

# INDICADORES MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS DEL DETERIORO DE SEMILLAS DE TOMATE DE CÁSCARA

## MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL MARKERS OF SEED DETERIORATION IN HUSK TOMATO

Ignacio Pérez-Camacho<sup>1</sup>, Óscar J. Ayala-Garay<sup>1\*</sup>, Víctor A. González-Hernández<sup>1</sup>, José A. Carrillo-Salazar<sup>1</sup>, Aureliano Peña-Lomeli<sup>2</sup>, Gabino García-de los Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Estado de México. (oayala@colpos.mx). <sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 56200. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Texcoco, Estado de México.

### RESUMEN

En México, el tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) ocupa el quinto lugar entre las especies hortícolas pero la investigación en esta especie es escasa, en especial la relacionada con el deterioro de la semilla. Por tanto, se estudió el efecto del deterioro por envejecimiento natural en semillas de tomate de cáscara var CHF1-Chapingo, almacenadas 1, 2, 3 y 5 años a  $18.2 \pm 5$  °C y  $41.2 \pm 10\%$  de humedad relativa. Después de 5 años, la viabilidad decreció de 84.5 a 50.8%, la velocidad de emergencia de la radícula de 79 a 34.3 radículas d<sup>-1</sup>, la velocidad de emergencia en arena de 29.1 a 15.3 plántulas d<sup>-1</sup> y la conductividad eléctrica subió de 31 a 80  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Además, el peso de mil semillas bajó de 1360 a 1140 mg a los 5 años y el peso de 20 plántulas después de 10 d de sembradas disminuyó de 1306 a 876 mg. Las pérdidas en germinación de la semilla aumentaron linealmente al aumentar el tiempo de almacenamiento, con una tasa de reducción de 8.7% anual. La semilla de tomate de cáscara sólo se puede conservar en esas condiciones por 3 años con un vigor medio y 65.8% de germinación, y sólo por un año con un alto vigor y 80% de germinabilidad.

**Palabras clave:** *Physalis ixocarpa*, deterioro de semillas, germinación, membranas celulares, respiración, vigor.

### INTRODUCCIÓN

**D**urante el almacenamiento, mecanismos de deterioro de la semilla disminuyen la germinación, la velocidad de crecimiento de la plántula y la tolerancia a condiciones adversas (Bradford, 2004). Otros síntomas de la semilla deteriorada incluyen: crecimiento anormal, daños en estructuras principales de las plántulas, pérdida de compuestos solubles debido a excesiva permeabilidad de la membrana, reducción de la actividad enzimática, daño oxidativo al ADN y a las proteínas y producción de sustancias

### ABSTRACT

In México, husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.) is ranked the fifth among horticultural species. However, little research on this species has been done, particularly that referring to seed deterioration. This paper describes the effects of deterioration caused by natural aging on husk tomato seed, var. CHF1-Chapingo, which was kept in storage for 1, 2, 3 and 5 years at  $18.2 \pm 5$  °C, and  $41.2 \pm 10\%$  relative humidity. After five years of storage viability decreased 84.5 to 50.8%; speed of rootlet emergence decreased by 79 to 34.3 rootlets d<sup>-1</sup>; speed of emergence in sand decreased from 29.1 to 15.3 seedlings d<sup>-1</sup>; electrical conductivity increased from 31 to 80  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Also, weight of 1000 seeds decreased from 1360 to 1140 mg after five years, and 10 days after planting weight of 20 seedlings decreased from 1306 to 876 mg. Germination losses increased linearly as the storage period lengthened, at an annual reduction rate of 8.6%. Under these temperature and humidity conditions, after three years of storage husk tomato seed will have average vigor and 65.8%, and high vigor and 80% germinability after one year.

**Key words:** *Physalis ixocarpa*, seed aging, germination, cell membranes, respiration, vigor.

### INTRODUCTION

**D**uring storage, mechanisms of seed deterioration reduce germinability, seedling growth speed and stress tolerance (Bradford, 2004). Other symptoms of seed deterioration include abnormal growth, damages in main seedling structures, loss of soluble compounds due to increased membrane permeability, decrease in enzymatic activity, DNA and protein damage by oxidation, and production of toxic substances such as free fatty acids (Basavarajappa *et al.*, 1991). According to Bradford (2004), the release of free radicals and lipid peroxidation damage the membrane's physical integrity which results in a loss of cell compartmentalization and expulsion of solutes.

\*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Septiembre, 2007. Aprobado: Septiembre, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 891-901. 2008.

tóxicas como ácidos grasos libres (Basavarajappa *et al.*, 1991). La generación de radicales libres y la peroxidación de lípidos daña la integridad física de las membranas que, a su vez, causa pérdida de compartimentación celular y la expulsión de solutos (Bradford, 2004).

El deterioro de la semilla está asociado con cambios en su metabolismo; por ejemplo, la disminución de carbohidratos que ocurre con la edad de la semilla podría resultar en insuficiencia de sustratos respiratorios para la germinación o en la incapacidad para usarlos; así, un signo del deterioro de la semilla es una disminución significativa de su tasa respiratoria (Bernal y Leopold, 1992; Cruz-Pérez *et al.*, 2003). La relación entre la actividad respiratoria de una semilla durante las primeras horas de germinación y su estado de deterioro es difícil de establecer, pero se aprecia más claramente después de la emergencia de la radícula (Cruz-Pérez *et al.*, 2003).

México es centro de origen de las especies del género *Physalis*, las cuales forman parte de sus platillos desde épocas precolombinas, sobre todo en salsas y ensaladas. La superficie cosechada de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) ha aumentado desde 1932, adquirió importancia en los setenta y desde los ochenta se exporta en fresco o industrializado a los EE.UU. (Pérez y Granados, 2001). En México, el tomate de cáscara ocupa el quinto lugar entre las especies hortícolas, con una superficie sembrada en 2003 de 48 639 ha en 26 Estados, con un rendimiento medio de 12.362 t ha<sup>-1</sup> (SAGARPA, 2003).

La investigación en esta especie es escasa, en especial en relación con la calidad de la semilla y su deterioro. Empíricamente se calcula que por cada año de almacenamiento la semilla pierde hasta 20% de su germinación. Este aspecto es importante en los programas de mejoramiento genético y de conservación de germoplasma. El conocimiento detallado de las características morfológicas y fisiológicas de la semilla de esta especie podría ayudar a identificar los factores involucrados en su deterioro. Por ello, el objetivo de este trabajo fue cuantificar el efecto del envejecimiento de la semilla de tomate de cáscara almacenada sin control climático sobre sus características de germinación, vigor, disponibilidad de reservas, respiración, integridad y permeabilidad de membranas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio se usó semilla de tomate de cáscara de la variedad CHF1-Chapingo, producida durante el temporal en primavera-verano del 2000, 2002, 2003 y 2004 (equivalentes a 5, 3, 2 y 1 años de almacenamiento) en el Campo Experimental de la

Seed deterioration is associated with metabolic changes. For example, the reduction in carbohydrates occurring with age may result in insufficient respiratory substrates for germination or in failure to absorb them; thus, a significant reduction in respiration rate is a signal of seed deterioration (Bernal-Lugo and Leopold, 1992; Cruz-Pérez *et al.*, 2003). The relationship between the seed respiratory activity during the first events of germination and its stage of deterioration is difficult to establish, but can be seen more clearly after rootlet emergence (Cruz-Pérez *et al.*, 2003).

