

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Tesis para optar al grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Botánica

Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de

***Myroxylon balsamum* (Fabaceae, Papilionoideae)**

Especie considerada en peligro de extinción en Costa Rica

Diego Aguilar Sandí

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Montes de Oca, San José, Costa Rica

2021



Esta obra está bajo una [licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Hoja de aprobación

Miembros del tribunal

Elmer G. García Díaz
M. Sc.
Director

Daniel Briceño Lobo
M. Sc.
Presidente del tribunal

Carlos O. Morales Sánchez
Dr. rer. nat.
Lector

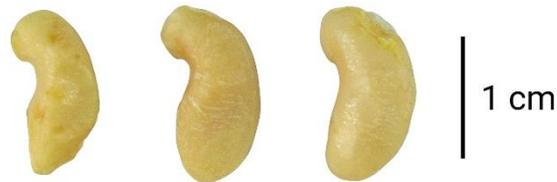
Mario A. Blanco Coto
Ph. D.
Miembro del tribunal

Luis O. Barboza Barquero
Dr. rer. nat.
Lector

Diego D. Aguilar Sandí
B. Sc.
Sustentante

*In many ways, the seed is a microcosm of life itself.
The seed is a neatly wrapped package containing a
living organism capable of exhibiting almost all
of the processes found in the mature plant.*

COPELAND & McDONALD (2001, p. XIII)



Semillas del árbol de bálsamo (*Myroxylon balsamum*, Fabaceae)

Agradecimientos

Agradezco profundamente a Elmer G. García, Carlos O. Morales y Luis O. Barboza por haber aceptado ser parte de este proyecto desde el primer momento y por haberme ayudado a superar todas las dificultades que aparecieron en el camino. De ellos recibí estímulo constante y asesoramiento. Además, sus observaciones y correcciones permitieron mejorar sustancialmente mi trabajo. También les agradezco por haber potenciado en mí la *libertad de ingenio* que todo investigador en formación necesita.

Aunque la emergencia sanitaria generada por la COVID-19 imposibilitó llevar a cabo todas las pruebas de germinación en el *Centro para Investigaciones en Granos y Semillas*, como se tenía previsto, no por ello dejé de recibir apoyo logístico de su personal. Estoy especialmente agradecido con Ester Vargas, Guillermo Solano y Andrés Monge; sin su ayuda no habría podido terminar el experimento sobre el efecto de la temperatura en la germinación. A Guillermo Solano también le debo, entre otras muchas buenas ideas, sus valiosas sugerencias y colaboración en la prueba de germinación de semillas dentro de los frutos.

Mi vida académica ha estado vinculada por entero a la *Universidad de Costa Rica*, cuna intelectual y Alma Máter de decenas de generaciones. Es imposible expresar en breves palabras lo agradecido que estoy con esta casa de estudios que me becó y me dio una educación excelente; agradecido estoy también con el personal docente y administrativo de la Escuela de Biología, quienes contribuyeron con mi formación científica y profesional.

Agradezco enormemente a mi familia, quienes nunca han puesto cotas a mis aspiraciones intelectuales y siempre me han dado las condiciones para desarrollarlas. En especial a mi madre, Ernestina Sandí, quien me ha brindado apoyo durante toda mi vida.

Índice general

Hoja de aprobación	ii
Agradecimientos	iv
Índice de figuras.....	vii
Índice de cuadros	viii
Resumen.....	ix
Introducción	10
Antecedentes	12
Justificación	15
Marco teórico.....	16
A) Distribución natural de <i>Myroxylon balsamum</i> en Costa Rica.....	16
B) Descripción morfológica de <i>Myroxylon balsamum</i>	17
C) Etnobotánica de <i>Myroxylon balsamum</i>	18
D) Conceptos básicos sobre germinación de semillas y crecimiento de plantas	19
Objetivos generales.....	22
Objetivos específicos	22
Hipótesis y predicciones	22
Materiales y métodos	23
A) Efecto de la temperatura en la germinación de semillas extraídas de los frutos	23
A.1) Efecto de la temperatura en la germinación de semillas dentro de los frutos ..	25
B) Efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación (en condiciones de oscuridad).....	25

