treatments on the germination of *Trichospermum mexicanum*. *Seed Science and Technology*. 32: 621-627.
- Sánchez JA, Orta R, Muñoz BC. 2001. Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. *Agronomía Costarricense*. 25: 67-92.

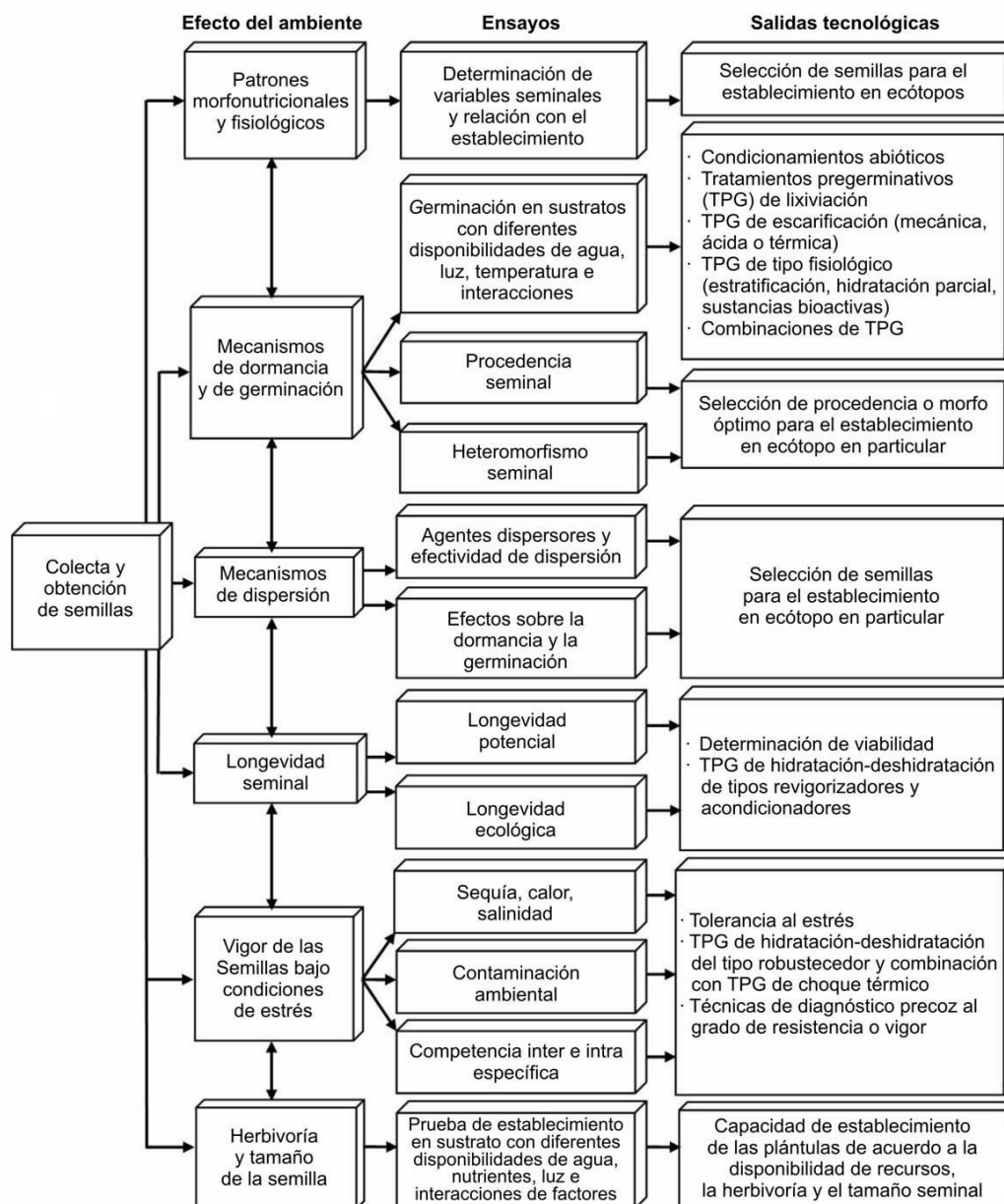
- Sánchez JA, Pernús M, Martínez J. 2020. Tratamientos de semillas para mejorar la germinación de *Guazuma ulmifolia* bajo estrés hídrico y calórico: comparación entre árboles tropicales pioneros. *Revista Jardín Botánico Nacional*. 41: 93-108.
- Sánchez JA, Pernús M, Torres-Arias Y, Barrios D, Dupuig Y. 2019. Dormancia y germinación en semillas de árboles y arbustos de Cuba: implicaciones para la restauración ecológica. *Acta Botánica Cubana*. 218: 77-108. <https://cu-id.com/2402/ojs290>
- Sánchez JA, Pernús M, Torres-Arias Y, Furrázola E, Oviedo R, Álvarez JC. 2018. Características regenerativas de árboles tropicales para la restauración ecológica de ecosistemas limítrofes al manglar. *Acta Botánica Cubana*. 217: 170-188. <https://cu-id.com/2402/ojs242>
- Sánchez JA, Pernús M. 2018. Tratamientos de semillas. En: Sánchez JA, Furrázola E. (eds.), *Ecotecnologías para la restauración ecológica: los tratamientos de semillas y micorrizas*, 5-54, Editorial Academia, La Habana.
- Sánchez JA, Suárez AG, Montejo LA, Muñoz BC. 2011. El cambio climático y las semillas de las plantas nativas cubanas. *Acta Botánica Cubana*. 214: 38-50.
- Sautu A, Baskin JM, Baskin CC, Condit R. 2006. Studies on the seed biology of 100 native species of tree in a seasonal moist tropical forest, Panama, Central America. *Forest Ecology and Management*. 234: 245-263.
- Sautu A, Baskin JM, Baskin CC, Deago J, Condit R. 2007. Classification and ecological relationships of seed dormancy in a seasonal moist tropical forest, Panama, Central America. *Seed Science Research*. 17: 127-140.
- Seal CE, Daws MI, Joel F, Ortega-Baes P, Galíndez G, León-Lobos P, *et al.* 2017. Thermal buffering capacity of the germination phenotype across the environmental envelope of the Cactaceae. *Global Change Biology*. 23: 5309-5317.
- Sentinella AT, Warton DI, Sherwin WB, Offord CA, Moles AT. 2020. Tropical plants do not have narrower temperature tolerances, but are more at risk from warming because they are close to their upper thermal limits. *Global Ecology and Biogeography*. 29: 1387-1398.
