



APORTES AL CONOCIMIENTO MORFOLÓGICO Y FISIOLÓGICO DE LA REPRODUCCIÓN POR SEMILLAS DE *ZEPHYRANTHES TUBISPATHA* (AMARYLLIDACEAE)

CONTRIBUTIONS TO THE MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL KNOWLEDGE OF REPRODUCTION BY SEEDS OF *ZEPHYRANTHES TUBISPATHA* (AMARYLLIDACEAE)

M. Cecilia Acosta^{1*} , M. Luciana Alcaraz¹ , H. Fabio Causin²
& Vilma T. Manfreda¹

1. Núcleo de Estudios Vegetacionales y Agroecológicos de Azul (NUCEVA), Facultad de Agronomía, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Azul, Buenos Aires, Argentina

2. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental (IBBEA), CONICET-UBA, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (DBBE), F.C.E.N., Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, C.A.B.A., Argentina

*cacosta@azul.faa.unicen.edu.ar

Citar este artículo

ACOSTA, M. C., M. L. ALCARAZ, H. F. CAUSIN & V. T. MANFREDA. 2023. Aportes al conocimiento morfológico y fisiológico de la reproducción por semillas de *Zephyranthes tubispatha* (Amaryllidaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 58: 399-419.

DOI: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v58.n3.40185>

Recibido: 15 Feb 2023

Aceptado: 5 Jun 2023

Publicado en línea: 30 Ago 2023

Publicado impreso: 30 Sep 2023

Editores: Agostina B. Sassone

& Nicolás García Berguecio

ISSN versión impresa 0373-580X

ISSN versión on-line 1851-2372

SUMMARY

Background and aims: *Zephyranthes tubispatha* is a South American species with ornamental and pharmacological potential. We aimed to study: 1) attributes of fruits, seeds, seed-seedling transition substages, normal and abnormal seedlings; 2) germination due to the effect of different storage periods, seeding times, and exposure to supra-optimal temperatures; and 3) plant vigor.

M&M: Samples harvested between 2018 and 2022 (Buenos Aires, Argentina) were used. Fruits and seeds were characterized morphometrically and seminal reserves histochemically. Substages during the seed-seedling transition were defined, and normal and abnormal seedlings were morphologically described. The germination of seeds from different storage periods, seeding times, and thermal conditions was evaluated. Changes in seed viability, electrolyte loss, and plant vigor were studied.

Results: In the seeds, lipids and proteins were detected as reserves. Normal and abnormal seedlings and the seed-seedling transition with five substages were described. Seeds of up to 10 months of storage, different seeding times and thermal conditions presented high germination percentages. High temperatures thermoinhibited germination, but did not affect subsequent plant survival.

Conclusions: Storage for more than one year showed increased seed mortality and seedling anomalies. The seeding moment conditioned the germination response to the heat treatments, and thermoinhibition did not affect the vigor of the plants produced.

KEY WORDS

Germination, seeding, seedlings, substages, storage, thermoinhibition, vigor.

RESUMEN

Introducción y objetivos: *Zephyranthes tubispatha* es una especie sudamericana con potencial ornamental y farmacológico. Se planteó estudiar: 1) atributos de frutos, semillas, subestadios de transición semilla-plántula, plántulas normales y anormales; 2) la germinación por efecto de diferentes periodos de almacenamiento, momentos de semillazón y exposición a temperaturas supraóptimas; y 3) el vigor de plantas.

M&M: Se utilizaron muestras cosechadas entre 2018 y 2022 (Buenos Aires, Argentina). Se caracterizaron morfológicamente frutos y semillas, e histoquímicamente las reservas seminales. Se definieron subestadios durante la transición semilla-plántula, y describieron morfológicamente plántulas normales y anormales. Se evaluó la germinación de semillas provenientes de diferentes periodos de almacenamientos, momentos de semillazón y condiciones térmicas. Se estudiaron cambios en la viabilidad de semillas, pérdida de electrolitos, y el vigor de plantas.

Resultados: En las semillas se detectó como reserva lípidos y proteínas. Se describió plántulas normales y anormales, y la transición semilla-plántulas con cinco subestadios. Semillas de hasta 10 meses de almacenamiento, diferentes momentos de semillazón y condiciones térmicas presentaron altos porcentajes de germinación. Las altas temperaturas termoinhibieron la germinación, pero no afectaron la posterior supervivencia de plantas.

Conclusiones: El almacenamiento por más de un año evidenció aumento en la mortalidad de semillas y anomalías en plántulas. El momento de semillazón condicionó la respuesta germinativa a los tratamientos térmicos y la termoinhibición no afectó el vigor de plantas producidas.

PALABRAS CLAVE

Almacenamiento, germinación, plántulas, semillazón, subestadios, termoinhibición, vigor.

INTRODUCCIÓN

Zephyranthes tubispatha (L'Hér.) Herb. es una especie nativa (familia Amaryllidaceae), que se circunscribe al subgénero *Zephyranthes* Herb., el más diverso y complejo del género (García *et al.*, 2019). Es herbácea, perenne, con hojas de láminas lineales, bulbosa y presenta una única flor por escapo con tépalos de colores diversos (anaranjada, amarilla, rosa o blanca) que da un único fruto (cápsula) que contiene numerosas semillas (Roitman & Hurrell, 2009). Se distribuye por el sur de Estados Unidos y México, y en Sudamérica en el centro y sur de Chile, Brasil austral, Paraguay, Uruguay y Argentina. Dentro de Argentina, se encuentra principalmente en las provincias de Corrientes, Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires (Arroyo, 1990; Roitman & Hurrell, 2009). En esta última provincia se halla ampliamente distribuida tanto en los cordones serranos del centro como en áreas de llanura (Antón & Zuloaga, 2022). En particular en el centro y sudeste de la Provincia de Buenos Aires se encuentra en el Sistema de Tandilia y en la Pampa Deprimida (Erize & Haene, 2008; Sabatino *et al.*, 2017; Vercelli, 2018), tanto en ambientes rurales como urbanos y periurbanos (M. C. Acosta, obs. pers.). En líneas generales los estadios vegetativos se dan durante el otoño-invierno y la floración durante la primavera y el verano (Streher, 2016; Fernández, 2020). En el Sistema de Tandilia se observan las primeras floraciones a mediados de noviembre luego de abundantes lluvias, y las últimas a fines de marzo.

Esta especie presenta, por un lado, interés farmacológico ya que sus bulbos contienen tazetina al igual que otras especies vegetales de la familia Amaryllidaceae (Vergara Zurita, 2020). La tazetina es un alcaloide considerado un hipotensor débil que posee además actividad antiinflamatoria, antitumoral, antimalárico y antibacterial (Cabezas *et al.*, 2007). Cavallaro (2015) también evidenció la presencia de tres alcaloides (hippeastidina, licorina y 3-O-demetilhippeastidina) importantes en la paliación del Alzheimer. Por otro lado, ha cobrado interés como potencial ornamental debido a sus atractivas flores coloridas, su gran adaptabilidad a la zona semiárida y por los servicios ecosistémicos que brinda (Maza *et al.*, 2004; Rossello *et al.*, 2006; Sanhueza *et al.*, 2014; Streher, 2016; Afroz *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2018; Fernández, 2020).

En líneas generales las geófitas tienen capacidad de sobrevivir debajo de la superficie del suelo durante un período prolongado ya que poseen un sistema autónomo y altamente desarrollado donde almacenan agua y nutrientes. Este conjunto de características han despertado el interés de productores tanto para la industria de flores de corte, como para ampliar la oferta de plantas con flores para macetas u ornamentales para jardines (Moreira *et al.*, 2018; Fernández, 2020).

En Argentina, la producción y comercialización de plantas con flores (floricultura) se concentra principalmente en las zonas periurbanas de Buenos Aires (Morisigue *et al.*, 2012; Aguilar-Avendaño, 2016; Noguera Serrano *et al.*, 2017) y actualmente se está incursionando en la colecta, reproducción y producción de flores de los recursos genéticos nativos ornamentales (Facciuto *et al.*, 2019; Eynard *et al.*, 2020). Dentro de las especies que se comercializan, la familia Amaryllidaceae posee importancia mundial en paisajismo contemporáneo (Fernández, 2020). La producción de plantas con flores ha forjado demandas de cadenas productivas para desarrollar y vender material de siembra como semillas, plántulas y esquejes (Aguilar-Avendaño, 2016; Noguera Serrano *et al.*, 2017). Promover la utilización de la flora nativa potencia los recursos genéticos vegetales de la Argentina, su aprovechamiento racional y sostenible, junto con la necesidad de conservarlos y preservarlos (Fernández, 2020). Puntualmente, para *Z. tubispatha* se ha profundizado el conocimiento en cuanto a formas y técnicas de reproducción por cultivo *in vitro* y por micropropagación de bulbos (Rossello *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2011; Fernández, 2020). No obstante, la reproducción por semillas es generalmente más simple y económica, permite la posibilidad de conservar y seleccionar por variabilidad dentro de las poblaciones. Si bien las semillas de esta especie se comercializan en diferentes partes del mundo, es escasa la información disponible respecto a la conservación, longevidad y efectividad de la reproducción por este medio, como así también la referente a las particularidades de la transición semilla-plántula y el efecto de factores ambientales y de las condiciones de almacenamiento sobre el vigor. Este último concepto hace referencia al desempeño de las semillas para producir plántulas normales en diversas condiciones ambientales de cultivo

(Besnier Romero, 1989; Peretti, 1994; Geneve, 2005; ISTA, 2006), por lo que es considerado como un atributo de la calidad de las semillas importante al momento de utilizarlas para su siembra en condiciones ambientales no favorables. Los procesos que median desde la germinación hasta el establecimiento de plántulas son claves dentro del ciclo de vida de las plantas (Benech-Arnold & Sanchez, 2004; Marcos-Filho, 2015) y requieren de información básica, tales como las características de las semillas, los requerimientos de germinación y la descripción de una plántula normal para la especie. En cuanto a las características de las semillas de *Z. tubispatha* se han descrito comúnmente como negras, planas y deltoides (Roitman & Hurrell, 2009). En cuanto a los requerimientos para la germinación, *Z. tubispatha* alcanza máximos porcentajes entre los 15 y 25 °C (Maza *et al.*, 2004; Manfreda *et al.*, 2017; Acosta *et al.*, 2022), decayendo marcadamente por encima de estas temperaturas. Las semillas cuando son incubadas a alta temperatura (supraóptimas) no germinan, sin embargo cuando son posteriormente transferidas a 20 °C, recobran plenamente la germinación, sugiriendo que el fenómeno subyacente es el de termoinhibición (Manfreda *et al.*, 2019; Acosta *et al.*, 2022 y referencias allí citadas). Cabe señalar que si bien la exposición a alta temperatura no modifica significativamente la mortalidad seminal, puede alterar considerablemente tanto el tiempo de inicio como la velocidad de la germinación a temperaturas óptimas (Manfreda *et al.*, 2019; Acosta *et al.*, 2022). Si bien la presencia de termoinhibición se considera de valor adaptativo en especies que ajustan su actividad a la época invernal, propio de los ambientes mediterráneos con veranos secos e inviernos húmedos (Huo & Bradford, 2015; Derakhshan *et al.*, 2018), el registro de su presencia en el género *Zephyranthes*, y en particular en *Z. tubispatha* ha sido muy reciente y poco investigado. Considerando que la producción de semillas en esta especie abarca todo el período estival, pudiendo eventualmente permanecer termoinhibidas por la presencia de altas temperaturas en condiciones favorables para la germinación (por ejemplo precipitaciones), resulta necesario indagar si el momento de semillazón (inicios o fines de verano, por ejemplo) condiciona a su vez la respuesta germinativa y el vigor de las plantas producidas cuando se dan las condiciones térmicas similares al período otoñal.