México is the center of origin of species of the genus *Physalis*, the fruit of which have been used to prepare dishes since pre-Columbian times, especially salsa and salads. The area cultivated under husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.) has been increasing since 1932. The vegetable became important in the 1970s and, since the 1980s, it has been exported, fresh and processed, to the United States (Pérez and Granados, 2001). In México, husk tomato is now ranked the fifth among vegetable species, in 2003 covering 48 639 ha distributed over 26 of the 32 Mexican states, with a mean yield of 12.362 t ha<sup>-1</sup> (SAGARPA, 2003).

Nonetheless, little research has been done on this species, specially about seed quality and its deterioration process. Empirical observations have calculated that storage results in an annual reduction of up to 20% in seed germinability. This is an important aspect for genetic breeding and germplasm conservation programs. Knowledge of morphological, biochemical and physiological characteristics of husk tomato seed aging may help to identify the factors involved in its deterioration. For this reason, this study was conducted to quantify the effect of seed aging on the germination, vigor, available reserves, respiration, and membrane integrity and permeability of husk tomato seed stored under non controlled climatic conditions.

## MATERIALS AND METHODS

Aged husk tomato seeds, 5, 3, 2 and 1 years old of the variety CHF1-Chapingo used in the trials, were produced at the experimental station of the Universidad Autónoma Chapingo, located in Texcoco, State of México, at an altitude of 2250 m, during the rainy season (spring-summer) of 2000, 2002, 2003 and 2004 growing cycles. The crop was managed in the same way each production year: transplant to an open field at a density of 30 000 plants ha<sup>-1</sup> was done during the first week of April, and harvest in the second week of June. Harvested seed was dried under environmental conditions for two weeks, cleaned with a gravity table (Seedburo Inc., USA), packed in open aluminum containers, and kept in a storehouse with no climate control at 18.2±5 °C and 41.2±10% relative humidity.

Universidad Autónoma Chapingo, en Texcoco, Estado de México, a 2250 m de altitud. El manejo del cultivo fue el mismo en cada año de producción; trasplante a campo abierto en la primera semana de abril, a una densidad de 30 000 plantas ha<sup>-1</sup> y cosecha en la segunda semana de junio. La semilla cosechada fue secada al ambiente durante dos semanas, limpiada en una mesa de gravedad (Seedburo Inc., EE.UU.) y almacenada en botes de aluminio abiertos en una bodega sin control de clima ( $18.2 \pm 5$  °C;  $41.2 \pm 10\%$  humedad relativa).

### Experimentos y variables medidas

Los análisis de calidad física, fisiológica, cinética de imbibición, respiración, y permeabilidad de las membranas de semillas se hicieron en mayo y junio del 2005 en los laboratorios de Análisis de Semillas, Fisiotecnica y Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Estado de México. Los tratamientos fueron las cuatro edades de la semilla tomada de lotes mediante muestreos independientes, usando 100 semillas por parcela. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones.

### Características físicas de las semillas

El porcentaje de humedad de la semilla fue calculado con la fórmula de Bewley y Black (1994). Las semillas fueron deshidratadas 72 h a 72 °C en una estufa (Thelco 31480, EE.UU.) y después se determinó el peso de la biomasa seca.

Para obtener el peso de mil semillas (P1000S) se usó el procedimiento estándar de la ISTA (2004), con ocho repeticiones de 100 semillas, las cuales fueron pesadas en una balanza Ohaus (Pine Brook, China), con precisión de 0.001 g.

### Calidad fisiológica de las semillas

Para la prueba de germinación, las semillas fueron depositadas en cajas petri con papel filtro humedecido y colocadas en una germinadora SD8900 (Seedburo Inc., EE.UU.) a  $25 \pm 1$  °C en oscuridad por 8 d, según las normas de la ISTA (2004). La velocidad de emergencia de radícula (VERad) fue medida con la fórmula de Maguire (1962), contando cada 24 h el número de radículas emergidas. Al final de la prueba fueron medidos los porcentajes de germinación (G) y viabilidad (Vi) que considera el número de plántulas normales y plántulas anormales.

La prueba de velocidad de emergencia en arena fue usada para evaluar el vigor de las semillas, las cuales fueron sembradas en un semillero con arena esterilizada a 1 cm de profundidad a humedad a saturación. Cada 24 h las plántulas emergidas fueron registradas y la velocidad de emergencia de plántulas (VEA) fue calculada con la fórmula de Maguire (1962). Al final de la prueba (10 d después de la siembra) se evaluó el porcentaje de emergencia (PE). Al azar, 20 plantas por repetición fueron secadas en una estufa modelo 31480 (Thelco, EE.UU.) y fue pesada su biomasa seca (PS, en mg).

### Experiments and measured variables

Analyses of physical and physiological quality, imbibition kinetics, respiration and membrane permeability were conducted in May and June, 2005, in the Seed Analysis Laboratory, Crop Physiology and Electronic Microscopy, of the Colegio de Postgraduados, at Montecillo, State of México. Treatments were the four seed ages described above, each independently sampled from corresponding seed lots. One hundred seeds were used per plot in a completely randomized experimental design with four replications.

### Seed physical quality

The seed moisture percentage was calculated with the Bewley and Black (1994) formula. For dry weight, the seeds were dehydrated at 72 °C for 72 h in a Thelco 31480 (USA) oven; afterwards, the weight of dry biomass was determined.

The weight of 1000 seeds (W1000S) was obtained according to the ISTA (2001) standard procedure, with eight replications of 100 seeds which were weighed using an Ohaus scale (Pine Brook, China), with a precision of 0.001 g.

### Seed physiological quality

For the germination trial, seeds were placed on wet filter paper in Petri dishes and introduced into a germination chamber (Seedburo Inc., USA) at  $25 \pm 1$  °C in the dark for 8 d, following ISTA (2001) norms. Speed of root emergence (VERad) was measured with the Maguire formula (1962), counting the number of emerged rootlets every 24 h. At the end of the trial, percentages of germination (considering normal seedlings) and viability (the sum of normal plus abnormal seedlings) were calculated.

Seed vigor was determined through an emergence speed test performed in sand. Seeds were sown at a depth of 1 cm in a seedbed filled with sterilized and fully saturated sand. A record of emerged seedlings was kept every 24 h, and seedling emergence rate (SER) was calculated according to Maguire (1962). Seedling emergence percent (SEP) was evaluated at the end of the test (10 days after planting), and 20 plants per replication selected at random were dried at 72 °C for 72 h in an oven (31480 Thelco, USA) to measure weight (SDW, in mg) of dry biomass.