- Šerá B. 2023. Methodological contribution on seed germination and seedling initial growth tests in wild plants. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanic Cluj-Napoca*. 51: DOI: <http://doi.org/10.15835/nbha51213164>.
- Silveira FAO, Fuzessy L, Phartyal SS, Dayrell RLC, Vandellook F, Jerónimo Vázquez-Ramírez Jerónimo, *et al.* 2024. Overcoming major barriers in seed ecology research in developing countries. *Seed Science Research*. 33: 1-10.
- Sommerville KD, Errington G, Newby Z-J, Liyanage GS, Offord CA. 2021. Assessing the storage potential of Australian rainforest seeds: a decision-making key to aid rapid conservation. *Biodiversity and Conservation*. 30: 3185-3218.
- Sotolongo LO. 2016. Conectando Paisajes para la conservación de ecosistemas montañosos. *Bisbee* 10 (NE1): 24.
- Souza PP, Motoike SY, Carvalho M, Kuki KN, Borges EEI, Silva AM. 2016. Storage on the vigor and viability of macauba seeds from two provenances of Minas Gerais State. *Ciência Rural*. 46: 1932-1937.
- Swagel EN, Bernhard AVH, Ellmore GS. 1997. Substrate water potential constraints on germination of the strangler fig *Ficus aurea* (Moraceae). *American Journal of Botany*. 84: 716-722.
- Thompson K, Band SR, Hodgson JG. 1993. Seed size and shape predict persistence in soil. *Functional Ecology*. 7: 236-241.
- Tomlinson PB. 1960. Essays on the morphology of palms. I. Germination and the seedling. *Principes*. 4: 56-61.
- Torres-Arias Y, Sánchez JA, Pernús M. 2022. *Manual de semillas para la restauración de ecosistemas limítrofes al manglar*. Editorial AMA, La Habana.
- Tweddle JC, Dickie JB, Baskin CC, Baskin JM. 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology*. 91: 294-304.
- Valladares F, Wright SJ, Lasso E, Kitajima K, Pearcy RW. 2000. Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a Panamanian rainforest. *Ecology*. 81: 1925-1936.
- Valliere JM, Alvarez JR, Adam T, Cross AT, Lewandowski W, Riviera F, *et al.* 2021. Restoration ecophysiology: An ecophysiological approach to improve restoration strategies and outcomes in severely disturbed landscapes. *Restoration Ecology*. 30: e13571.
- Van der Pijl L. 1982. *Principles of dispersal in higher plants*. Springer, New York.
- Villela FA, Filho LD, Sequeira EL. 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 26: 1957-1968.