En relación a la longevidad de las semillas de esta especie, los estudios son escasos y con resultados no siempre coincidentes. Por ejemplo, Maza *et al.* (2004) registraron que las semillas de esta especie mantiene un 60% de éxito en la germinación luego de un año de conservación a 23 °C, mientras que Afroz *et al.* (2018) señalan que pierden rápidamente la viabilidad. La confirmación de esta información resulta importante para prever disponibilidad y ofertas de semillas a lo largo de un año. Respecto a las plántulas, si bien la morfología no ha sido particularmente detallada en esta especie, se cuenta con descripciones morfológicas preliminares (Acosta *et al.*, 2021) que permiten reconocer y extrapolar macroscópicamente estructuras similares a las descritas por Tillich (2007) en monocotiledóneas. Por su parte Goyenette *et al.* (2022) profundizó en la caracterización morfológica y anatómica de *Z. bifida* (Herb.) Nic. García & Meerow (taxonómicamente cercana a *Z. tubispatha*) y propuso estados de desarrollo de la transición semilla-plántula. Respecto a esto último, el sistema de escalas universales BBHC (Meier, 2018) propone estados de desarrollo fenológicos para especies monocotiledóneas en general, que ha sido utilizado para generar escalas de algunas Amaryllidaceae de importancia económica como hortalizas (bulbosas del género *Allium*: puerro, ajo, cebolla y chalote), pero que aún no han sido adecuadas para otras especies de esta familia como *Z. tubispatha*.

La importancia de contar con información relevante que permita contribuir al manejo, conservación y reproducción por semillas de *Z. tubispatha*, requiere completarla y ampliarla. En este sentido se definieron los siguientes objetivos: 1) describir los principales atributos de frutos y semillas; 2) reconocer estructuras que permiten discernir macroscópicamente diferentes subestadios de desarrollo en la transición semilla-plántula y detectar las anomalías más frecuentes; 3) evaluar el efecto de diferentes períodos de almacenamiento de las semillas sobre el comportamiento germinativo y el deterioro seminal; 4) analizar el efecto del momento de producción de semillas (fines de primavera o mediados de verano) y de diferentes períodos de exposición a altas temperaturas sobre la germinación; y 5) analizar en semillas producidas a mediados de verano el efecto de diferentes períodos de exposición a altas temperaturas sobre el vigor de las plantas obtenidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de semillas y condiciones generales de germinación

Frutos y semillas de *Z. tubispatha* fueron recolectados en las Sierras de Azul (S 37° 8.254' O 59° 46. 386') y en las Sierras Bayas (S 36° 56.369' O 60° 09.315'), ambas pertenecientes al Sistema de Tandilia, ubicadas en el centro de la provincia de Buenos Aires (Argentina). Las recolecciones se realizaron a fines de primavera durante diciembre y a mediados de verano durante enero, entre 2018-2022. Las plantas en flor, de ambas localidades, se hacen visibles luego de lluvias intensas con alta densidad y concentradas en áreas reducidas, por lo que la recolección de frutos se realizó al azar y de forma manual dentro de cada sector, asegurando que los frutos estuvieran en madurez fisiológica (próximos a la dehiscencia) y que fueran de similar coloración y tamaño. La recolección se realizó en sobres de papel madera indicando fecha y lugar de procedencia. En el laboratorio, los frutos se trillaron a mano, descartando aquellos que estuvieran dañados, y las semillas se colocaron sobre papel madera para su secado a temperatura ambiente (aproximadamente durante 20 días). Una vez secas, se almacenaron en igual condición por diferentes periodos (meses), dependiendo del tratamiento. Dado que los frutos se recolectaron en ambientes serranos cercanos y que las pruebas preliminares de germinación no evidenciaron respuestas diferenciales de los diferentes sitios (datos no mostrados), las semillas se utilizaron de manera indistinta para todos los ensayos. Los ejemplares de *Z. tubispatha* fueron identificados por el personal responsable del Herbario FAA (Thiers, permanentemente actualizado) y depositados según los registros: ARGENTINA. Prov. Buenos Aires: *Pdo. Azul*, Azul, S 37° 8.254' O 59° 46. 386', 6-XII-2018, Scaramuzzino *et al.* s.n. (FAA 8850). *Pdo. Olavarría*, Sierras Bayas, S 36° 56.369' O 60° 09.315', 20-XII-2018, Acosta & Scaramuzzino s.n. (FAA 9598).

Todos los ensayos de germinación se realizaron en cajas de Petri con 50 semillas cada una, sembradas sobre una capa de papel de filtro más cuatro de papel toalla y 5 ml de agua destilada, por cuadruplicado. Con el fin de evitar la desecación, las cajas fueron colocadas en contenedores plásticos negros sobre goma espuma embebida

con agua, e incubadas en recipientes a baño maría, cubiertas con fundas plásticas negras y llevadas a cámaras de cultivo a 20 °C o 33 °C, dependiendo del tratamiento (ver más abajo).

Evaluación de frutos, semillas, transición semilla-plántula, plántulas normales y anormales

La estimación del número de semillas por fruto se realizó sobre 10 frutos maduros (aún cerrados al momento del trillado). Los mismos fueron seleccionados al azar de una muestra de aproximadamente 100 frutos cosechados de la población de las Sierras de Azul en diciembre de 2021. Las semillas se describieron a simple vista según aspectos distinguibles de su forma, textura y coloración, y finalmente se tomaron registros fotográficos tanto de los frutos como de las semillas para realizar mediciones de largo y ancho utilizando el procesador de imágenes público Image J versión 1.53e (Schneider *et al.*, 2012). Se pesaron semillas en una balanza analítica de precisión (Sartorius M-Power AZ-214) para estimar el peso de 1000, siguiendo el criterio general del ISTA (2003). Se realizó la determinación de las reservas seminales mediante pruebas histoquímicas tomando cinco semillas al azar de cada población (Sierras de Azul y de Sierras Bayas). Para ello, semillas categorizadas exomorfológicamente como normales se hidrataron durante 2 horas para facilitar su manipulación y se realizaron cortes delgados a mano alzada de la región del endosperma. Las muestras se tiñeron con soluciones acuosas al 0,01% de azul de nilo (7-dietilamino-3,4-benzofenoxazina-2-ona), como sonda fluorescente para lípidos (Fulcher, 1982) y amido black al 0,5% en ácido acético al 7% o una solución comercial de lugol, para la determinación de proteínas y almidón, respectivamente (Harris & Oparka, 1994). Los preparados se observaron en un microscopio Axioskope 2 (Zeiss) provisto con un equipo de epifluorescencia HBO100.

La descripción e identificación de estructuras, de la transición semilla-plántula (Estadio 0 en la escala general para monocotiledóneas BBCH, 2018) se realizó utilizando las descripciones morfológicas preliminares realizadas en *Z. tubispatha* (Acosta *et al.*, 2021), la terminología de estructuras descritas para monocotiledóneas (Tillich, 2007) y las empleadas para *Z. bifida* (Goyenette *et al.*, 2022). Se utilizaron semillas categorizadas como

normales, cosechadas en diciembre de 2020 y 2021, las mismas fueron conservadas a temperatura ambiente y al momento de su uso contaban con 22 y 10 meses de almacenamiento, respectivamente. Ambos lotes de semillas fueron puestos a germinar a 20 °C con fotoperíodo de 12 h. Adicionalmente se agregó un tratamiento de oscuridad total para las semillas de 10 meses de almacenamiento, para confirmar estructuras fotosintéticas (comparativamente con las de luz) y describir fenotípicamente el efecto de la ausencia de luz. Cada unidad experimental fue en número y conducción, de igual manera que lo ya descrito en condiciones generales. Durante la imbibición se registró el peso fresco de semillas cada 12 h hasta el inicio de germinación, utilizando una balanza analítica. Luego desde el inicio de la germinación se separaron diariamente las semillas germinadas y fueron colocadas en recipientes individuales (previamente rotulados por día) sobre sustrato de papel, agua y respetando la condición lumínica de germinación. A los 11 días de iniciada la germinación, se realizaron observaciones de la morfología de las plántulas y se tomaron fotos. Finalmente se identificaron características visibles de plántulas normales y anormales por comparación de presencia/ausencia, coloración y tamaño de estructuras. Estas últimas se midieron utilizando el procesador de imágenes público Image J versión 1.53e (Schneider *et al.*, 2012).

Efecto del período de almacenamiento de semillas sobre el comportamiento germinativo y el deterioro seminal

La evaluación del comportamiento germinativo se realizó con semillas recolectadas durante los meses de diciembre del 2018 al 2021, las que permanecieron a temperatura ambiente por diferentes periodos hasta su uso: 10, 12, 22, 34 y 46 meses de almacenamiento. Se utilizó para el tratamiento control semillas cosechadas en 2021 y secadas al aire durante 20 días (0 meses de almacenamiento). Las unidades experimentales fueron colocadas en condiciones de germinación a 20 °C y en oscuridad, siguiendo el procedimiento general ya descrito. Se tomaron registros diarios hasta el inicio de la germinación (10% de semillas germinadas), intensificándose los mismos desde ese momento cada 10-12 horas aproximadamente. Los seguimientos se dieron por finalizados cuando no se registró ningún evento de germinación por al menos 120 h seguidas. Las

semillas no germinadas se clasificaron siguiendo los criterios generales del ISTA (2006) en: firmes a la presión (F), vacías (V) o muertas (M). Con estos datos y el de semillas germinadas (G), se calculó el porcentaje de la germinación acumulada en el tiempo (%Gt), y los porcentajes de cada estado final seminal (%G, %F y %M), descontando del total las semillas V. Las semillas se consideraron germinadas cuando se observó al menos 1 mm de longitud del embrión emergido (Fig. 1A).

La evaluación del grado de deterioro de las semillas almacenadas por diferentes periodos se realizó mediante un análisis de pérdida de electrolitos como indicador de daño en biomembranas (Pandey, 1988; Bajji *et al.*, 2002; Ouyang *et al.*, 2002). Se utilizaron muestras de 100 mg de semillas de 4 y 18 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, que fueron recolectadas en diciembre de 2021 y 2020, respectivamente. Se colocaron las semillas en 15 ml de agua destilada y se dejaron a temperatura ambiente durante 3 h con agitación constante (50 rev/min). Transcurrido este tiempo, se retiraron las semillas y se registró la conductividad eléctrica de la solución con un conductímetro portátil AD230 (Adwa). El porcentaje de la proporción de pérdida de electrolitos se estimó como el cociente entre la medición realizada a las 3 h, sobre la conductividad obtenida luego de hervir cada muestra a 85 °C y luego multiplicada por 100.

Por otro lado, también se analizó el efecto del período de almacenamiento sobre la viabilidad de las semillas mediante la prueba de tinción con trifetil tetrazolio. Para ello, se utilizaron semillas de 6, 10 y 18 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (15 por condición, las primeras cosechadas en diciembre de 2021 y las dos últimas en 2020). Las semillas se hidrataron por 12 h, y luego se extrajeron los embriones, se colocaron en tubos plásticos con 1,5 ml de una solución de cloruro de trifetil tetrazolio al 0,1%. Tras 2 h de incubación en baño maría, a 33 °C y en oscuridad, los embriones se enjuagaron y se mantuvieron en agua destilada hasta su observación con microscopio estereoscópico, registrándose fotográficamente los resultados. Se empleó la terminología utilizada por Goyenche *et al.* (2022) en *Z. bifida* para indicar las 3 estructuras del embrión de *Z. tubispatha* que resultaron o no coloreadas luego de la prueba: hiperfilo del cotiledón, anillo del hipofilo del cotiledón e hipofilo del cotiledón (Fig. 1B).