### Imbibition kinetics (IK) and respiration

To assess IK, 100 seeds were placed at random in petri dishes, and their fresh and dry biomass was measured every 24 hours for 7 d to calculate moisture content for each sample. The resulting moisture data were plotted to obtain the IK curve during germination.

Prior to drying, seed respiratory rate was measured (nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) in each replication with a photosynthesis apparatus IK-301WS (IKD Inc., Canada), and average respiration rate per treatment was calculated.

### Cinética de imbibición (CI) y respiración

Para evaluar la CI las 100 semillas fueron colocadas al azar en cajas petri cada 24 h por 7 d y en cada muestreo fue pesada la biomasa fresca y seca para calcular el contenido de humedad. Los resultados fueron graficados para obtener la curva de CI durante la germinación.

Antes de secar las semillas, la actividad respiratoria de la semilla ( $\text{nmol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) en cada repetición fue medida con un aparato de fotosíntesis CI-301PS (CID Inc., Canadá) y el promedio de la tasa de respiración por tratamiento fue calculado.

### Permeabilidad de las membranas

El efecto de los años de almacenamiento en la permeabilidad de las membranas celulares fue determinado en la solución de imbibición de las semillas mediante conductividad eléctrica (CE) y potencial osmótico (PO). La CE ( $\mu\text{Scm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) fue medida en las semillas que fueron pesadas y colocadas en 60 mL de agua desionizada a 25 °C por 24 h, con un aparato de conductividad Modelo 72729 (Oakton, Singapur).

Cuatro repeticiones de 200 semillas fueron tomadas al azar para medir PO en 2 mL de agua desionizada a 24 °C por 24 h, con un osmómetro calibrado de presión de vapor modelo 5500 (Wescor Inc., EE.UU.). Los resultados fueron convertidos a MPa con la fórmula de Van't Hoff (1887, citado por Salisbury y Ross, 1994).

### Análisis estadístico de los datos

Para todas las variables fueron calculados promedios y desviaciones estándar por tratamiento usando Microsoft Excel 2003. Con los promedios se calcularon curvas polinómicas mediante el programa Curve Expert version 1.31 (Daniel Hyams, EE. UU.).

### Estudio histológico de las membranas

Las membranas fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss (EM9, Alemania), usando 20 semillas al azar por tratamiento embebidas por 24 h. Muestras de tejido fueron fijadas por 30 min a 4 °C en una solución de glutaraldehído a 25% y amortiguador fosfato 0.1 M, a pH 7.1. Las resinas fueron preparadas con dióxido de vinilciclohexano, éter diglicidil de polipropilenglicol, anhídrido succínico nonenil y dimetilaminoetanol. Los cortes (60 a 90 nm espesor) fueron hechos con un ultramicrotomo Reichert (Mod 570, Austria) con navaja de diamante; la tinción se hizo con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las imágenes fueron impresas con película Kodak 4489 electrón 7×7 cm (EE.UU.).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto del deterioro en la germinación y vigor de la semilla

El contenido de humedad no varió entre edades de la semilla, lo cual significa que todas estuvieron

### Membrane permeability

The effect of years of storage on cell membrane permeability was determined in the seed imbibition solution by electrical conductivity (EC) and osmotic potential (OP). EC ( $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) was measured in seeds that were weighed and placed in 60 mL of deionized water at 25 °C for 24 h with a conductivity meter (Model 72729, Oakton 72729, Singapore).

For OP, four 200-seed replications selected at random were immersed in 2 mL of deionized water at 24 °C for 24 h, and measurements were performed with a previously calibrated vapor pressure osmometer (Wescor 5500; USA); readings in osmomols were converted to MPa with the Van't Hoff formula (1887, cited by Salisbury and Ross, 1994).

### Statistical data analyses

Averages and standard deviations were calculated for all the variables by treatment with Microsoft Excel 2003 software. From these averages, polynomial curves were obtained using the Curve Expert version 1.31 (Daniel Hyams, USA) computer program.

### Membrane histological study

Membranes were observed under an electronic transmission microscope (Carl Zeiss EM9, Germany) in samples of 20 seeds per treatment after 24 h of imbibition. Tissue samples were fixed in a 25% glutaraldehyde and phosphate buffer solution 0.1 M, pH 7.1 for 30 min at 4 °C. The resins used were prepared with vinylcyclo-hexane dioxide, polypropyleneglycol diglycidyl ether, nonenyl succinic anhydride and dimethylaminoethanol. Sections 60 to 90 nm thick were made with a diamond knife ultramicrotome (Reichert 570, Austria). Uranyl acetate and lead citrate were used for staining. The images were printed on Kodak 4489 electron 7×7 cm film (USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of deterioration on seed germination and vigor

No differences in seed moisture were found among seed ages, indicating that all were in equilibrium with the environment. Average moisture was 5.2%, which is considered low and is not associated with the evolution of other variables. In contrast, all the germination and vigor variables decreased linearly over years of storage at constant rates of deterioration, except for seedling dry weight (Figure 1). All the linear models had a high level of fit ( $R^2 > 0.97$ ), i.e., they were reliable for prediction under the conditions of this research; besides, they have not been reported for this species.

These findings coincide with Delouche (2002), who stated that seed of any species will exhibit its highest