C) Efecto de la luz en la germinación.....	26
D) Efecto del sombreado en el crecimiento de las plántulas	27
E) Análisis de datos	28
F) Fórmulas utilizadas en los análisis.....	28
Resultados.....	30
A) Efecto de la temperatura en la germinación de semillas extraídas de los frutos	30
A.1) Efecto de la temperatura en la germinación de semillas dentro de los frutos ..	32
B) Efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación (en condiciones de oscuridad).....	34
C) Efecto de la luz en la germinación.....	36
D) Observaciones sobre el proceso de germinación y crecimiento de la plántula.....	37
E) Efecto del sombreado en el crecimiento de las plántulas	39
Discusión	41
Conclusiones y recomendaciones	45
Referencias.....	46
Apéndices.....	53
A) Búsqueda de árboles de <i>Myroxylon balsamum</i>	53
B) Variación en el contenido de la cámara seminífera	56
C) Grosor de la cámara seminífera como predictor de la presencia de semillas	57

Índice de figuras

Figura 1. Distribución natural de las especies del género <i>Myroxylon</i> en Costa Rica	16
Figura 2. Detalle del fruto, la semilla y una hoja de <i>M. balsamum</i>	17
Figura 3. Semillas de <i>M. balsamum</i> afectadas por patógenos.	30
Figura 4. Germinación de semillas de <i>M. balsamum</i> según la temperatura	31
Figura 5. Tasa de germinación promedio (\pm desviación estándar) de semillas de <i>M. balsamum</i> según la temperatura	32
Figura 6. Porcentaje de germinación de semillas de <i>M. balsamum</i> dentro de los frutos	33
Figura 7. Germinación de semillas de <i>M. balsamum</i> dentro de los frutos.....	33
Figura 8. Germinación de semillas de <i>M. balsamum</i> en condiciones de oscuridad según el tiempo de almacenamiento a aprox. 24 °C.....	35
Figura 9. Tasa de germinación promedio (\pm desviación estándar) de semillas de <i>M. balsamum</i> en condiciones de oscuridad según tiempo de almacenamiento a aprox. 24 °C	36
Figura 10. Germinación de semillas de <i>M. balsamum</i> y apariencia de las plántulas según las condiciones lumínicas.....	37
Figura 11. Germinación y crecimiento de una plántula de <i>M. balsamum</i>	38
Figura 12. Plántula de <i>M. balsamum</i> de dos meses de edad.....	39
Figura 13. Longitud promedio (\pm desviación estándar) del tallo de plántulas de <i>M. balsamum</i> según las condiciones lumínicas en las que crecieron	40
Figura A1. <i>Myroxylon balsamum</i> . Árbol ubicado en el parqueo de la plaza Koros, Santa Ana (Aguilar-Sandí 13, USJ)	54
Figura A2. <i>Myroxylon balsamum</i> . Árbol ubicado en el Jardín Botánico José María Orozco, Montes de Oca (Morales 2345, USJ).....	55

Figura A3. Porcentaje de frutos de <i>M. balsamum</i> según la presencia de semillas y el estado de la semilla	56
Figura A4. Semillas de <i>M. balsamum</i> dañadas naturalmente	57
Figura A5. Porcentaje acumulado final de germinación en frutos de <i>M. balsamum</i> con material germinable y sin material germinable.....	58

Índice de cuadros

Cuadro 1. Especies de árboles vedadas en Costa Rica	11
Cuadro 2. Nombres comunes de los árboles de <i>M. balsamum</i> en América.....	19
Cuadro 3. Germinación de semillas de <i>M. balsamum</i> según la temperatura	32
Cuadro 4. Geminación de las semillas de <i>M. balsamum</i> en condiciones de oscuridad según el tiempo de almacenamiento a aprox. 24 °C.....	35
Cuadro 5. Parámetros de crecimiento de plántulas de <i>M. balsamum</i> según la condición lumínica	40
Cuadro A1. Sitios visitados en busca de árboles de <i>M. balsamum</i> en Costa Rica	53

Resumen

Introducción: *Myroxylon balsamum* (Fabaceae) es una especie de árbol considerada en peligro de extinción en Costa Rica y está incluida en alguna categoría de amenaza en otros países de América. Los estudios sobre germinación de semillas y crecimiento de plántulas de esta especie son escasos.

Objetivos: Evaluar la germinación de semillas en diferentes condiciones de temperatura, tiempo de almacenamiento e iluminación; evaluar el crecimiento de plántulas en condiciones de iluminación y de sombra.

Métodos: De noviembre de 2019 a junio de 2020 se recolectaron frutos maduros de dos árboles ubicados en la provincia de San José, Costa Rica. Se extrajeron las semillas, se desinfectaron e incubaron a 20 °C, 20/30 °C y 30 °C, con fotoperiodo de 12 h. Asimismo, se hizo una prueba de germinación con semillas dentro de los frutos. Se evaluaron frutos que estuvieron almacenados a temperatura ambiente (aprox. 24 °C) durante ocho, seis y dos meses, todos se incubaron a 30 °C. Se evaluaron frutos en condiciones de luz, luz reducida y oscuridad, todos a 30 °C. Se sembraron plántulas en bolsas de almácigo con turba de germinación; 24 se expusieron a la luz solar y 24 se cubrieron con tela de sarán.