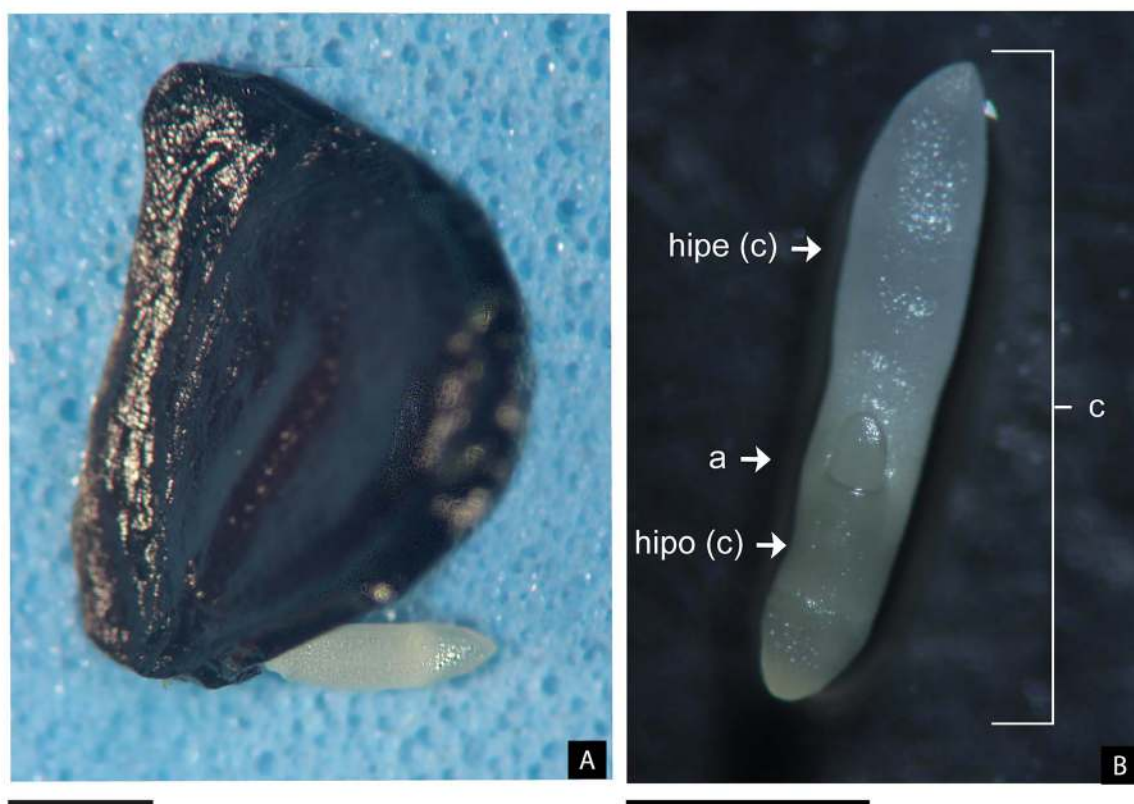


Fig. 1. Semilla y embrión aislado de *Zephyranthes tubispatha*. **A.** Semilla en inicio de germinación. **B.** Embrión aislado de semilla hidratada. Abreviaturas= a: anillo del hipofilo cotiledonar; c: cotiledón; hipe(c): hiperfillo cotiledonar; hipo(c): hipofilo cotiledonar. Escalas= 1 mm.

Efecto de la alta temperatura sobre la germinación de semillas producidas a mediados de verano y fin de primavera.

Se utilizaron semillas provenientes de dos momentos de semillazón: a mediados de verano durante el mes de enero y otras a fines de primavera durante el mes de diciembre de 2021 (E21 y D21, respectivamente). Las semillas se colocaron en condiciones de germinación, tal como ya fue descrito en la sección de condiciones generales, y se incubaron a 33 °C (HT) durante 9 o 30 días (tratamientos 9dHT y 30dHT, respectivamente), en oscuridad. Transcurridos estos tiempos de incubación, se traspasaron a 20 °C y se evaluó la germinación tal como se describió para los otros ensayos. Se utilizó como control la germinación de semillas a 20 °C sin exposición previa a HT (tratamiento 0dHT). Todos los tratamientos se realizaron por cuadruplicado.

Efecto de diferentes períodos de exposición de semillas a altas temperaturas, sobre el vigor de las plantas obtenidas.

Se utilizaron plántulas provenientes de las semillas germinadas de los tratamientos 0dHT, 9dHT y 30dHT del lote E21, las que fueron trasplantadas en macetas para su posterior seguimiento. Se utilizaron macetas de 4 L de capacidad conteniendo 3/4 de tierra abonada, 1/8 de arena y 1/8 de perlita, regadas con agua de red hasta capacidad de campo. Se trasplantaron entre 25 y 40 plántulas por repetición (cuatro) y tratamiento (dependientes del éxito germinativo). Se mantuvieron en cámaras de cultivo por 5 semanas a 20 °C y fotoperiodo de 12 h con riego permanente. Luego de este período se calculó el porcentaje de supervivencia (%S) como la cantidad de plantas cosechadas respecto a las totales trasplantadas, multiplicadas por 100. Al momento de la cosecha las plantas

fueron individualmente fotografiadas y, debido a la heterogeneidad de tamaños dentro de cada unidad experimental, las plantas fueron categorizadas por tamaño (altura total) en chicas, medianas y grandes. Para cada tratamiento se cuantificó el número de plantas de cada categoría y se calculó su frecuencia relativa (%Fr). Como variables del crecimiento se registraron el largo total (Lt) en cm de la parte aérea y los pesos secos de la fracción aérea (PSa) y de la fracción subterránea (PSs). El Lt de cada planta se obtuvo utilizando el procesador de imágenes Image J versión 1.53e (Schneider *et al.*, 2012). sobre cada registro fotográfico. Al momento de la cosecha cada planta fue fraccionada en parte aérea y subterránea, y las fracciones fueron llevadas a estufa (72 h, 70 °C) para la determinación del peso seco, registrado con balanza analítica. De aquí se obtuvo el PSa (mg) y PSs (mg) promedio por planta, dividiendo el peso seco del conjunto de plantas dentro de cada categoría de tamaño por la cantidad de plantas de esa categoría. Complementariamente para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el desarrollo (independientemente de las categorías de tamaño), se contabilizó en cada planta fotografiada, el número de hojas visibles y se calculó la frecuencia relativa (%FrH) de plantas con una, dos, tres o cuatro hojas (%FrH₁, %FrH₂, %FrH₃, %FrH₄, respectivamente).

Análisis de datos

Tanto los datos morfométricos de semillas y frutos, como las longitudes de algunas estructuras de las plántulas se analizaron de manera descriptiva comparando medias y desvíos. El comportamiento germinativo sobre cada unidad experimental inicialmente se evaluó por medio de un ajuste no lineal de los porcentajes acumulados de germinación (%Gt) en función del tiempo (t) con la siguiente función: %Gt= $A \cdot (1 - 1/(1+(t/B)^k))$ (Geshnizjani *et al.*, 2018; Manfreda *et al.*, 2020). De la misma se obtuvieron los siguientes parámetros: Porcentaje Máximo de Germinación (parámetro A); Tiempo Medio de Germinación (parámetro B) y el valor adimensional de la Uniformidad en la Germinación (parámetro k). Además con esta ecuación se estimó el tiempo de inicio de germinación (T₁₀). Para analizar tanto el efecto del período de almacenamiento de semillas como el periodo de exposición a HT de semillas E21 y D21 (y su interacción) sobre cada parámetro y el

T₁₀ se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($\alpha \leq 0,05$), dado que los mismos carecieron de normalidad y/o homecedasticidad (Sokal & Rohlf, 1986).

El análisis del efecto de diferentes períodos de exposición de semillas a HT sobre el vigor de las plantas producidas, por un lado se llevó adelante con un ANOVA de dos factores: tratamientos (0dHT, 9dHT y 30dHT) y categoría de tamaño (chicas, medianas y grandes) para las variables %Fr, Lt, PSa y PSs, una vez comprobada la normalidad y/o homecedasticidad y transformación de ser necesario. Por otro lado, se realizó un ANOVA de un solo factor (tratamiento) para las variables %FrH1, %FrH2, %FrH3 y %FrH4. Los contrastes se realizaron con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0,05$).

Todos los procedimientos estadísticos descritos en este apartado se realizaron con el programa InfoStat versión 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2018).

RESULTADOS

Frutos, semillas, transición semilla-plántula, plántulas normales y anormales

Las cápsulas aún cerradas colectadas en su ambiente natural, presentaron dimensiones de 0,9 cm ($\pm 0,2$) de largo y 0,7 ($\pm 0,1$) cm de diámetro (Fig. 2A). La cantidad de semillas promedio por fruto fue de 90 ($\pm 9,6$). Dentro de la escasa variabilidad de formas encontradas, en su mayoría correspondieron a semillas planas y deltoides, con tegumento externo de textura lisa y color negro brillante. Las pocas anomalías detectadas consistieron en alteraciones en el grosor, sea por su irregularidad o por su escaso espesor, en este último caso acompañada por una superficie reducida (semillas vanas) (Fig. 2B). Respecto a las dimensiones, las semillas categorizadas como normales presentaron valores entre 0,5 ($\pm 0,05$) y 0,4 ($\pm 0,06$) cm de largo y ancho, respectivamente. El peso de 1000 semillas fue de 1,38 g ($\pm 0,03$). Las pruebas histoquímicas en semillas hidratadas evidenciaron que el endosperma de esta especie contiene abundantes lípidos y proteínas (Fig. 3), mientras que no se detectó la presencia de almidón (datos no mostrados).

En la descripción morfológica y macroscópica de los subestadios de la transición semilla-plántula proveniente de semillas de 10 meses de

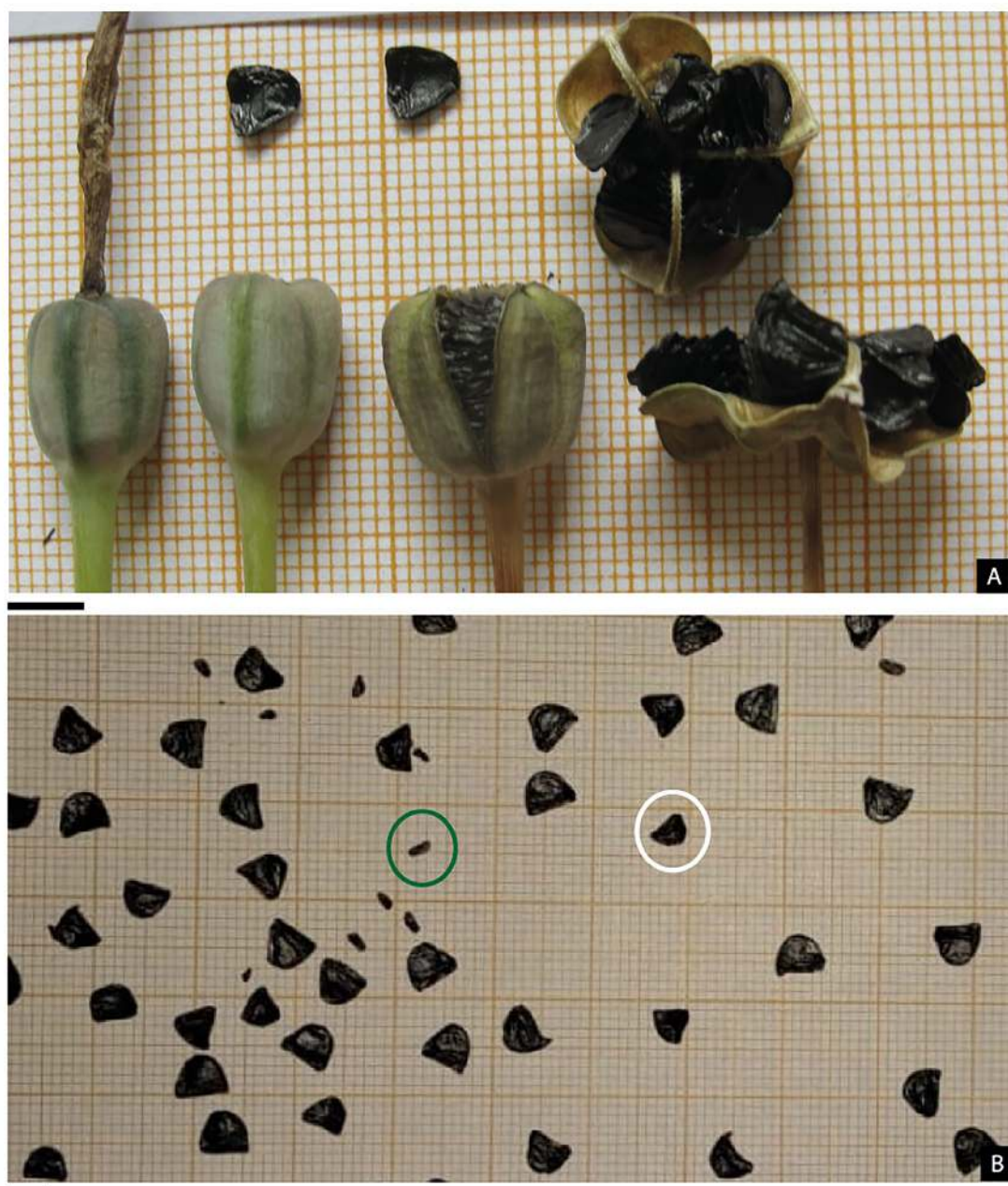


Fig. 2. Cápsulas y semillas de *Z. tubispatha*. **A.** Cápsulas cerradas, abiertas y con semillas a la vista. **B.** Detalle de variabilidad en tamaño y forma de semillas. Círculo blanco indica semilla irregular, círculo verde semilla vana. Escalas= 5 mm.