- Visscher AM, Vandeloof F, Fernández-Pascual E, Pérez-Martínez LV, Ulian T, Diazgranados M, *et al.* 2022. Low availability of functional seed trait data from the tropics could negatively affect global macroecological studies, predictive models and plant conservation. *Annals of Botany*. 130: 773-784.
- Vivrette N, Meyr A. 2002. Testing native species with deep dormancy. *Seed Technology*. 24: 43-51.
- Walters C, Berjak P, Pammenter NW, Kennedy K, Raven P. 2013. Preservation of recalcitrant seeds. *Science*. 339: 915-916.
- Walck JL, Hidayati S, Dixon KW, Thompson K, Poschlod P. 2011. Climate change and plant regeneration from seed. *Global Change Biology*. 17: 2145-2161.
- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IJ. 2002. Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 33: 125-159.
- Willis CG, Baskin CC, Baskin JM, Auld JR, Venable DL, Cavender-Bares J, *et al.* 2014. The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytologist*. 203: 300-309.
- Wyse SV, Dickie JB. 2017. Predicting the global incidence of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology*. 105: 1082-1093.
- Wyse SV, Dickie JB. 2018. Taxonomic affinity, habitat and seed mass strongly predict seed desiccation response: a boosted regression trees analysis based on 17539 species. *Annals of Botany*. 121: 71-83.
- Zanetti M, Dayrell RLC, Vardil MV, Damasceno A, Fernandes T, Castilho A, *et al.* 2020. Seed functional traits provide support for ecological restoration and *ex situ* conservation in the threatened Amazon ironstone outcrop flora. *Frontiers in Plant Science*. 11: 599496.
- Zhang Y, Liu Y, Sun L, Baskin CC, Baskin JM, Cao M, *et al.* 2022. Seed dormancy in space and time: global distribution, paleoclimatic and present climatic drivers, and evolutionary adaptations. *New Phytologist*. 234: 1770-1781.

ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de flujo para investigaciones sobre ecofisiología de la germinación de plantas nativas. Datos tomados de Sánchez *et al.* (2011).

Appendix 1. Flowchart for research on ecophysiology of germination of native plants. Data taken from Sánchez *et al.* (2011).