Resultados: Las semillas extraídas de los frutos sufrieron mortalidad debida a patógenos, no así las que se mantuvieron dentro de los frutos. La germinación inició al décimo día a 20/30 °C y 30 °C. La tasa de germinación (TG) fue mayor a 30 °C que a 20 °C. El tiempo de almacenamiento tuvo un efecto en el porcentaje de germinación (PG), que fue menor en frutos con ocho meses (aprox. 23 %) que en frutos con dos y con seis meses (aprox. 55 %). La presencia de luz influyó en el PG, que fue menor en frutos que estuvieron en oscuridad (26 %) que en frutos expuestos a luz (52 %) y a luz reducida (54 %). Las plántulas que crecieron en sombra no desarrollaron tallo ni hojas alternas (solo el primer par de hojas opuestas), pero presentaron folíolos más delgados y con mayor superficie que las plántulas que crecieron en condiciones de iluminación.

Conclusión: Las semillas son quiescentes, su germinación se favorece a 30 °C, son ortodoxas y fotoblásticas indiferentes. Las plántulas son tolerantes a la sombra. Adicionalmente, se determinó que el pericarpo no ejerce latencia física, de manera que no es necesario extraer las semillas para que germinen. La realización de esta tesis permitió actualizar y aumentar el conocimiento sobre el proceso de germinación y el crecimiento de las plántulas de esta especie.

Palabras clave: almacenamiento, iluminación, quiescencia, temperatura, tolerancia a la sombra.

Introducción

Los primeros esfuerzos científicos por conocer la diversidad vegetal de Costa Rica datan de finales del siglo XIX, época en la que se funda el Museo Nacional de Costa Rica (1887) y se publica la obra *Primitiae florae costaricensis* (1891) de T. A. Durand y H. F. Pittier (Gómez & Savage, 1991; Grayum, Hammel, Troyo & Zamora, 2004). Con el transcurso de los años el conocimiento botánico del país ha aumentado, al punto de que en la actualidad se conocen aproximadamente 11 535 especies de plantas vasculares, estimándose que la cifra puede alcanzar las 12 000 (Obando, 2013; Ávalos, 2019a).

Un componente importante de esa biodiversidad son los árboles, organismos que brindan múltiples servicios ambientales, entre ellos, fijación de carbono, generación de oxígeno y protección del suelo (Reyes Avilés & Gutiérrez Chaparro, 2010). En el Inventario Nacional Forestal de Costa Rica 2014-2015 se registraron 1 338 especies de árboles en el país (Programa REDD/CCAD-GIZ-SINAC, 2015), aunque se estima la existencia de 2 300 especies clasificadas en 130 familias (Fournier, 2004).

En Costa Rica, el 3.8 % de las especies de árboles se consideran amenazadas¹, debido a que presentan poblaciones naturales reducidas, distribución geográfica restringida, hábitats fragmentados y sobreexplotación comercial, ya que producen maderas finas o poseen algún componente no maderable de importancia económica (Jiménez, 1998; Estrada, Rodríguez & Sánchez, 2005). Sin embargo, solo 17 especies tienen prohibición de aprovechamiento

¹ Para este cálculo se tomó en cuenta las 2 300 especies de árboles estimadas para Costa Rica según Fournier (2004) y las 88 especies consideradas amenazadas por Estrada, Rodríguez & Sánchez (2005). Estos autores consideraron 91 especies en total, pero 3 de ellas no son árboles.

(Cuadro 1); esta veda se estableció en el Decreto Ejecutivo N° 25700-MINAE (1997). Aunque la lista original incluía 18 especies, el Decreto Ejecutivo N° 40477-MINAE (2017) excluyó *Platymiscium parviflorum* Benth. (Fabaceae), especie que fue declarada en peligro crítico de extinción en 2018 (Barstow, Jiménez & Klitgård, 2018). Dicho decreto también restringió la veda a “árboles en pie”.