almacenamiento y germinada bajo luz, se logró registrar un primer subestadio que comprendió desde la siembra (imbibición) hasta el momento previo de la germinación. En este primer subestadio las semillas incrementaron cuatro veces su peso

fresco inicial por hidratación (de 0,04 a 0,16 g $\pm$ 0,03) (Fig. 4A). Un segundo subestadio se correspondió con la germinación, en el que se observó la emergencia (crecimiento) del hipófilo del cotiledón de coloración inicial blanquecina y

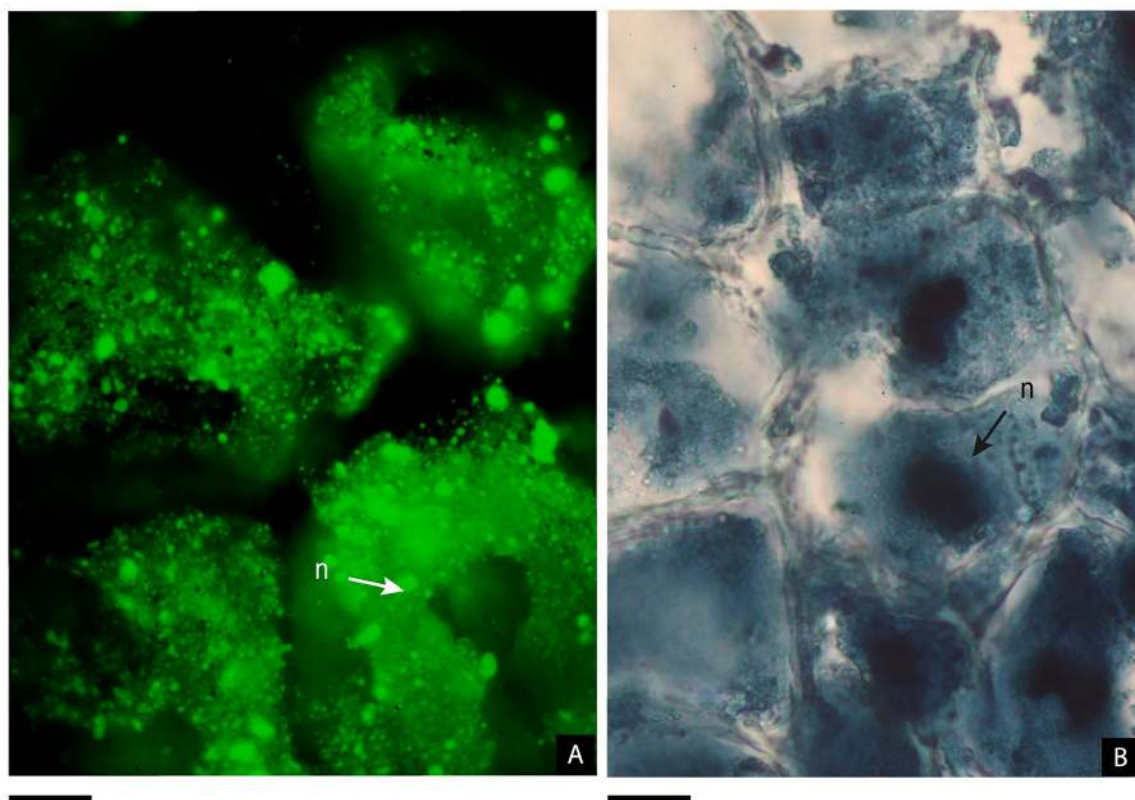


Fig. 3. Prueba histoquímica en endosperma de *Z. tubispatha*. **A.** Reacción positiva para lípidos con azul de nilo. **B.** Reacción positiva para proteínas con amido black. Abreviatura= n: núcleo. Escalas= 20 μ m.

de aproximadamente 2 mm de longitud (Fig. 4B). Cabe destacar que el eje embrionario, que se ubica en el extremo inferior de dicha estructura, es de un tamaño muy reducido y en este subestadio aún no ha iniciado su crecimiento. El hiperfilo del cotiledón en este subestadio es blanquecino (Fig. 4C) y aún permanece en el interior de la semilla. Este segundo subestadio fue el empleado para determinar la germinación, y en estas condiciones, se alcanzó a las 40 h aproximadamente desde la siembra (ver comportamiento germinativo en la próxima sección). En un tercer subestadio se observó un marcado crecimiento del hiperfilo del cotiledón, el cual alcanzó una longitud final promedio de 4 mm (Fig. 4D) y adquirió paulatinamente una coloración verde pálida. El cuarto subestadio se caracterizó por el desarrollo de estructuras propias del sistema radical (elongación de la radícula y la aparición de rizoides del cuello), como consecuencia del

crecimiento del eje embrionario (Fig. 4E). Un quinto subestadio se estableció a partir de la visualización del primer eófilo (hoja verdadera), el cual emerge a través del anillo del hiperfilo del cotiledón. La zona proximal del hiperfilo del cotiledón adquirió coloración verde y se extendió por fuera de la semilla alcanzando una longitud máxima de aproximadamente 2 mm, mientras que el hiperfilo se engrosó paulatinamente, tomando primero una coloración rojiza y finalmente verde, sin modificar su longitud (Fig. 4F). A medida que progresó esta última etapa se observó un continuo crecimiento del eófilo y de la raíz primaria, mientras que la zona distal del hiperfilo (haustorio) permaneció en el interior de la semilla.

Más avanzado en el subestadio 5, el haustorio mostró claros síntomas de inicio de senescencia y el endosperma en estas instancias fue muy escaso. Tanto la parte emergida del eófilo como la raíz

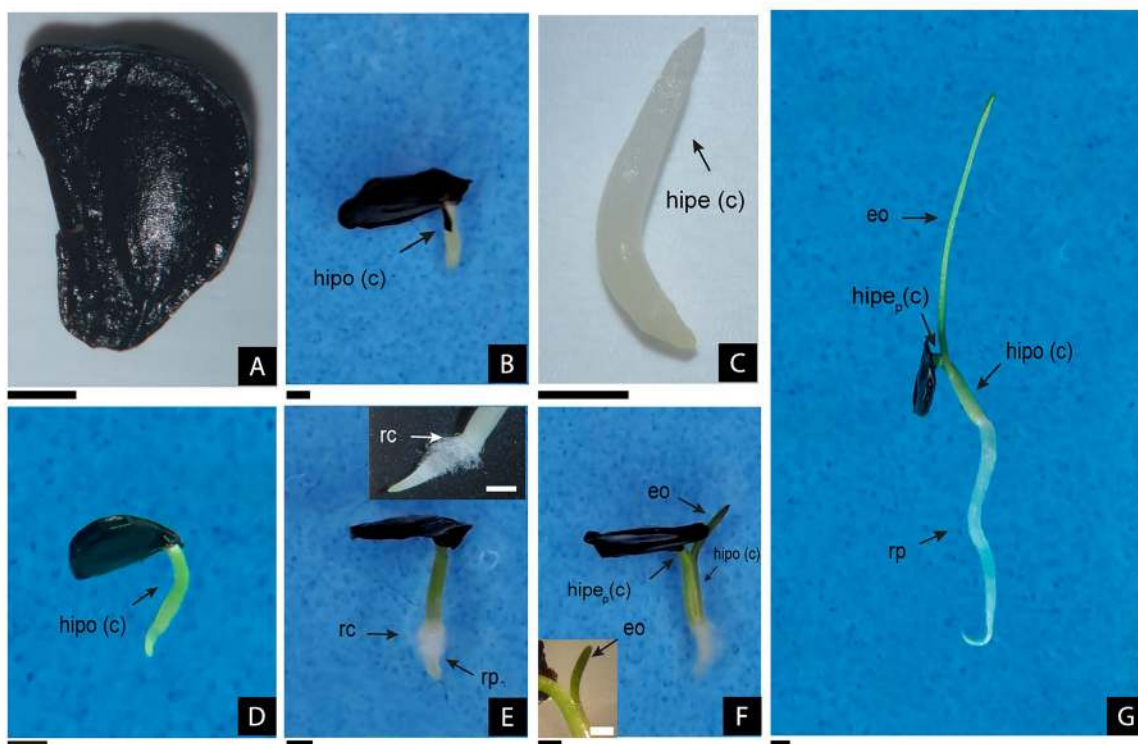


Fig. 4. Subestadios en la transición semilla-plántula de *Z. tubispatha*. **A.** Semilla completamente hidratada. **B.** Semilla germinada. **C.** Embrión aislado de semilla germinada. **D.** Hipofilo del cotiledón totalmente expandido. **E.** Aparición de estructuras del sistema radical, con detalle en extremo superior derecho. **F.** Eófilo emergido con detalle en extremo inferior izquierdo. **G.** Plántula completa y normal a 11 días desde la siembra, y cubierta seminal (derecha). Abreviaturas= eo: eófilo; hipe(c): hiperfilo cotiledonar; hipe_p(c): segmento proximal del hiperfilo cotiledonar; hipo(c): hipofilo cotiledonar; rc: rizoides del cuello; rp: raíz primaria. Escalas= 1mm.

superaron 1 cm de longitud. La coloración adquirida y el tamaño alcanzado, permitieron identificarlas como plántulas completas y por lo tanto normales (Fig. 4G). La etapa de desarrollo de plántula se dio por finalizada dado el agotamiento de las reservas y la presencia de órganos fotosintéticos completos que sustentan el metabolismo y crecimiento de la planta.

Las semillas sembradas en oscuridad total produjeron plántulas totalmente etioladas al cabo de los 11 días. Estas presentaron las mismas estructuras y secuencias que en la descripción anterior, aunque se observaron algunas alteraciones en cuanto al tamaño, coloración y tiempo de aparición, en relación con síntomas típicos de etiolación. Por ejemplo, desde momentos previos a la emergencia del eófilo, la translucidez del cotiledón permitió

observar que el extremo superior del eófilo presentó coloración amarillo-pálido y mantuvo esta coloración a medida que se elongó, mientras que el resto del eófilo permaneció sin evidencia de pigmentos fotosintéticos (Fig. 5A). El hipofilo alcanzó una longitud máxima de 0,7 cm, mientras que la longitud de la zona proximal del hiperfilo no se vio afectada por la ausencia de luz. Otro efecto de la oscuridad fue que ambas estructuras presentaron una coloración blanquecina-translúcida (Fig. 5B). Se observó una mayor elongación del eófilo y un retraso en su emergencia de aproximadamente 48 h, respecto de las semillas germinadas en presencia de luz.