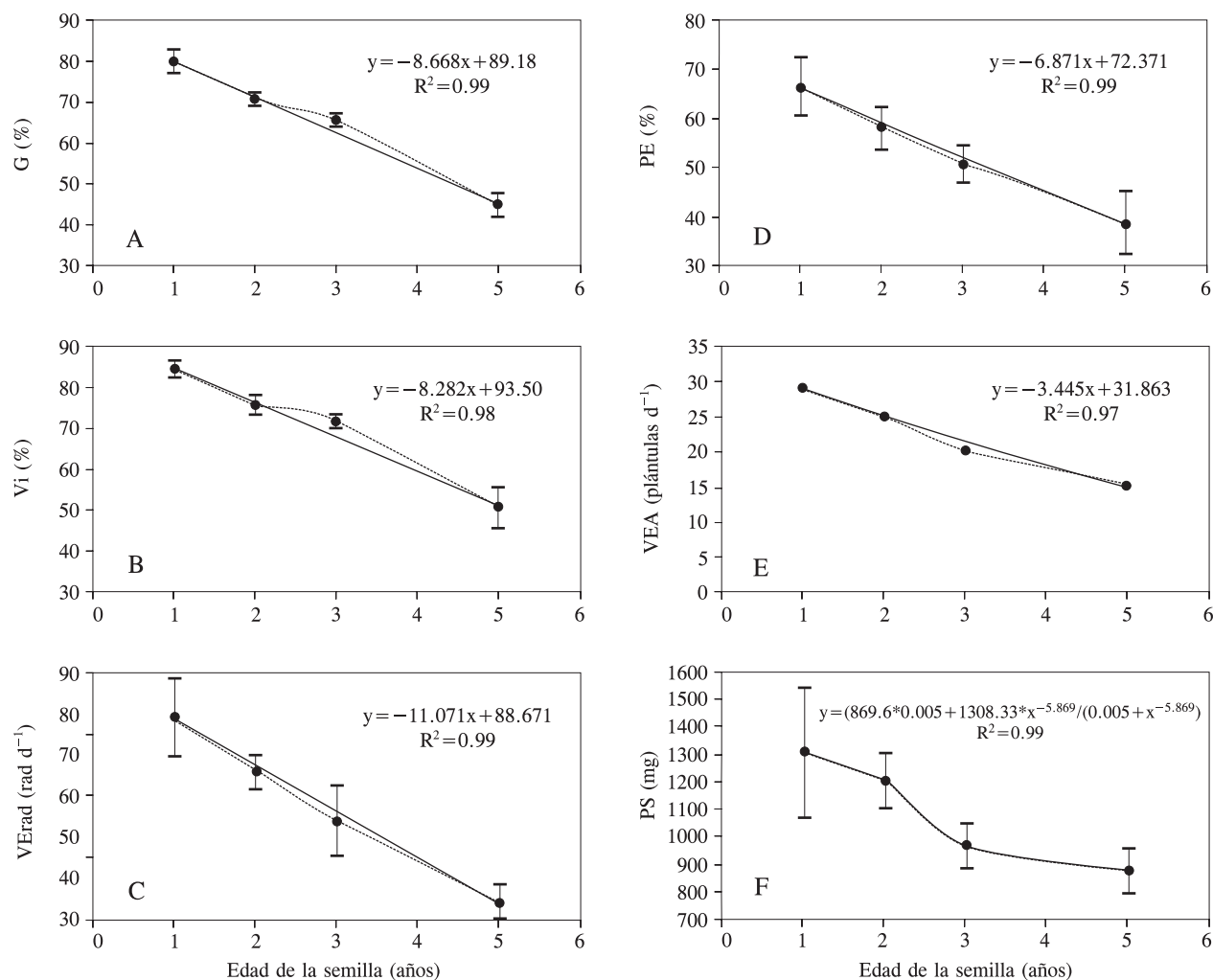
en equilibrio con el ambiente; su valor promedio fue 5.2% considerado bajo y no interviene en la evolución de las otras variables. En cambio, todas las variables de germinación y vigor disminuyeron linealmente durante los años de almacenamiento, como lo evidencian tasas constantes de deterioro, excepto en el peso seco de la plántula (Figura 1). Todos los modelos lineales tuvieron un alto grado de ajuste ( $R^2 > 0.97$ ), o sea, fueron confiables para predicción en las condiciones experimentales; además, son inéditos en esta especie.

Estos resultados concuerdan con Delouche (2002) quien señaló que la semilla de cualquier especie presenta su más alto nivel de vigor y potencial germinativo en la madurez fisiológica, desde la cual se inicia un proceso continuo e irreversible de deterioro hasta

vigor and germinative potential at physiological maturity; after this stage, an irreversible process of deterioration begins and continues until the seed loses its capacity to germinate. Thus, seed deterioration can be understood as a series of changes over time that affect vital functions and performance and, finally, causes its death (Bradford, 2004).

Under our experimental conditions, initial germination rate was 89%, which decreased 8.7% per year (Figure 1A, Table 1). At this rate, after two years tomato husk seed would lose 30% of its germination capacity and, consequently, would have poor seedling emergence in the field.

For the same lot of seeds, initial viability was 93.5% and the annual rate of loss was 8.3% (Figure



**Figura 1.** Efecto de la edad de la semilla en germinación (A-C) y vigor (D-F) del tomate de cáscara. G = germinación; Vi = viabilidad; PE = porcentaje de emergencia en arena; VERad = velocidad de emergencia de radícula; VEA = velocidad de emergencia en arena; PS = peso seco de 20 plántulas. Las barras indican error estándar (n = 4).

**Figure 1.** Effect of seed age on husk tomato seed germination (A-C) and vigor (D-F). G=germination; Vi=viability; SE = seedling emergence percent; VERad = rootlet emergence rate; VEA = seedling emergence rate in sand; PS = 20 seedlings dry weight. Bars indicate standard error (n = 4).

perder su capacidad germinativa. Así, el deterioro de una semilla se podría entender como una serie de cambios en el tiempo, que afecta funciones vitales y su desempeño, hasta causar su muerte (Bradford, 2004).

La germinación tuvo un valor inicial de 89% a la cosecha y disminuyó 8.7% por año en las condiciones experimentales (Figura 1A y Cuadro 1). Esto significa que en dos años, las semillas de tomate de cáscara reducen su germinabilidad en 30%, y probablemente habría baja emergencia en campo.

Para el mismo lote de semillas la viabilidad inicial a la cosecha fue 93.5% y la tasa anual de pérdida 8.3% (Figura 1B y Cuadro 1). Entonces, cerca de 5% de las semillas vivas no germinan en una plántula normal en las condiciones de una prueba estándar de germinación. Así, la tasa de pérdida de viabilidad fue ligeramente menor que la de germinación.

El porcentaje de emergencia (PE), inicial a la cosecha fue 72.4% (Cuadro 1). Es decir, la germinabilidad en este sustrato fue 17% inferior a la germinación estándar; pero la tasa de pérdida anual en emergencia fue 6.9%, menor que las tasas de pérdida en germinación y viabilidad (Cuadro 1). Las diferencias entre germinación y emergencia son debidas a que las condiciones de la prueba de germinación son más estables ( $25 \pm 1$  °C) que las del semillero donde se hizo la prueba de vigor ( $21.4 \pm 10.4$  °C). Además, en arena la plántula debe vencer la resistencia del sustrato, ya que en el semillero la profundidad de siembra fue 1 cm y las plántulas tuvieron que crecer más para ser registradas como emergidas (Bradford, 2004). Finalmente, el envejecimiento también causó pérdidas en el peso seco de plántulas derivadas de la semilla (Figura 1F) pero no lineales como en los casos anteriores, sino que hubo un mayor deterioro entre el segundo y tercer año de almacenamiento.

### Contenido de reservas de la semilla

El peso de 1000 semillas (P1000S) de tomate de cáscara disminuyó exponencialmente (Figura 2) y la mayor reducción ocurrió en los primeros dos años.

1B, Table 1). Then, nearly 5% of the live seeds of this husk tomato variety did not produce normal seedlings in a standard germination test. Thus, the viability loss rate was slightly lower than that of germination.

Initial seedling emergence percent (SEP) at seed harvest was 72.4% (Table 1). This means that germinability in this substrate was 17% lower than in standard germination tests. But the annual emergence loss rate was 6.9%, which is lower than germination and viability loss rates (Table 1). The differences between germination and emergence are due to the conditions ( $25 \pm 1$  °C) in the germination test that were more stable than in the seedbed where the test of vigor ( $21.4 \pm 10.4$  °C) was conducted. Furthermore, in sand the seedling must overcome substrate resistance, since seeds were sown at a depth of 1 cm in the seedbed, and seedlings had to grow more in order to be counted as emerged seedlings (Bradford, 2004). Finally, aging also caused losses in seedling dry weight (Figure 1F), although these losses were not linear as in previous variables, but rather exhibited greater deterioration between the second and third years of storage.