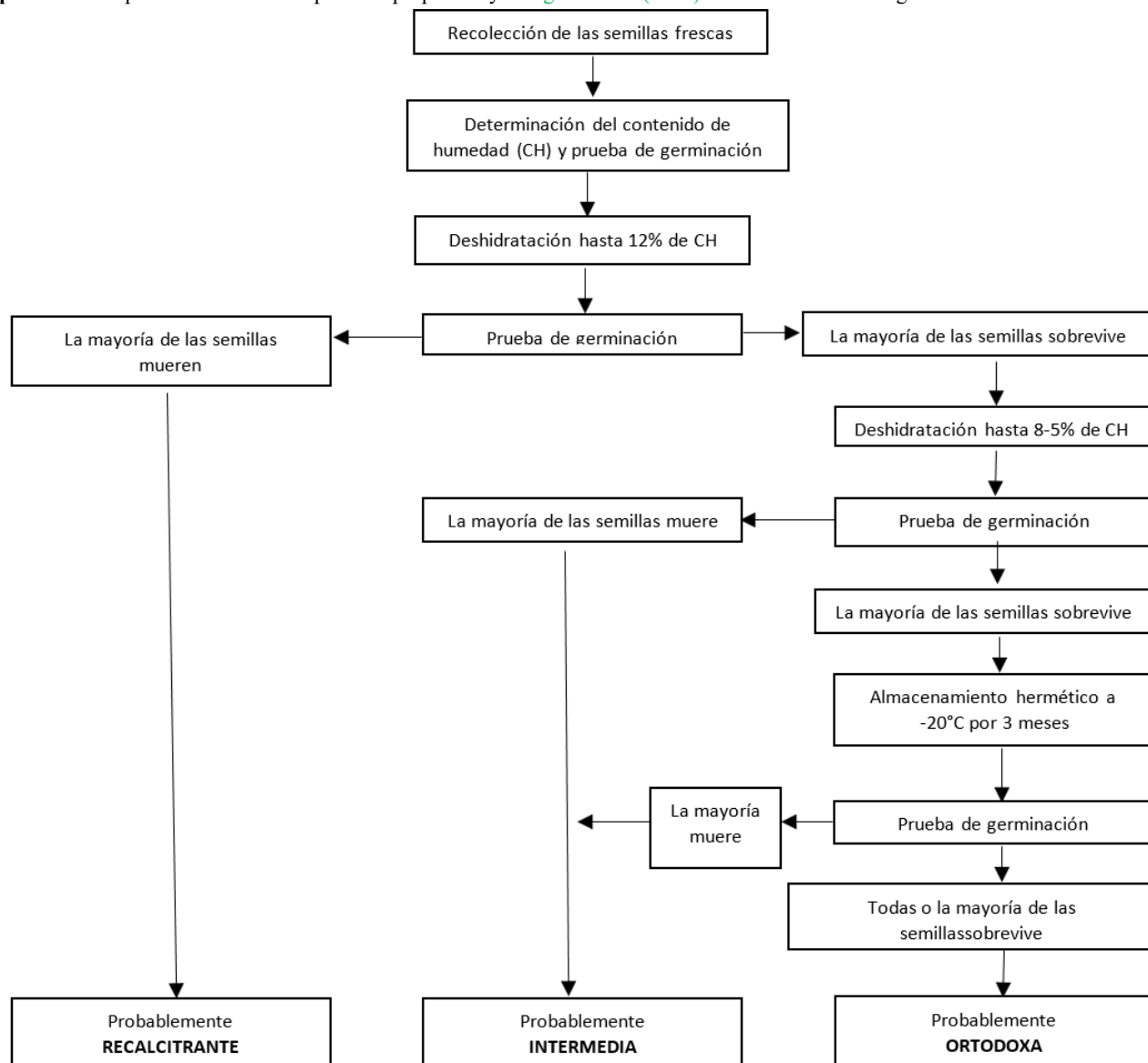
LITERATURA CITADA

Sánchez JA, Suárez AG, Montejó LA, Muñoz BC. 2011. El cambio climático y las semillas de las plantas nativas cubanas. *Acta Botánica Cubana*. 214: 38-50

Sánchez *et al.*: Protocolo para la germinación y conservación de semillas

Anexo 2. Esquema simplificado del protocolo propuesto por Hong y Ellis (1996) para determinar la conducta de almacenamiento de las semillas frescas.

Appendix 2. Simplified scheme of the protocol proposed by Hong and Ellis (1996) to determine the storage behavior of fresh seeds.



LITERATURA CITADA

Hong TD, Ellis RH. 1996. *A protocol to determine seed storage behaviour*. IPGRI. Technical Bulletin No. 1. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.