En las semillas de 22 meses de almacenamiento no se lograron identificar estructuras que evidenciaran una transición de semilla-plántula

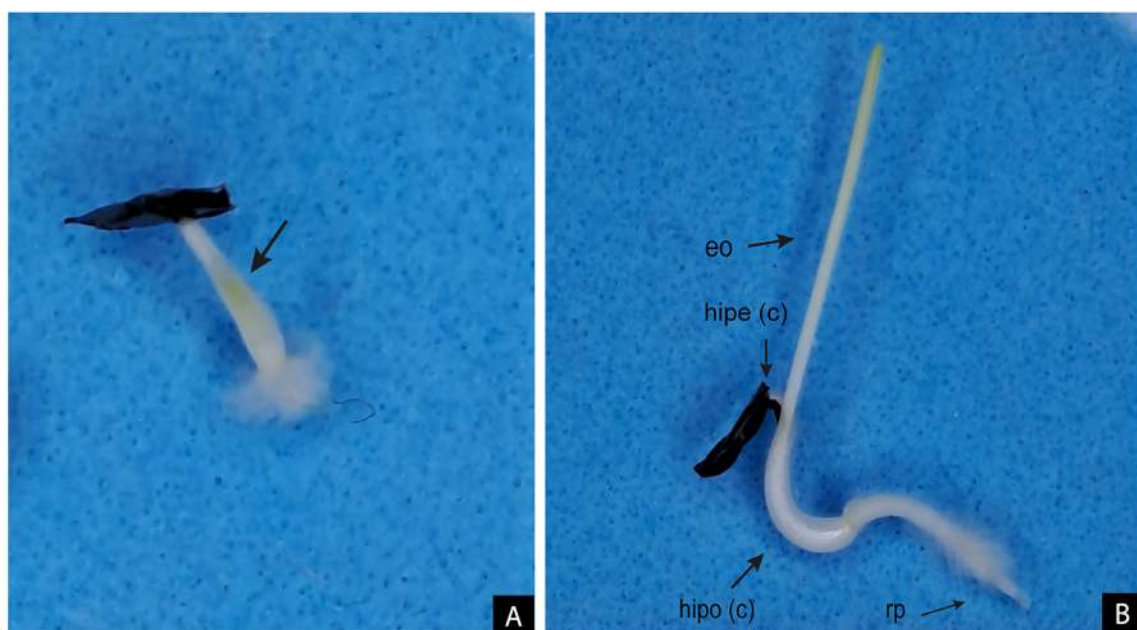


Fig. 5. Plántula de *Z. tubispatha* cultivada en oscuridad. **A.** Hipofilo del cotiledón translúcido, que permite observar el eófilo (indicado con flecha). **B.** Plántula a 8 días desde la siembra. Abreviaturas= eo: primer eófilo; hipe_p (c): segmento proximal del hiperfilo cotiledonar; hipo(c): hipofilo cotiledonar; rp: raíz primaria. Escalas= 1 mm.

completa durante los 11 días de seguimiento, tal como fue descrita para semillas de 10 meses de almacenamiento. Algunas de las semillas de 22 meses de almacenamiento que lograron germinar (ver comportamiento germinativo en la próxima sección) presentaron ausencia de algunas estructuras y/o presencia de atrofas. Respecto a las estructuras, si bien se observó el crecimiento completo del hipofilo del cotiledón, hubo ausencia de desarrollo de los rizoides en el cuello y de crecimiento del eje embrionario, no registrándose alargamiento de la raíz primaria ni formación de eófilo. Acerca de las estructuras atrofiadas, se observó durante la germinación una coloración castaña en el extremo del embrión emergente en el que se ubica el eje embrionario, indicando un posible daño (Fig. 6A, B). En algunas plántulas también se evidenció que el hipofilo del cotiledón presentó una coloración verde-violácea, de mayor grosor y abierto en todo su largo (Fig. 6C). Este registro de estructuras ausentes y/o presentes pero atrofiadas permitió su clasificación como plántulas anormales.

Efecto del período de almacenamiento de semillas sobre el comportamiento germinativo y el deterioro seminal

Tanto las semillas con 0 meses de almacenamiento como las de 10 meses, presentaron un T_{10} cercano a las 40 h, y alcanzaron valores de %G alrededor del 100% al cabo de 150 y 200 h, respectivamente (Fig. 7A). El valor de B, (tiempo en el que se produce el 50% de semillas germinadas) fue de 68,74 h para las semillas con 0 meses de almacenamiento, mientras que para las de 10 meses fue de 97,14 h, sin diferencias significativas ($\alpha \geq 0,05$). Las semillas con 12 meses de almacenamiento presentaron un T_{10} de 128 h (Fig. 7A), un valor de B de 203,34 h (mayor que las de 0 meses de almacenamiento, $\alpha \leq 0,05$) y recién a las 900 h se registró un 70% de semillas G (dato no mostrado). Las restantes semillas no germinadas se identificaron como M y F con valores de 9 y 21%, respectivamente. Las semillas con 22 meses de almacenamiento alcanzaron un T_{10} a



Fig. 6. Anormalidades en *Z. tubispatha*. **A-B.** Semilla germinada. **C.** Hipofilo del cotiledón atrofiado. Abreviaturas= hipe_d(c): segmento distal del hiperfilo cotiledonar (haustorio); hipo(c): hipofilo cotiledonar. Escalas= 1 mm.

las 400 h (Fig. 7A) y el 50% de germinación se registró alrededor de las 900 h (datos no mostrados). De las semillas no germinadas se obtuvieron valores de 3 para %F, mientras que el resto se correspondió a %M. Las semillas con 34 y 46 meses de almacenamiento alcanzaron valores 100 para %M. Por su parte, el valor de k osciló entre 2 y 5, sin que las diferencias resultaran estadísticamente significativas ($\alpha \geq 0,05$).

La prueba de conductividad eléctrica mostró que las semillas de 4 meses de almacenamiento presentaron una menor pérdida relativa de electrolitos que las de 18 meses. Los valores porcentuales de pérdida de electrolitos fueron, del orden del 15% ($\pm 0,8$) y del 24% ($\pm 0,8$), respectivamente.

La tinción con trifenil tetrazolio realizada a embriones de semillas de 6 meses de almacenamiento mostró coloraciones intensas y uniformes tanto

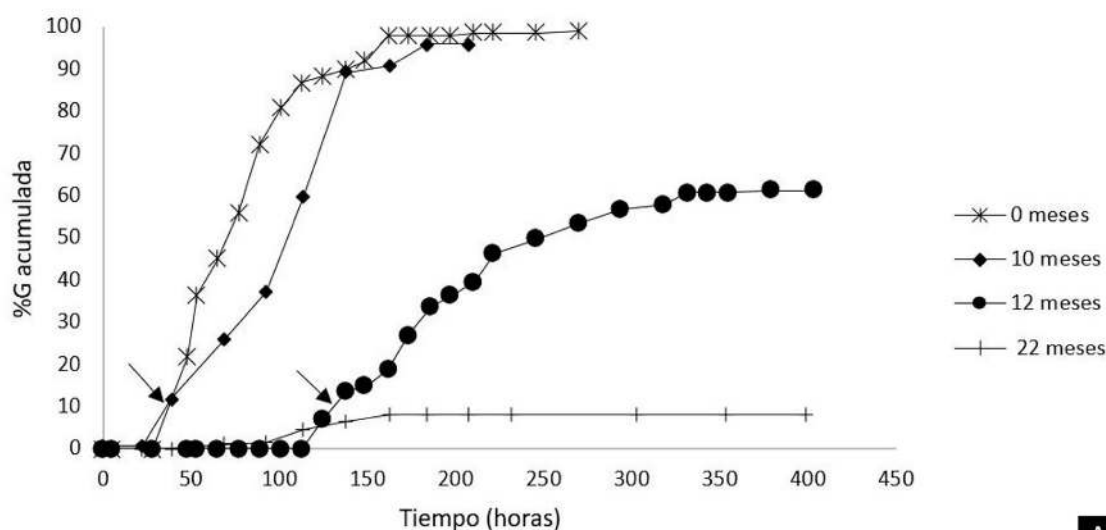
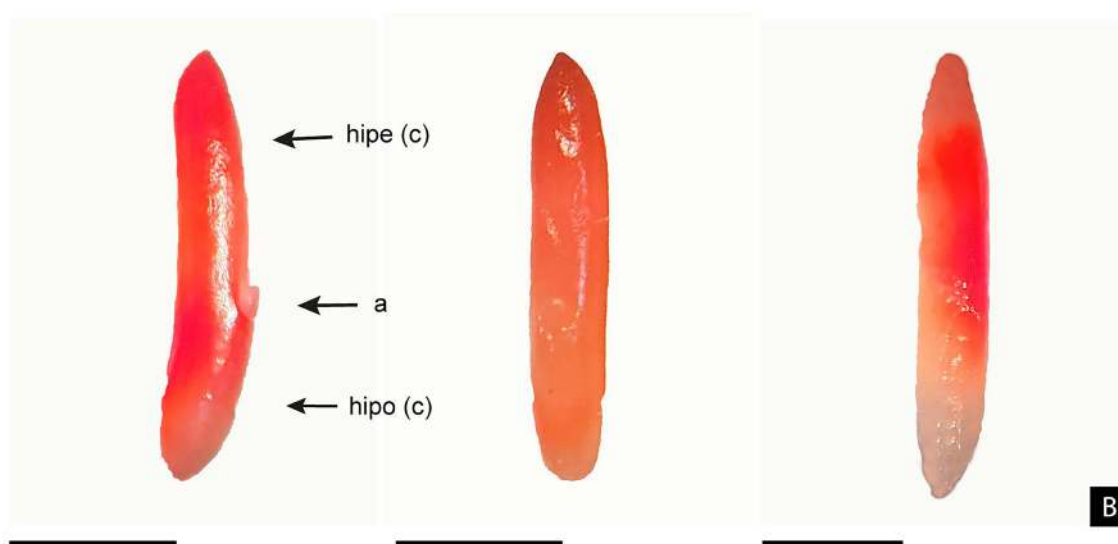

A

B

Fig. 7. A: Porcentaje de germinación acumulada de *Z. tubispatha*, de semillas de 0, 10, 12 y 22 meses de almacenamiento a temperatura ambiente. La flecha indica el inicio de la germinación. **B:** Embriones de *Z. tubispatha* teñidos con TZA procedentes de semillas de 6, 10 y 18 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (de izquierda a derecha). Abreviaturas= a: anillo del hipocotiledonar; hipe(c): hiperfilo cotiledonar; hipo(c): hipocotiledonar. Escalas= 1mm

en el hiperfilo como en el anillo y el hipocotiledonar del cotiledón, predominando las tonalidades rosada, rojiza y ocasionalmente anaranjada. En algunos casos la región haustorial del hiperfilo se tiñó más pálidamente (Fig. 7B). Los embriones provenientes de semillas de 10 meses de almacenamiento, también mostraron una coloración uniforme en todo el cotiledón que varió entre rosa y rojo. Solo

ocasionalmente se registró ausencia de coloración en la región haustorial (Fig. 7B). Por el contrario, los embriones provenientes de semillas de 18 meses de almacenamiento, presentaron mayoritariamente una coloración rosa tenue a blanquecina en el anillo e hipocotiledonar, persistiendo sólo la tinción del hiperfilo, con tonalidades rojizas a anaranjadas (Fig. 7B).

Efecto de la alta temperatura sobre la germinación de semillas producidas a fin de primavera y mediados de verano

La presencia de HT inhibió completamente la germinación en ambos grupos de semillas, resultando en un 100% de semillas F. Una vez transferidas a 20 °C, se registraron valores de %G que superaron el 75%, aunque la dinámica de la germinación varió dependiendo tanto de la longitud del pretratamiento a HT, como del momento en que se cosecharon las semillas (Fig. 8).

En líneas generales, las semillas cosechadas en enero (lote E21) presentaron menores valores de A que las de diciembre (lote D21), independientemente del tratamiento térmico (Tabla 1). El pretratamiento a HT aceleró la dinámica de la germinación en las semillas E21, siendo más marcado el efecto en aquellas expuestas durante un período prolongado (v.g. tratamiento 30dHT) (Fig. 8; Tabla 1). Por el contrario, en las semillas D21, si bien el pretratamiento 30dHT también aceleró tanto el

inicio como la velocidad de la germinación, en las semillas expuestas durante 9dHT se observó una tendencia opuesta (ej. Fig. 8), aunque sin diferencias significativas respecto del control (0dHT) en los parámetros de la función analizada (Tabla 1).