### Seed reserves

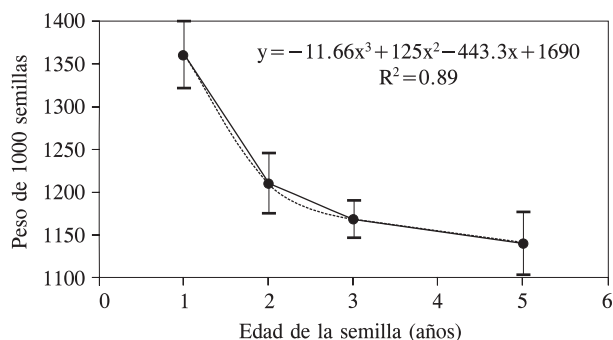
Weight of 1000 husk tomato seeds decreased exponentially (Figure 2); the greatest losses occurred during the first two years. According to the mathematical equation, the calculated W1000S was 1846.3 mg at harvest; that is, in two years of storage the seed lost 35% of its reserves. We can thus infer that the reduction in W1000S caused a 20% loss in seedling dry weight between the second and third years (Figure 1F).

According to Copeland and McDonald (2001), one cause of germination losses in seeds stored for several years is the consumption of seed reserves. During natural aging there is a decrease in the total content of reserves of maize seeds such as carbohydrates and proteins (Basavarajappa *et al.*, 1991), which is an important cause of the effects on growth and

**Cuadro 1. Tasa anual de reducción y valor calculado al momento de cosecha de calidad fisiológica de semilla de tomate de cáscara. Chapingo, Estado de México. 2006.**

**Table 1. Annual rates of reduction and value calculated at harvest of physiological quality variables of husk tomato seed. Chapingo, State of México. 2006.**

| Variable                                                         | Valor calculado al momento de cosecha | Tasa anual de reducción (%) |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| Germinación (%)                                                  | 89.2                                  | 8.7                         |
| Viabilidad (%)                                                   | 93.5                                  | 8.3                         |
| Emergencia de plántula en arena (%)                              | 72.4                                  | 6.9                         |
| Velocidad de emergencia en arena (plántulas d <sup>-1</sup> )    | 31.9                                  | 3.4                         |
| Velocidad de emergencia de radícula (radículas d <sup>-1</sup> ) | 88.7                                  | 11.1                        |



**Figura 2.** Peso de 1000 semillas de tomate de cáscara almacenadas 1, 2, 3 y 5 años a 18.2 °C y 41.2% humedad relativa. Las barras indican error estándar (n = 4).

**Figure 2.** Weight of 1000 husk tomato seeds (W1000S) stored for 1, 2, 3 and 5 years at 18.2 °C, and 41.2% relative humidity. Bars indicate standard error (n=4).

Según el modelo matemático, al momento de la cosecha el P1000S debió ser 1846.3 mg, es decir, en dos años perdió 35% de sus reservas. Tal reducción debió causar la disminución de 20% en el peso seco de la plántula, entre los 2 y 3 años de edad (Figura 1F).

Según Copeland y McDonald (2001), una causa de la pérdida de germinación en lotes almacenados durante varios años, es el consumo de reservas de la semilla. Durante el envejecimiento natural de la semilla de maíz se reduce el contenido total de reservas, como carbohidratos y proteínas (Basavarajappa *et al.*, 1991), que es una causa importante de los efectos en el crecimiento y desarrollo de la nueva plántula al avanzar el deterioro de la semilla. Sin embargo, Cruz-Pérez *et al.* (2003) detectaron semillas de maíz sin cambios significativos en el peso seco del endospermo, es decir, las reducciones de reservas no siempre ocurren.

Otra variable relacionada con el vigor de la semilla es la respiración, la cual es controlada por la cantidad de sustratos respirables como los glúcidos (Lambers *et al.*, 1991). En el tomate de cáscara las semillas secas (antes de ser embebidas) tuvieron una tasa promedio de 1.1 nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, sin diferencias estadísticas entre años de almacenamiento (datos no mostrados), mientras que el promedio de la respiración de las semillas a los 6 d de la imbibición fue 11.1 nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Figura 3), debido a la reactivación del metabolismo. Entonces, durante el almacenamiento las semillas estaban respirando a tasas equivalentes al 10% de la respiración a los 6 d de la imbibición.

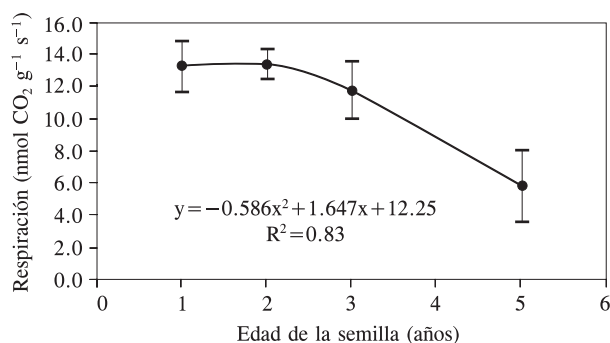
Además, el almacenamiento redujo la tasa respiratoria de semillas medida en el día 6 de la imbibición, con una tendencia cinética no lineal (Figura 3), ya que en el año 5 la tasa respiratoria fue sólo 46% de la de semillas de 1 ó 2 años. Esta cinética respiratoria

development of the new seedling. Reductions in reserves do not always occur, however. Cruz-Pérez *et al.* (2003) reported that maize seeds showed no significant changes in the endosperm dry weight.

Respiration is another variable related to seed vigor. Respiration rate is controlled by the amount of respirable substrates, such as sugars (Lambers *et al.*, 1991). In husk tomato we observed that dry seeds (before imbibition) had an average rate of 1.1 nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, with no statistical differences among years of storage (data not shown). After 6 d of imbibition the average of seed respiration rose to 11.1 nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Figure 3), due to metabolism reactivation. During storage, then, seed respiration rate was equivalent to 10% of the respiration rate after 6 days of imbibition.

Storage also decreased non-linearly the seed respiratory rate measured on the 6th day after imbibition began (Figure 3). By year 5, respiratory rate was only 46% that of 1- and 2-year-old seeds. This respiratory kinetics also shows that it descends after two years of age, suggesting that respiration rate changed when seed reserves decreased by 35%, i.e., when each weighed less than 1.25 mg (Figure 2), considering seed weight an indicator of its reserve content.

Seed respiration provides the necessary energy for germination (De Viseer *et al.*, 1990; Stewart *et al.*, 1990), and its intensity depends on seed mitochondrial functionality (Morohashi *et al.*, 1981; Bewley and Black, 1994). Therefore, vigorous seeds need more energy than those seeds that are not vigorous (Ram and Wiesner, 1998). Since in our study respiration was not directly measured in isolated mitochondria, it is not possible to know whether the decrease in respiration related to



**Figura 3.** Cinética respiratoria de semillas de tomate de cáscara almacenadas 1, 2, 3 y 5 años a 18.2 °C y 41.2% humedad relativa, al sexto día del inicio de imbibición. Las barras indican error estándar (n = 3).