CUADRO 1
Especies de árboles vedadas en Costa Rica *

Familia	Especie	Nombre común
Boraginaceae	<i>Cordia gerascanthus</i> L.	Laurel negro
Caryocaraceae	<i>Anthodiscus chocoensis</i> Prance	Ajo negro
Fabaceae	<i>Copaifera camibar</i> Poveda, N. Zamora & P.E. Sánchez	Camíbar
	<i>Hymenolobium mesoamericanum</i> H.C. Lima	Cola de pavo
	<i>Myroxylon balsamum</i> (L.) Harms	Bálsamo
	<i>Parkia pendula</i> (Willd.) Benth. ex Walp.	Tamarindón
	<i>Paramachaerium gruberi</i> Brizicky	Sangrillo
	<i>Platymiscium pinnatum</i> (Jacq.) Dugand	Cristóbal
	<i>Tachigali costaricensis</i> (N. Zamora & Poveda) N. Zamora & van der Werff **	Tostado
Lauraceae	<i>Caryodaphnopsis burgeri</i> N. Zamora & Poveda **	Quira
Lecythidaceae	<i>Couratari scottmorii</i> Prance **	Copo
Meliaceae	<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	Cedro real
	<i>Cedrela salvadorensis</i> Standl.	Cedro bateo
	<i>Swietenia macrophylla</i> King	Caoba
Podocarpaceae	<i>Podocarpus costaricensis</i> de Laub.	Cipresillo
	<i>Podocarpus guatemalensis</i> Standl.	Cipresillo
Zygophyllaceae	<i>Guaiacum sanctum</i> L.	Guayacán real

* Según el Decreto Ejecutivo N° 25700-MINAE (1997) reformado por el Decreto Ejecutivo N° 40477-MINAE (2017). ** Nombres científicos mal escritos en el decreto, se corrigen aquí.

Myroxylon L. f. (Fabaceae, Papilionoideae) es un género que incluye dos especies de árboles nativas del neotrópico, *M. balsamum* (L.) Harms y *M. peruiferum* L. f. (Sartori, Lewis, Mansano & Tozzi, 2015; Aguilar-Sandí, 2019). Pese a que existen argumentos para

considerarlas amenazadas en Argentina, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala y México (Fuentes, 1993; Jiménez, 1998; Payares-Díaz, Mario-Contreras, Medrano-Vélez & Millán-Romero, 2014; Galíndez et al., 2015; Sartori et al., 2015, Loayza-Cabezas, Rodríguez-Trejo, Hernández-Acosta & Almaráz Suárez, 2018), la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) aún no ha incluido *M. balsamum* en la Lista Roja (Aguilar-Sandí, 2020a) y considera el estado de conservación de *M. peruiiferum* como de Preocupación Menor (Botanic Gardens Conservation International & IUCN SSC Global Tree Specialist Group, 2019).

Aquí se sigue el criterio de Jiménez (1998), quien consideró que *M. balsamum* se encuentra en peligro de extinción en Costa Rica. Una forma de contribuir con la conservación de los árboles de esta especie es mediante el estudio de los factores que afectan la germinación de semillas y el crecimiento de las plántulas, ya que son etapas críticas en el ciclo de vida de las plantas (Rajjou et al., 2012).

Antecedentes

Salazar (2000) señala que las semillas deben extraerse de los frutos, que tienen un contenido de humedad entre 11 y 12 % y alcanzan porcentajes de germinación de 60 a 75 %. Además, el autor menciona que al escarificar los frutos y sumergirlos en agua por 24 h se observa germinación a los 22 días, alcanzando el 59 % de germinación a los 41 días. También indica que las semillas se mantienen viables de 6 a 12 meses si se almacenan en condiciones ambientales (sic), mientras que la viabilidad se prolonga hasta por tres años si son almacenadas a 5 °C con 6 o 8 % de humedad. Este autor señala que la germinación es epígea

y fanerocotilar, lo cual es incorrecto². La ilustración que se incluye en el texto corresponde a *M. peruiferum*, no a *M. balsamum*³.

Cordero & Boshier (2003) indican que se ha registrado hasta un 80 % de germinación bajo los árboles y que la germinación se favorece a temperaturas entre 25 y 35 °C. Además, informan de dos tratamientos pregerminativos, el mismo que señala Salazar (2000) y la inmersión en agua a 50 °C durante 5 min. Los datos sobre porcentajes de germinación en vivero, condiciones de almacenamiento y viabilidad son los mismos que reporta Salazar (2000). Sin embargo, estos autores no recomiendan la extracción de las semillas. Por último, mencionan que las plántulas tardan en emerger entre 15 y 30 días, y que necesitan luz para crecer en el campo. A pesar de la utilidad de esta información, los autores no dan cuenta de la metodología a seguir para replicarla. Su trabajo es recopilatorio, no experimental.

Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba (2014) informan que los frutos maduros se pueden recolectar entre junio y julio en el Valle Central de Costa Rica, que las semillas pueden sembrarse en un sustrato de tierra y arena, que la germinación tarda de 21 a 41 días y que el porcentaje de germinación varía entre 85 y 100 %. No aportan información sobre el efecto de la temperatura ni del tiempo de almacenamiento en la germinación. Las fotografías presentadas en esta publicación corresponden a *M. peruiferum*, no a *M. balsamum*.