Efecto de diferentes períodos de exposición de semillas a altas temperaturas, sobre el vigor de las plantas obtenida

Las plántulas obtenidas de los tratamientos 0dHT, 9dHT y 30dHT al momento del trasplante presentaron similar aspecto entre sí y coincidente con lo ya descrito para plántulas normales. Luego de las 5 semanas de cultivo en todos los tratamientos se alcanzaron altos valores de supervivencia que variaron entre un 85 y 90%, independientemente del tratamiento. Las mismas también se identificaron como normales, ya que presentaron todos los órganos completos, sin deformidades y similar morfología (coloración verde de la porción aérea, hojas lineales, presencia de bulbo y raíces blanquecinas).

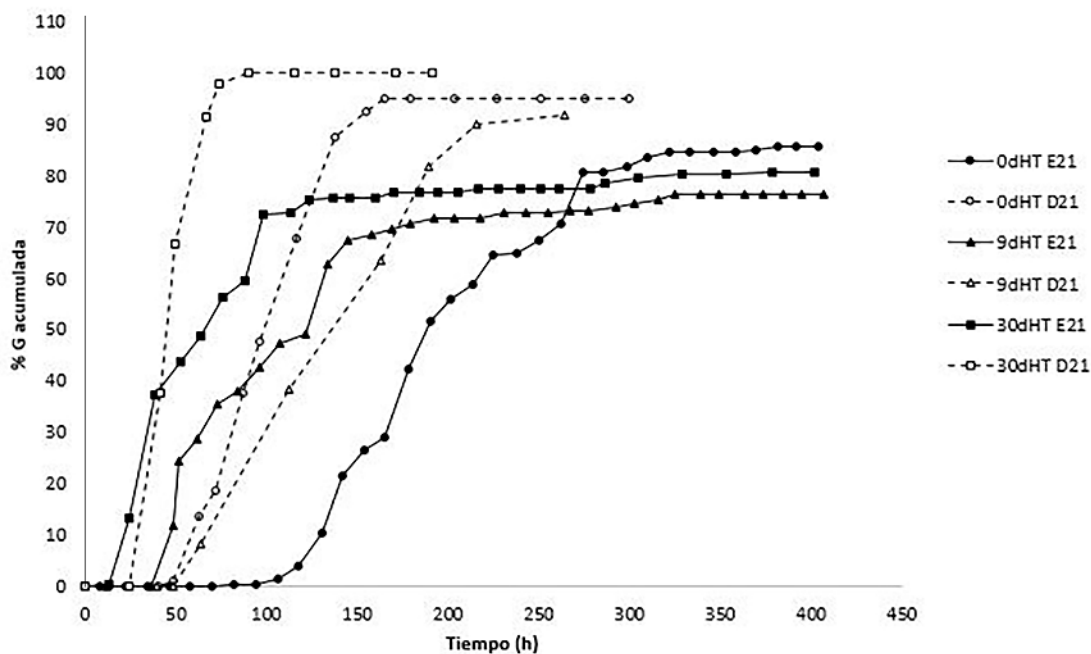


Fig. 8. Porcentaje de germinación acumulada a 20 °C de *Z. tubispatha* para semillas provenientes de diferentes momentos de semillazón y de diferentes períodos de exposición a 33 °C. Abreviaturas= E21 y D21: semillas cosechadas en diciembre y enero 2021 respectivamente; 0dHT, 9dHT y 30dHT: indican el período de exposición de semillas incubadas a HT (33 °C).

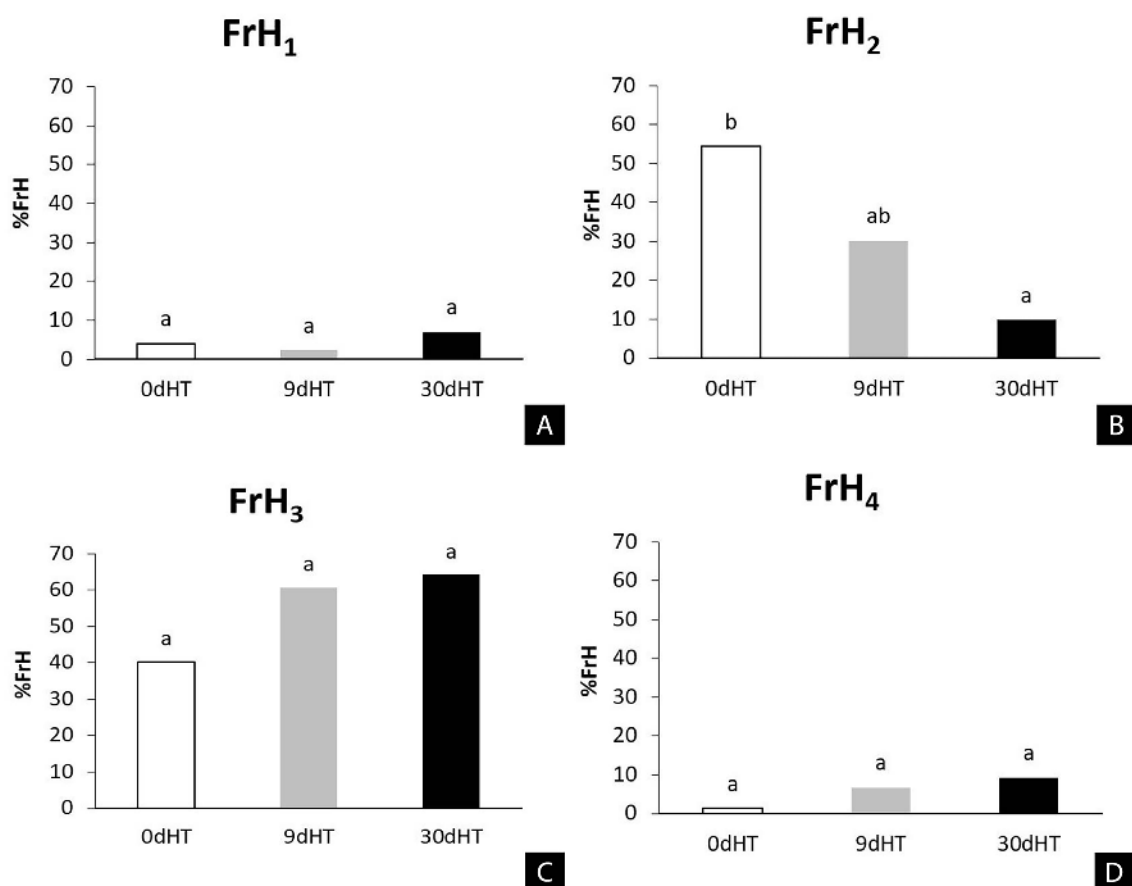


Fig. 9. Porcentaje de frecuencia relativa promedio (%FrH) de plantas de *Z. tubispatha* con 1, 2, 3 y 4 hojas (A, B, C y D, respectivamente) por cada tratamiento. Las letras diferentes dentro de cada cuadrante indican diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$).

Se observaron diferencias significativas por categorías de tamaño para la mayoría de las variables del crecimiento analizadas, siendo los valores más altos para las plantas categorizadas como grandes y medianas (Tabla 2). Sin embargo, no se detectaron variaciones significativas debidas a la interacción tamaño x tratamiento ni tampoco por efecto del tratamiento térmico ($\alpha \geq 0,05$). Los mayores valores de %Fr lo alcanzaron las plantas categorizadas como medianas y grandes, con porcentajes promedio cercanos al 80% ($\pm 4,5\%$) entre ambas. Respecto al Lt las plantas grandes presentaron valores entre 6 y 7 cm, duplicando los alcanzados por las plantas chicas (Tabla 2). Similarmente los valores registrados de PSa

y PSs para plantas grandes (entre 3 y 4 mg, y 0,2 y 0,3 mg, respectivamente) triplicaron lo alcanzado por las chicas. Las diferencias que se observan entre los pesos de PSa y PSs se deben principalmente a la formación de bulbos.

Respecto al desarrollo, para todos los tratamientos se observaron plantas con 1, 2, 3 o 4 hojas, siendo la abundancia de plantas con 1 y 4 hojas marginal (%FrH menor al 10%, Fig. 9A, D). Para %FrH₂ el tratamiento 0dHT obtuvo el mayor valor (60%, barras blancas Fig.9B); mientras que para %FrH₃, si bien parecen ser valores mayores en los tratamientos 9dHT y 30dHT, lo que sugeriría un desarrollo más avanzado, no se diferenciaron estadísticamente de 0dHT (Fig. 9C).

Tabla 1. Valores promedio de B, A, K y del T_{10} , para semillas de *Z. tubispatha* provenientes de diferentes momentos de semillazón y de diferentes periodos de exposición a alta temperatura. Los desvíos estándar están entre paréntesis. Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$). Abreviaturas= E21 y D21: semillas cosechadas en diciembre y enero 2021 respectivamente; 0dHT, 9dHT y 30dHT: indican el periodo de exposición de semillas incubadas a HT (33 °C).

Momento de semillazón	Periodo (días) de exposición a HT	B (h)	A (%)	K	T_{10} (h)
E21	0	185,37 (9,9) c	87,72 (6,2)ab	5,80 (1,7) bc	125,47 (10,8) c
	9	85,53 (24,7) ab	75,83 (6,8) a	3,66 (0,7) ab	52,12 (20,5) ab
	30	48,26 (8,8) a	80,88 (4,5) a	2,41 (0,5) a	21,27 (7) a
D21	0	95,27 (2,7) ab	96,90 (6,3) b	5,47 (0,9) bc	63,69 (6,7)bc
	9	133,65 (1,5) bc	102,38 (12,9) b	4,09 (1,7) abc	72,73 (16,6) bc
	30	44,1 (3,5) a	99,40 (1,3) b	7,08 (0,7) c	32,33 (3,2) ab

Tabla 2. Valores promedio de porcentaje de frecuencias relativa de plantas (%Fr) de *Z. tubispatha* y de las variables de crecimiento para cada tratamiento y categoría de tamaño. Los desvíos estándar están entre paréntesis. Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$). Abreviaturas= 0dHT, 9dHT y 30dHT: indican el periodo de exposición de semillas incubadas a HT (33 °C). Lt: largo total de la parte aérea; Pss: peso seco subterráneo, y Psa: peso seco aéreo.