**Figure 3.** Respiratory kinetics of husk tomato seeds stored during 1, 2, 3 y 5 years at 18.2 °C and 41.2% relative humidity, measured on the sixth day of imbibition. Bars indicate standard error (n = 3).

también muestra que desciende después de los 2 años de edad de la semilla, lo cual sugiere que la tasa respiratoria cambió cuando las reservas de la semilla disminuyeron 35%, es decir, cuando cada semilla pesó menos de 1.25 mg (Figura 2), considerando el peso de la semilla como un indicador de su contenido de reservas.

La respiración de la semilla provee energía requerida para la germinación (De Viseer *et al.*, 1990; Stewart *et al.*, 1990) y su intensidad depende de la funcionalidad de las mitocondrias (Morohashi *et al.*, 1981; Bewley y Black, 1994). Por tanto, las semillas vigorosas requieren mayor aporte energético que las no vigorosas (Ram y Wiesner, 1988). Puesto que en el presente estudio la respiración no fue medida directamente en mitocondrias aisladas, no se puede saber si la disminución en la respiración por envejecimiento de la semilla podría deberse a anomalías en la utilización de las reservas usadas como sustratos, a la disponibilidad de éstas o al estado físico y fisiológico de las mitocondrias. Ferguson *et al.* (1990) también observaron que el deterioro de la semilla de soya (*Glycine max* L.) redujo la tasa respiratoria y la velocidad de emergencia de radícula, respuestas asociadas con la pérdida del vigor de la semilla.

Además se encontró que conforme la semilla del tomate de cáscara envejecía, la radícula tardaba más en emerger, en particular al envejecer de 3 a 5 años (Figura 4).

#### Permeabilidad de membranas y cinética de imbibición

La conductividad eléctrica (CE) de la solución de imbibición aumentó linealmente con la edad de las semillas a una tasa de  $12.55 \mu\text{Scm}^{-1} \text{g}^{-1} \text{año}^{-1}$  (Figura 5A), a la vez que el PO decrecía a una tasa de  $0.43 \text{MPa año}^{-1}$ . La pérdida de vigor se ha asociado con una permeabilidad creciente de las membranas celulares, y los lotes de semillas que muestran una alta germinación en laboratorio pero liberan grandes cantidades de electrolitos son considerados de bajo vigor en condiciones de estrés. Por tanto, la CE se ha aceptado como indicador del vigor en semillas de algunas especies. En pepino (*Cucumis sativa* L.), la pérdida de viabilidad de semillas envejecidas a  $38^\circ\text{C}$  y 100% humedad relativa, estuvo asociada con el aumento de la CE y la peroxidación de lípidos de la membrana (Smith y Berjak, 1995). Tanto el aumento en CE como la reducción en PO se consideran evidencias de un incremento en la permeabilidad de las membranas celulares de la semilla, y sería pérdida de su integridad fisiológica o física. Según Bewley y Black (1994), el deterioro de las membranas en semillas se debe a

aging of seeds was due to anomalies in the use of the seed reserves used as substrates, to their availability or to the physical and physiological conditions of the mitochondria. Ferguson *et al.* (1990) also observed that soybean (*Glycine max* L.) seed deterioration reduced both respiratory rate and rootlet emergence, responses associated with loss of seed vigor.

It was also found that as husk tomato seed aged, rootlets took longer to emerge, especially those of 3- to 5-year-old seeds (Figure 4).

#### Membrane permeability and imbibition kinetics

Electrical conductivity (EC) of the imbibition solution increased linearly with seed age, at a rate of  $12.55 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1} \text{year}^{-1}$  (Figure 5A). At the same time, OP of the solution decreased at a rate of  $0.43 \text{MPa year}^{-1}$ . Loss of vigor has been associated with increasing permeability of the cell membranes. Thus, seeds that have a high germination rate in vitro, but release large amounts of electrolytes, are considered of low vigor under stress conditions. For this reason, EC has been accepted as an indicator of seed vigor for some species. In cucumber (*Cucumis sativa* L.) the loss of viability of seeds aged at  $38^\circ\text{C}$  and 100% relative humidity was associated with an increase in EC and membrane lipid peroxidation (Smith and Berjak, 1995). Both the increase in EC and the reduction in OP are considered evidence of increased permeability of cell membranes, and thus of a loss of their physiological or physical integrity. According to Bewley and Black (1994), seed membrane deterioration is caused by a decrease in phospholipids, carbohydrates and proteins, as well as by a reduction in peroxidase activity during mature seed drying.

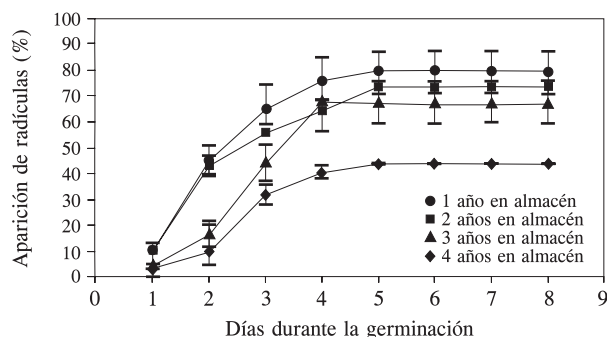


Figura 4. Cinéticas de aparición de radículas de semillas de tomate de cáscara con 1, 2, 3 y 5 años de almacenamiento a  $18.2^\circ\text{C}$  y 41.2% humedad relativa en 8 d. Las barras indican error estándar ( $n=4$ ).

Figure 4. Kinetics of rootlet emergence over 8 d of germinating husk tomato seeds stored for 1, 2, 3 and 5 years at  $18.2^\circ\text{C}$  and 41.2% relative humidity. Bars indicate standard error ( $n=4$ ).

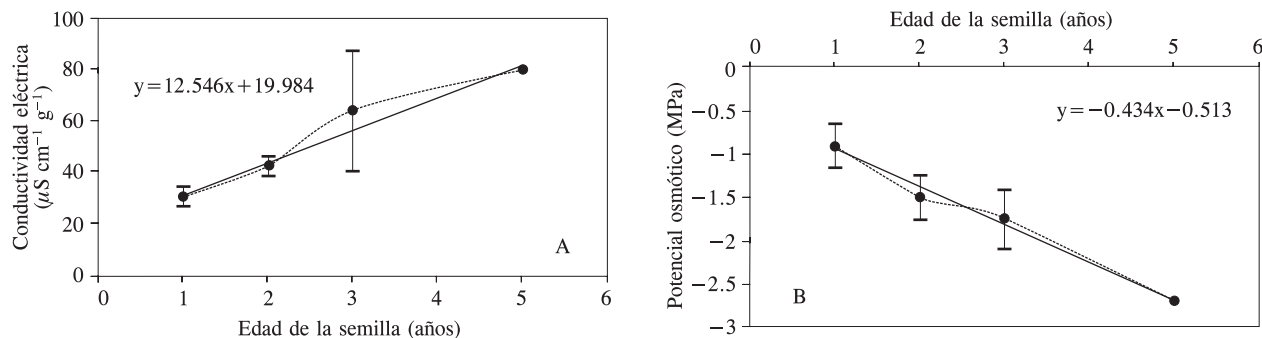


Figura 5. Conductividad eléctrica y potencial osmótico de la solución de imbibición durante 24 h de semillas de tomate de cáscara con 1, 2, 3 y 5 años de almacenamiento a 18.2 °C y 41.2% humedad relativa. Las barras indican error estándar (n = 4).