Tamaño	Fr (%)			Lt (cm)			Pss (mg)			Psa (mg)		
	0dHT	9dHT	30dHT	0dHT	9dHT	30dHT	0dHT	9dHT	30dHT	0dHT	9dHT	30dHT
Grandes	30,7 (4,5)a	37,9 (9,3)a	35,0 (6,3)a	5,8 (0,4)a	6,1 (1,2)a	6,97 (1,8)a	3,89 (0,2)a	3,99 (0,2)a	3,16 (0,2)a	0,23 (0,1)a	0,27 (0,1)a	0,32 (0,1)a
Medianas	42,3 (4,0)a	41,3 (8,1)a	49,2 (11,4)a	4,5 (0,6)b	4,6 (1,1)b	5,3 (1,3)b	3,08 (0,2)b	2,88 (0,2)b	2,21 (0,2)b	0,17 (0,1)b	0,18 (0,1)b	0,23 (0,1)b
Chicas	26,9 (8,1)b	20,8 (11,5)b	15,7 (11,6)b	3,18 (0,6)c	3,21 (1,6)c	3,6 (0,4)c	1,84 (0,2)c	1,14 (0,2)c	1,02 (0,2)c	0,09 (0,1)c	0,10 (0,1)c	0,10 (0,1)c

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las dimensiones aquí registradas sobre las cápsulas de *Z. tubispatha* ($0,7 \text{ cm} \pm 0,1$) fueron menores en diámetro que las informadas para ésta y otras especies del mismo género: por ejemplo, para *Z. tubispatha* se mencionan valores de 1 cm de diámetro, para *Z. gracilifolia* (Herb.) G.Nicholson de 1,5 a 1,8 cm, en *Z. pedunculosa* (Herb.) Nic. García & S.C.Arroyo 1-1,5 cm y en *Z. martinezii* (Ravenna) Nic.García 1-1,2 cm (Roitman & Hurrell, 2009). Cualitativamente las cápsulas presentaron forma alargada u oblonga, con semillas de escasa variabilidad en textura y color. La forma de las cápsulas difiere a la mencionada por dichos

autores, que las describen con forma redondeada u orbicular, aunque sí hay coincidencia en cuanto a la descripción exomorfológica de las semillas (lisas y negras brillantes). La coloración de las semillas ha sido relacionada con la presencia de fitomelanina, pigmento característico del tegumento seminal de numerosas familias dentro del orden Asparagales (Meerow & Snijman, 1998; Simpson, 2006), aspecto aún a investigar para este género. En relación a la cantidad de semillas por fruto, aquí se registraron valores de aproximadamente el doble o triple en comparación con lo registrado por otros autores. Afroz *et al.* (2018) mencionan un valor promedio de 30 semillas por fruto, en plantas cultivadas de forma *ex situ*, mientras que

Fernández *et al.* (2011) indicaron un promedio de 54,4 semillas por fruto provenientes de flores autopolinizadas y de 51,1 semillas provenientes de frutos de polinización cruzada. Cabe señalar que en estos últimos casos las plantas fueron cultivadas en condiciones de invernadero. Los altos valores aquí registrados de semillas por fruto, en parte podrían deberse a que estos fueron colectados directamente de ambientes naturales, donde la floración ocurre en presencia de sus agentes polinizadores habituales y por lo tanto podría inferirse una mayor eficiencia en dicho proceso.

El endosperma de semillas de *Z. tubispatha* presentó la misma reacción que *Z. bifida* (Goyenette *et al.*, 2022) frente a las pruebas histoquímicas realizadas. El peso de mil semillas fue menor que el registrado para especies emparentadas, tales como *Z. bifida* y *Z. gracilifolia* (Echeverría & Alonso, 2010). Si bien no se hallaron trabajos donde se abordara éste último aspecto en *Z. tubispatha*, y podría ser considerado como propio de cada especie, es ampliamente conocida la influencia del ambiente sobre el número, tamaño y peso de semilla como así también en el tamaño de los frutos (ej. Delouche, 1980; Parciak, 2002; Jacobs & Lesmeister, 2012; Liu *et al.*, 2017). La influencia del factor genético merecería ser testeada más profundamente en un amplio rango de condiciones ambientales y en particular para el tamaño y peso de semilla, ya que son características importantes utilizadas para determinar la calidad de simientes de plantas con flores (ISTA, 2010).

La descripción macroscópica de la transición semilla-plántula se pudo concretar satisfactoriamente aplicando tanto la terminología general que emplea Tillich (2007) para indicar estructuras en monocotiledóneas, como la particular para embriones y plántulas de *Z. bifida* empleada por Goyenette *et al.* (2022). En *Z. tubispatha*, se lograron establecer cinco subestadios según eventos secuenciales: 1) imbibición, 2) emergencia del cotiledón, 3) crecimiento de la raíz primaria, 4) emergencia del eófilo y 5) senescencia del haustorio y establecimiento de plántula. Para *Z. bifida* los eventos 3 y 4 fueron reportados como simultáneos (Goyenette *et al.*, 2022). Queda por investigar, ampliando el número de especies, si ésta diferencia se relaciona con el hecho de que pertenezcan a subgéneros distintos, *Z. bifida* se circunscribe al subgénero *Neorhodophiala* Nic. García & Meerow

y *Z. tubispatha* al subgénero *Zephyranthes*. Por lo tanto, las estructuras identificadas, aunque se consideraron como similares macroscópicamente, deben ser analizadas más profundamente a fin de confirmar la extrapolación de la terminología empleada. Por su parte, los subestadios, del estado de desarrollo 0 de la escala BBCH extendida para monocotiledóneas comerciales (Meier, 2018) no resultaría adaptable en el presente estudio, ya que, por un lado, la sucesión de eventos se plantea de manera diferente y por otro, señalan subestadios que aquí no se registraron. Ilustrando lo anterior, luego de la imbibición, ubican la emergencia y crecimiento de la radícula seguido del crecimiento/emergencia de cotiledones; mientras que en *Z. tubispatha* se registró primero la emergencia del cotiledón, en relación con su crecimiento, y luego el de la radícula. Respecto a la emergencia de las hojas la establecen en conjunto con la senescencia del cotiledón, mientras que aquí se registra solo la senescencia del haustorio en subestadios avanzados de la plántula y en conjunto con el crecimiento del primer eófilo. Estos resultados destacan la importancia, por un lado, de desarrollar estudios específicos de desarrollo morfológico/anatómico, ya que su desconocimiento puede llevar a cometer errores en la determinación de poder germinativo y otras valoraciones de la calidad de semillas. Por otro lado, ahondar en procesos tales como el crecimiento del eje embrionario, podrían contribuir a vislumbrar mecanismos conservados y específicos de especies (Steinbrecher & Leubner-Metzger, 2018).

Las plántulas cultivadas en luz, y categorizadas aquí como normales en subestadios avanzados de *Z. tubispatha*, difieren visualmente con las de *Z. bifida* (Steinbrecher & Leubner-Metzger, 2018) aparentemente por la pérdida de rizoides en su cuello (tanto en presencia como ausencia de luz) y por la longitud alcanzada tanto por el hipófilo como por la zona proximal del hiperfilo del cotiledón. Estas observaciones necesitan de mayores estudios para ser confirmadas, dada su dependencia a las condiciones ambientales como la persistencia del collar de rizoides según la humedad ambiental y la longitud de estructuras por la condición lumínica. Las plántulas cultivadas en ausencia de luz presentaron un fenotipo etiolado típico, que se caracterizó por falta de coloración verde y elongación de estructuras fotosintéticas, a excepción de la longitud de la zona proximal de hiperfilo que no presentó variación.

Las plántulas de semillas almacenadas por más de un año y medio revelaron ausencia de ciertas estructuras y/o presencia de las mismas pero atrofiadas. Esto sugiere que las semillas que germinaron, según criterio de emergencia del hipofilo del cotiledón, no desarrollaron el eje embrionario y presentaron engrosamiento del hipofilo del cotiledón, llevando a una ausencia tanto de órganos fotosintéticos como del sistema radicular. En este sentido, la germinación no condujo a la producción de plántulas normales, aspecto a evaluar por los test de calidad de semillas como el del poder germinativo, con lo que el seguimiento de los test en *Z. tubispatha* debería extenderse hasta alcanzar el subestadio de desarrollo 5.

El almacenamiento de semillas de *Z. tubispatha* a temperatura ambiente mantuvo altos porcentajes de germinación con bajos valores de B (tiempo medio de germinación) dentro del primer año de cosecha, en coincidencia con lo informado por Maza *et al.* (2004), pero contradictorios a los planteados por Afroz *et al.* (2018) donde señalan que las semillas pierden la viabilidad al cabo de tres meses. En este último caso, si bien no se especifica cómo se conservaron las semillas durante ese período, es probable que la diferencia se deba a que el experimento se realizó sobre mezcla de suelo y compost, sin control de fotoperiodo y temperatura, lo que podría afectar la sobrevivencia, o bien debido a la procedencia de las semillas (variación ambiental y/o genética). A diferencia del seguimiento aquí realizado, ninguno de estos autores reporta la aparición de plántulas anormales. La aparición de plántulas anormales en semillas de más de un año y medio podría estar asociada con un envejecimiento natural de las semillas, reforzando esta idea con la disminución del porcentaje de germinación y retraso en el inicio y tiempo medio de germinación, que coinciden con los eventos señalados por Bewley *et al.* (2013) para explicar la pérdida de viabilidad como producto del deterioro seminal por la edad. Por otro lado, los tests de trifetil tetrazolio y de conductividad eléctrica, también mostraron que, a partir de los 18 meses de almacenamiento, las semillas están deterioradas. En este sentido, resulta interesante la posibilidad de utilizar estos tests para anticipar la pérdida en la capacidad de producir plántulas normales.

En relación a las respuestas obtenidas luego de la exposición a la HT, se interpreta que la presencia de

termoinhibición en esta especie sería, en términos adaptativos, ventajosa para el establecimiento de plántulas en las condiciones en que naturalmente se encuentran sus poblaciones (Huo & Bradford, 2015; Derakhshan *et al.*, 2018). Dicha adaptación se refiere a que el momento de producción de semillas coincide con temperaturas altas (primavera-verano) y con copiosas lluvias ocasionales, previniéndose o retrasándose la germinación por la presencia de termoinhibición, mientras que la disminución de la temperatura hacia el otoño y el aumento de las precipitaciones crearían condiciones favorables para la germinación, crecimiento y desarrollo vegetativo de las plántulas (Yoong *et al.*, 2016). La efectividad de este mecanismo adaptativo se evidenciaría para *Z. tubispatha* en la inhibición de la germinación por temperaturas correspondientes a las estivales (como la alta temperatura aquí empleada), por su desinhibición cuando las temperaturas descienden en otoño (próximas a los 20 °C) y por el mantenimiento del vigor y de una alta supervivencia de las plántulas en época de otoño-invierno, luego de períodos largos (30 días) de permanecer termoinhibidas. Es así que este mecanismo aplicado a programas de reproducción daría la flexibilidad para elegir el momento de siembra, ya que, aun disponiendo de agua, la germinación sólo se daría cuando las temperaturas estén por debajo de las temperaturas supraóptimas y sin pérdida de plantas ni de su vigor.

Se espera que la información aquí recabada pueda, por un lado, ampliar el conocimiento de los factores a tener en cuenta para optimizar la conservación y propagación mediante semillas de esta especie y, por otro lado, contribuir con herramientas complementarias, como las descripciones morfológicas de semillas y de las primeras etapas del desarrollo, a discriminar entre la diversidad de especies que se circunscriben en el subgénero *Zephyranthes* (García *et al.*, 2019).

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

AMC, MVT y CFH realizaron la conceptualización general del manuscrito. MVT realizó las primeras descripciones de embriones y plántulas de *Z. tubispatha*. AMC y AML realizaron ensayos experimentales y toma de datos. AMC, AML, MVT y CFH realizaron registro fotográfico

de embriones y plántulas, AMC y CFH de pruebas histoquímicas. AMC realizó el análisis de datos y estructura general del trabajo. MVT y CFH realizaron supervisión general. Todos los autores participaron en la interpretación de datos, elaboración, redacción y revisión crítica del trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Herbario de la FAA por la identificación de la especie. A Rosa Scaramuzzino por los aportes bibliográficos y orientaciones para realizar las primeras descripciones de embriones y plántulas de *Z. tubispatha*. A Juan Manuel Goyenette por la orientación y corrección de la nomenclatura botánica de las especies aquí mencionadas. A Marcos Pavón por la colaboración en la cosecha de plantas durante el ensayo experimental de vigor y a Patricia Acosta por la edición de imágenes. Este trabajo fue financiado con fondos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires y de la Universidad de Buenos Aires (Proyecto UBACyT Mod. I 20020170100331BA).

BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA, M. C., J. M. GOYENETCHE, M. L. ALCARAZ, R. L. SCARAMUZZINO & V. T. MANFREDA. 2021. Morfología de plántulas de *Zephyranthes tubispatha* (L'Hér.) Herb. (Amaryllidaceae) del centro de la provincia de Buenos Aires. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 56(Supl.): 112-113.
- ACOSTA, M. C., V. T. MANFREDA, M. L. ALCARAZ, S. ALEMANO & H. F. CAUSIN. 2022. Germination responses in *Zephyranthes tubispatha* seeds exposed to different thermal conditions and the role antioxidant metabolism and several phytohormones in their control. *Seed Sci. Res.* 32: 230-245.
<https://doi.org/10.1017/S0960258522000228>
- AFROZ, S., M. RAHMAN & M. HASSAN. 2018. Taxonomy and reproductive biology of the genus *Zephyranthes* Herb. (Liliaceae) in Bangladesh. *Bangladesh J. Pl. Taxon.* 25: 57-69.
<http://dx.doi.org/10.3329/bjpt.v25i1.37181>
- AGUILAR-AVENDAÑO, O. E. 2016. La conformación de un nuevo instituto de investigaciones orientado a la floricultura en Argentina. En: *Actas resúmenes 9º Jornadas de Sociología de la Universidad Nacional de La Plata*. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, UNLP, La Plata.
- ANTÓN, A. M. & F. O. ZULOAGA. Flora Argentina [online]. Disponible en: <http://www.floraargentina.edu.ar/> [Acceso: 2 diciembre 2022].
- ARROYO, S. C. 1990. *Habranthus* (Amaryllidaceae) en Argentina y Uruguay. *Parodiana* 6: 11-30.
- BAJJI, M., J. M. KINET & S. LUTTS. 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regul.* 36: 61-70.
<https://doi.org/10.1023/A:1014732714549>
- BENECH-ARNOLD, R. L. & R. A. SÁNCHEZ. 2004. *Handbook of seed physiology. Applications to Agriculture*. Food Products Press and The Haworth Reference Press, New York.
- BESNIER ROMERO, F. 1989. *Semillas. Biología y tecnología*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- BEWLEY, J. D., K. J. BRADFORD, H. W. HILHORST & H. NONOGAKI. 2013. *Seeds Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3rd ed. Springer, New York.
- CABEZAS, F., J. ARGOTI., S. MARTINEZ., C. CODINA., J. BASTIDA & F. VILADOMANT. 2007. Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazónica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subdentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae. *Sci. Tech.* 13: 237-241.
- CAVALLARO, V. 2015. *Plantas de la región como fuente potencial de metabolitos secundarios inhibidores de colinesterasa*. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur, Argentina.
- DELOUCHE, J. C. 1980. Environmental effects on seed development and seed quality. *HortScience*. 15: 13-18. <http://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.15.6.775>
- DERAKHSHAN, A., A. BAKHSHANDEH, S. A. A. SIADAT, M. R. MORADI-TELAVAT & S. B. ANDARZIAN. 2018. Quantifying the germination response of spring canola (*Brassica napus* L.) to temperature. *Ind. Crops Prods.* 122: 195-201.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.075>
- DI RIENZO, J. A., F. CASANOVES, M. G. BALZARINI, L. GONZALEZ, ... & C. W. ROBLEDO. 2018. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>

- ECHEVERRÍA, M. L. & S. I. ALONSO. 2010. Germinación y crecimiento inicial de *Habranthus gracilifolius* y *Rhodophiala bifida*, amarilidáceas nativas con potencial ornamental. *Rev. Fac. Cienc. Agrar.* 42: 23-37.
- ERIZE, F. & E. HAENE. 2008. *Relevamiento biológico rápido y plan inicial de manejo de la Reserva Natural Privada El Bonete. Loberia, Buenos Aires.* Bellamar estancias.
- EYNARD, C., A. CALVIÑO & L. ASHWORTH. 2020. *Cultivo de plantas nativas. Propagación y viverismo de especies de Argentina central.* 2da ed. Ecoval Editorial, Córdoba.
- FACCIUTO, G. R., P. BOLOGNA, V. L. BUGALLO & M. C. RIVERA. 2019. Recursos genéticos ornamentales nativos de Argentina: de la colecta a la producción. *Revista RG news*, 5: 13-17
- FERNÁNDEZ, A. C. 2020. *Domesticación y pre-mejoramiento de Amarilidáceas nativas con potencial ornamental.* Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Argentina.
- FERNÁNDEZ, A. C., P. MARINANGELI, N. CURVETTO & G. FACCIUTO. 2013. Reproductive biology of *Habranthus tubispatus*. En: *Actas resúmenes 7º International Symposium on New Floricultural Crops.* Horticulturae 1000. 183-188.
<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1000.23>
- FULCHER, R. 1982. Fluorescence microscopy of cereals. *Food Struct.* 1:167-175.
- GARCÍA, N., A. W. MEEROW, S. ARROYO LEUENBERGER, R. S. OLIVEIRA, J. H. DUTILH, P. S. SOLTIS & W. S. JUDD. 2019. Generic classification of Amaryllidaceae tribe Hippeastreae. *Taxon* 68: 481-498. <http://dx.doi.org/10.1002/tax.12062>
- GENEVE, R. L. 2005. Vigour testing in flower seeds. En: MCDONALD, M. B & F. Y. KWONG (eds.), *Flower seeds: Biology and technology*, pp. 311-332. CABI Publishing, Wallingford.
<http://dx.doi.org/10.1079/9780851999067.0311>
- GOYENETCHE, J. M., M. C. ACOSTA, M. L. ALCARAZ, V. T. MANFREDA & R. L. SCARAMUZZINO. 2022. Caracterización de semillas y plántulas de *Zephyranthes bifida* (Amaryllidaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 57: 1-15.
<http://dx.doi.org/10.31055/1851.2372.v57.n4.37812>
- HARRIS, N. & K. J. OPARKA. 1994. *Plant cell biology: a practical approach.* IRL Press at Oxford University Press, Oxford-New York-Tokyo.
- HUO, H. & K. J. BRADFORD. 2015. Molecular and hormonal regulation of thermoinhibition of seed germination. En: ANDERSON, J. (ed.), *Advances in Plant Dormancy*, pp. 3-33. Springer, Cham.
http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-14451-1_1
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2003. *International rules for seed testing. Rules.* ISTA, Bassersdorf.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2006. *International rules for seed testing.* ISTA, Bassersdorf.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2010. *Handbook on Flower seed testing.* ISTA, Bassersdorf.
- JACOBS, B. S. & S. A. LESMEISTER. 2012. Maternal environmental effects on fitness, fruit morphology and ballistic seed dispersal distance in an annual forb. *Fun. Ecol.* 26: 0588-597.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.01964.x>
- LIU, Y., J. L. WALCK, & Y. A. EL-KASSABY. 2017. Roles of the environment in plant life-history trade-offs. En: JIMENEZ-LOPEZ, J. C. (ed.), *Advances in Seed Biology*, pp. 1-22. IntechOpen, London.
<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70312>
- MANFREDA, V. T., M. C. ACOSTA & M. L. ALCARAZ. 2019. Germinación de *Habranthus tubispatus* a altas temperaturas. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 54(Supl.): 197-197.
- MANFREDA, V. T., M. C. ACOSTA & R. L. SCARAMUZZINO. 2017. Características básicas de la germinación de *Habranthus tubispatus* (L'Hér.) Herb. (Amaryllidaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 52(Supl.): 203-204.
- MARCOS-FILHO, J. 2015. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Sci. Agric.* 72: 363-374.
<http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0007>
- MAZA, I. M., R. URÍA & G. G. ROITMAN. 2004. Propagación sexual de diferentes especies nativas del género *Habranthus*. En: *Actas resúmenes 2º Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales, 6º Jornadas Nacionales de Floricultura y 1º Encuentro Latinoamericano de Floricultura.* pp. 43-45. INTA.
- MEEROW, A. W. & D. A. SNIJMAN. 1998. Amaryllidaceae. En: KUBITZKI, K. (ed.), *Flowering Plants · Monocotyledons. The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 3: 83-110. Springer, Berlin, Heidelberg.
http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-03533-7_11
- MEIER, U. 2018. *Growth stages of mono- and dicotyledonous plants: BBCH Monograph.* Julius

- Quedlinburg, Kühn-Institut (JKI).
<https://doi.org/10.5073/20180906-074619>
- MOREIRA, B., S. LOPES, A. O. DEBLE & L. DEBLE. 2018. Espécies nativas com potencial ornamental ocorrentes na bacia do rio Taquarembó, rs. *RS. Congrega Urcamp*. 579-591.
- MORISIGUE, D. E., D. MATA, G. FACCIUTO & L. BULLRICH. 2012. *Floricultura. Pasado y presente de la Floricultura Argentina*. INTA, Buenos Aires.
- NOGUERA SERRANO, S. P., J. D. ZARAGOZA & G. E. FERESIN. 2017. Estudio para la propagación (agámica y sexual) de *Rhodophiala mendocina* (Phil.) Ravenna. *Rev. Horticultura Argentina* 36: 6-18.
- OUYANG, X., T. VAN VOORTHUYSEN, P. E. TOOROP & H. W. M. HILHORST. 2002. Seed vigor, aging, and osmopriming affect anion and sugar leakage during imbibition of maize (*Zea mays* L.) caryopses. *Int. J. Plant Sci.* 163: 107-112.
<http://dx.doi.org/10.1086/324550>
- PANDEY, D. K. 1988. A rapid method for the prediction of germinability of French beans. *Ann. Appl. Biol.* 113: 443-446.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.1988.tb03321.x>
- PARCIAK, W. 2002. Environmental variation in seed number, size, and dispersal of a fleshy-fruited plant. *Ecology* 83: 780-93. [http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083%5B0780:EVISNS%5D2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083%5B0780:EVISNS%5D2.0.CO;2)
- PERETTI, A. 1994. *Manual para análisis de semillas*. Hemisferio Sur, INTA, Buenos Aires.
- ROITMAN, G. & J. A. HURRELL. 2009. *Habranthus*. En: HURRELL, J. A. (ed.), *Flora rioplatense: sistemática, ecología y etnobotánica de las plantas vasculares rioplatenses*, pp.115-127. Lola, Buenos Aires.
- ROSSELLÓ, F., P. MARINANGELI, J. RODRIGO & N. CURVETTO. 2006. Propagación vegetativa de *Habranthus tubispathus* Herb. (Amarilidaceae). En: *Actas resúmenes 3º Congreso Argentino de Floricultura*, pp. 424-427. INTA.
- SABATINO, M., J. FARINA & N. MACEIRA. 2017. *Flores de las Sierras de Tandilia. Guía para el reconocimiento de las plantas y sus visitantes florales*. Ediciones INTA, Balcarce.
- SANHUEZA, C. D. C., P. GERMAIN, G. M. ZAPPERI, Y. A. CUEVAS, ... & A. LOYDI. 2014. *Plantas nativas de Bahía Blanca y sus alrededores. Descubriendo su historia, belleza y magia*. Los autores, Bahía Blanca.
- SCHNEIDER, C. A., W. S. RASBAND & K. W. ELICEIRI. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*. 9: 671-675.
<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- SIMPSON, M. G. 2006. *Plant Systematics*. Academic press, Cambridge.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374380-0.50001-4>
- SOKAL, R. R. & F. J. ROHLF. 1986. *Introducción a la Bioestadística*. Reverté, Barcelona.
- SOLTANI, E., F. GHADERI-FAR, C. C. BASKIN & J. M. BASKIN. 2015. Problems with using mean germination time to calculate rate of seed germination. *Aus. J. Bot.* 63: 631-635.
<http://dx.doi.org/10.1071/BT15133>
- STEINBRECHER, T. & G. LEUBNER-METZGER. 2018. Tissue and cellular mechanics of seeds. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 51: 1-10.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2018.03.001>
- STREHER, N. S. 2016. *Fenologia da floração e biologia reprodutiva em geófitas subtropicais: estudos de caso com espécies simpátricas de amaryllidaceae*. Tesis Doctoral. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, Brasil.
- TILLICH, H. J. 2007. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). *Ann. Bot.* 100: 1413-1429.
<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm238>
- VERCELLI, N. 2018. *Heterogeneidad del paisaje en la cuenca inferior del arroyo del Azul, provincia de Buenos Aires*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Argentina.
- VERGARA ZURITA, E. M. 2020. *Determinación de la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de Hymenocallis sp. sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa*. Trabajo de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- YOONG, F. Y., L. K. O'BRIEN, M. J. TRUCO, H. HUO, ... & K. J. BRADFORD. 2016. Genetic variation for thermotolerance in lettuce seed germination is associated with temperature-sensitive regulation of ethylene response factor1 (ERF1). *Plant Physiol.* 170: 472-488.
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.15.01251>