Figure 5. Electrical conductivity and osmotic potential of the imbibition solution in which seeds of husk tomato were immersed for 24 hours, after storage at 18.2 °C and 41.2 % relative humidity for 1, 2, 3 and 5 years. Bars indicate standard error (n = 4).

una disminución de fosfolípidos, carbohidratos y proteínas, así como a la reducción en la actividad de la peroxidasa, durante el secado en la maduración.

La cinética de imbibición no fue diferente ( $p > 0.05$ ) entre las edades de la semilla de tomate de cáscara (Figura 6), es decir, la hidratación no varió entre las semillas viejas y nuevas. En contraste, Cruz *et al.* (1995) observaron una relación directa entre la cinética de imbibición y el deterioro en semilla de maíz (*Zea mays* L.). Según Gatica *et al.* (1995) y Cruz *et al.* (1995), la absorción de agua presenta una cinética trifásica en las semillas de diferentes especies. En tomate de cáscara sólo se encontraron dos fases: la primera de las 0 a las 24 h y se llega a un máximo de absorción; la segunda inició a las 24 h y el contenido de humedad de la semilla tendió a mantenerse constante. Es posible que la primera fase de absorción de agua no se haya detectado en este experimento ya que el intervalo de mediciones fue 24 h, y la primera fase ocurre de 8 a las 12 h. Antes de imbibición (0 h), todas las semillas tenían un bajo contenido de agua (5%). La reparación de membranas celulares y del ADN y la síntesis de proteínas que usan los ARNm ocurren durante las primeras 8 a 12 h y, según Bewley (1997), la síntesis de mitocondrias y proteínas ocurre después de las 12 h, mientras que la movilización de reservas de la semilla, el alargamiento y división celular se dan después de 50 h de iniciada la imbibición.

Las observaciones histológicas realizadas al microscopio electrónico no evidenciaron diferencias anatómicas significativas de las membranas entre los tratamientos (Figura 7): en semillas nuevas (Figura 7a) y viejas (Figura 7b) se detectaron poros en la membrana celular discontinua en frecuencias similares. Lo anterior contrasta con lo señalado por Robert y Sherlie (1985) quienes afirmaron que en semillas de soya existe una ruptura de membranas ocasionada por el envejecimiento de las semillas. En tomate de cáscara,

Imbibition kinetics were not different ( $p < 0.05$ ) among ages of husk tomato seed (Figure 6), indicating that hydration in old and new seeds did not vary (Figure 6). In contrast, Cruz *et al.* (1995) found a direct relationship between imbibition kinetics and deterioration rate in maize (*Zea mays* L.). According to Gatica *et al.* (1995) and Cruz *et al.* (1995), water absorption occurs in three phases in seeds of different species. But in husk tomatoes we found only two phases: The first occurred within the first 24 h when maximum absorption was reached; the second began at 24 h when seed moisture tended to remain constant. It is possible that the first phase was not detected in our study because the interval between measurements was 24 h, and the first phase occurs between the first 8 to 12 h. Before imbibition (0 h), all seeds had a low water content (5%). Repair of cell membranes and DNA, and synthesis of proteins used by mRNAs occur during the first 8 to 12 h and, according to Bewley (1997), mitochondrion and protein synthesis

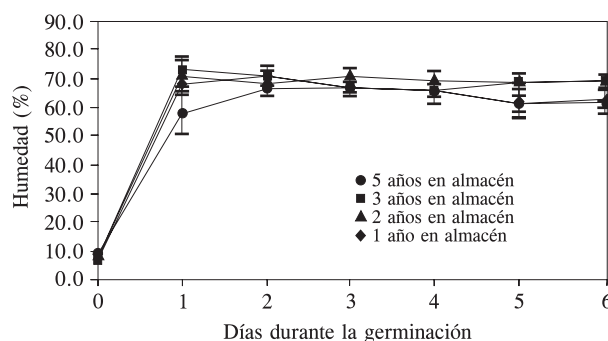


Figura 6. Cinética de imbibición en semillas de tomate de cáscara con 1, 2, 3 y 5 años en almacén, durante 6 d de imbibición. Las barras indican error estándar (n = 4).

Figure 6. Imbibition kinetics of 1, 2, 3 and 5 year old husk tomato seeds, on the 6th day of imbibition. Bars indicate standard error (n=4).

la integridad física de las membranas y paredes celulares en la semilla no sufrió cambios observables al aumentar el periodo de almacenamiento hasta 5 años. Es decir, el deterioro de la semilla de tomate de cáscara no se debió al daño físico de membranas de la semilla, pero sí a su mayor permeabilidad a los solutos debida probablemente a la peroxidación de los lípidos de las membranas, observada en semillas de especies como maíz, cebolla y berenjena (McDonald, 2000).

### CONCLUSIONES

La semilla de tomate de cáscara almacenada a  $18.2 \pm 5$  °C y  $41.2 \pm 10\%$  humedad relativa por 1, 2, 3, y 5 años tuvo deterioros y reducciones en la germinación (8.7% anual), viabilidad (8.3% anual) y emergencia de plántula en arena (6.9% anual). Dichas reducciones pueden ser explicadas por la disminución de las reservas y de la energía disponible para los procesos de crecimiento, así como daños en las membranas celulares. El peso de mil semillas disminuyó 35% en los primeros dos años y la respiración sólo se redujo hasta el tercer año de almacenamiento.

El daño ocasionado en la membrana por el deterioro causó un aumento de  $12.5 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ año}^{-1}$  en la conductividad eléctrica de la solución de imbibición y una reducción de 0.43 MPa en el potencial osmótico, pero no hubo diferencias entre edades de la semilla en la cinética de imbibición y en la integridad física de estas membranas. Por tanto, es evidente que el deterioro de las semillas de tomate de cáscara provoca cambios en la composición química de las membranas que permiten escapar solutos.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, por su valiosa ayuda en la realización e interpretación de los resultados del estudio de microscopía electrónica.

occur after 12 h, while seed reserves mobilize and cells elongate and divide 50 h after imbibition begins.

Histological examinations performed with an electron microscope did not show significant anatomical differences in membrane integrity among treatments (Figure 7); in both new (Figure 7a) and old (Figure 7b) seeds pores were detected in discontinuous cell membrane at similar frequencies. This contrasts with results reported by Robert and Sherlie (1985), who asserted that in soybean seeds (*Glycine max* L.) membrane rupture was caused by aging. In husk tomato seeds, physical integrity of neither cell membranes nor cell walls suffered any observable alteration over the 5-year storage period. We may infer then that deterioration of husk tomato seeds was not caused by physical damage to the membranes but rather by greater permeability to solutes, probably due to lipid peroxidation as observed in seeds of species such as maize, onion, and egg plant (McDonald, 2000).

### CONCLUSIONS

Husk tomato seed stored at  $18.2 \pm 5$  °C and  $41.2 \pm 10\%$  relative humidity for 1, 2, 3, and 5 years deteriorated, with reductions in germination (8.7% per year), viability (8.3% per year), and plant emergence in sand (6.9% per year). Such losses can be explained by the reduction in seed reserves, and the consequent loss of available energy for growth processes, and by damage to cell membranes. During the first two years of aging, seed weight decreased by 35%, while the respiration rate was not affected until the third year of storage.

Damage caused to the membrane by deterioration caused an increase of  $12.5 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ year}^{-1}$  in electrical conductivity of the imbibition solution and a decrease of 0.43 MPa  $\text{year}^{-1}$  in osmotic potential. However, there were no differences in imbibition kinetics or membrane physical integrity among seed ages. It is thus evident that deterioration of husk tomato

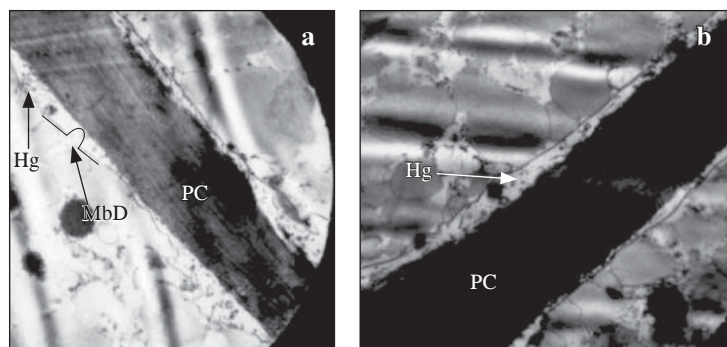


Figura 7. Observaciones al microscopio electrónico de transmisión de cortes de tejidos seminales de semilla de tomate de cáscara almacenadas por (a) 1 y (b) 5 años a  $18.2 \pm 5$  °C de temperatura y  $41.2 \pm 10\%$  de humedad relativa. MbD=membrana celular discontinua; Hg=hongos saprófitos; PC=pared celular.

Figure 7. Micrographs taken under an electron transmission microscope of husk tomato seed tissues after being seed stored for (a) 1 and (b) 5 years at  $18.2 \pm 5$  °C, and  $41.2 \pm 10\%$  relative humidity. MbD=discontinuous cell membrane; Hg=saprophytic fungus; PC=cell wall.

## LITERATURA CITADA

- Basavarajappa, B. S., H. S. Shetty, and H. S. Prakash. 1991. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Sci. Technol.* 19: 279-286.
- Bradford K. J. 2004. *Seed Production and Quality*. 1st edition. Department of Vegetable Crop and Weed Science. University of California. Davis, CA. USA. 134 p.
- Bernal, L. I., and A. C. Leopold. 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiol.* 98: 1207-1210.
- Bewley, J. D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Bewley, J. D., and M. Black. 1994. *Seeds, Physiology of Development and Germination*. Plenum Press. Second Ed, New York. USA. 445 p.
- Copeland, O. L., and M. B. McDonald. 2001. *Principles of Seed Science and Technology*. 4th edition. Kluwer Press, New York. USA. 488 p.
- Cruz, G. F., V. A. González-Hernández, J. C. Molina, M., and J. M. Vázquez, R. 1995. Seed deterioration and respiration as related to DNA metabolism in germinating maize. *Seed Sci. Technol.* 23: 477-486.
- Cruz-Pérez, A. B., V. A. González-Hernández, M. A. Mendoza-Castillo, y M. L. Ortega-Delgado. 2003. Marcadores fisiológicos de la tolerancia al envejecimiento de semilla en maíz. *Agrociencia* 37: 371-381.
- Delouche, J. C. 2002. Germinación, deterioro y vigor de semillas. *Seed News* 6: 6
- De Visser, R., H. M. Dekhuijzen, and D. R. Verkerke. 1990. Control of seed respiration and growth in *Vicia faba* by oxygen and temperature: No evidence for an oxygen diffusion barrier. *Plant Physiol.* 93: 668-672.
- Ferguson, J. M., D. M. TeKrony, and D. B. Egli. 1990. Changes during early soybean seed and axes deterioration: I. Seed quality and mitochondrial respiration. *Crop Sci.* 30: 175-179.
- Gatica, V. M., J. C. Molina M., A. Carballo C., y V. A. González-Hernández. 1995. Tasa respiratoria y vigor de semillas de girasol. *Rev. Fitotecnia Mex.* 18: 25-34.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. *International Rules for Seed Testing*. Rules 2004. ISTA editions, Zurich, Switzerland. 243 p.
- Lambers, H., A. van der Werf, and H. Konings. 1991. Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. *In: Wasei, Y.*, seed causes changes in the chemical composition of the membranes that allow seepage of solutes.
- End of the English version—
- ❖
- P. Eshel, and U. Kafkaki (eds). *Plant Roots. The Hidden Half*. Marcel Dekker Inc., New York. USA. pp: 229-263.
- McDonald, M. B. 2000. Seed priming. *In: Black M., and J. D. Bewley (eds). Seed Technology and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, London. England. pp: 287-325.
- Maguire, J. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2: 176.
- Morohashi, Y., J. D. Bewley, and E. C. Yeung. 1981. Biogenesis of mitochondria in imbibed peanut cotyledons: Influence of the axis. *J. Exp. Bot.* 32: 605-613.
- Pérez, M., L., y J. Granados A. 2001. Fertilización nitro-fosfórica en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) de riego en Irapuato, Guanajuato, México. *Acta Universitaria* 11: 19-25.
- Ram, C., and L. E. Wiesner. 1988. Effects of artificial ageing on physiological and biochemical parameters of seed quality in wheat. *Seed Sci. Technol.* 16: 579-587.
- Robert, L. T., and H. W. Sherlie. 1985. Reversal of the effects of aging in soybean seeds. *Plant Physiol.* 77: 584-586.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2003. *Anuario estadístico de la producción agrícola de México*. Centro de Estadística Agropecuaria. SAGARPA. D. F. México. 909 p.
- Salisbury, F. B., y C. W. Ross. 1994. Difusión, termodinámica y potencial hídrico. *In: Salisbury F., y C. Ross (eds). Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V. México, D.F. pp: 29-46.
- Smith, M. T., and P. Berjak. 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation - tolerant and desiccation sensitive seeds. *In: Kigel J., and G. Galili (eds). Seed Development and Germination*. Marcel Dekker Inc., New York. USA. pp: 701-746.
- Stewart, R. C., A. Martin, L. Reding, and S. Cerwick. 1990. Respiration and alternative oxidase in corn seedling tissues during germination at different temperatures. *Plant Physiol.* 92: 755-760.