Payares-Díaz et al. (2014) recolectaron muestras en Sincelejo (Sucre, Colombia) y las almacenaron a 5 °C durante dos días. No queda claro si ellos extrajeron las semillas o las evaluaron dentro de los frutos, pues llaman “semilla” al fruto completo. Además, confunden

² Ver infra, pp. 37-38.

³ Para conocer las diferencias entre ambas especies ver Aguilar-Sandí (2019).

la tasa de germinación con el tiempo medio de germinación. Los autores pusieron las muestras a imbibir por 24 h y las sembraron (N= 250) en bolsas de 1.0 kg con sustrato de tierra-arena-estiércol, desinfectado. Seguidamente, las colocaron en un invernadero (80 % de sombra, temperatura de 29 a 34 °C y 82 % de humedad relativa). La germinación inició a los 15 días (8.14 %), fue hipogea y criptocotilar, aunque los autores llaman “criptocotilar” a las plántulas. Transcurridos 36 días se registró un 77.2 % de germinación acumulada. La evaluación del crecimiento de las plántulas se realizó a los 36 días. Hubo correlaciones entre la altura, el número de hojas y el número de nudos. Este artículo es de carácter descriptivo.

Loayza-Cabezas et al. (2018) recolectaron frutos de tres árboles en el sur de México, desinfectaron las muestras con hipoclorito de sodio al 10 %, las sometieron a tratamientos combinados de intensidad lumínica ($32 \mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $124 \mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$) y escarificación (corte longitudinal del pericarpo, extracción de la semilla y frutos sin escarificar), y las incubaron a 27/23 °C con fotoperiodo de 12 h, con sustrato de perlita. Los autores consideraron que el endocarpo correspondía a la cubierta seminal, pero esto es incorrecto⁴. Adicionalmente, evaluaron la germinación a 23/19 °C y 27/23 °C en las condiciones lumínicas anteriores y colocaron plántulas en dos condiciones lumínicas ($587 \mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $231 \mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$) durante 5 meses. En este trabajo no se encontró un efecto de la iluminación ni de la temperatura en la germinación, pero sí de la escarificación, ya que las semillas extraídas de los frutos presentaron mayor capacidad germinativa (87 %) que aquellas dentro de frutos sin escarificar (13 %). Por último, se encontró que la exposición a intensidad lumínica alta

⁴ Para conocer la estructura de los frutos de *M. balsamum* ver Aguilar-Sandí (2020b).

combinada con tratamientos de escarificación favorece el desarrollo inicial de las plántulas, las cuales, sin embargo, pueden tolerar condiciones de baja iluminación.

Justificación

La diversidad de árboles en Costa Rica es alta. Sin embargo, el conocimiento sobre la ecofisiología de la mayoría de las especies es escaso o inexistente. La importancia de realizar investigaciones en este campo es mayor si se considera el deterioro que sufren los bosques tropicales. Aunque existen manuales técnicos que reúnen información silvicultural sobre un gran número de especies forestales de Latinoamérica, se hace necesario revisar, comprobar, actualizar y hacer reproducible ese conocimiento, que en la mayoría de los casos tiene veinte o más años de haberse generado.

Como se desprende de la revisión bibliográfica realizada, la información disponible sobre los factores que influyen en la germinación de semillas y en el crecimiento de las plántulas de *M. balsamum* es exigua. Si bien se han publicado notas técnicas al respecto, la información que incluyen es irreproducible y dudosa, pues no se hace constar la metodología con la que se obtuvieron los datos y en algunos casos no hay seguridad de que la especie evaluada haya sido *M. balsamum*. Además, los dos artículos publicados sobre este tema tienen un abordaje experimental distinto al desarrollado en la presente tesis.

Nuevos aportes en esta línea de investigación vienen a llenar un vacío de información y a generar opciones de conservación para los árboles de esta especie, cuya madera y resina tienen importancia económica y cultural (ver p. 18).

Marco teórico

A) Distribución natural de *Myroxylon balsamum* en Costa Rica

Vertiente pacífica, 0–850 m, en sitios comprendidos en las regiones climáticas Pacífico Central y Pacífico Sur, con estación lluviosa prolongada, precipitación anual de 2000 a 5000 mm y temperaturas de 21 a 32 °C [...]. Provincia de Puntarenas, cantones de Parrita, Golfito y Osa (Aguilar-Sandí, 2020a, p. 3) (Fig. 1).

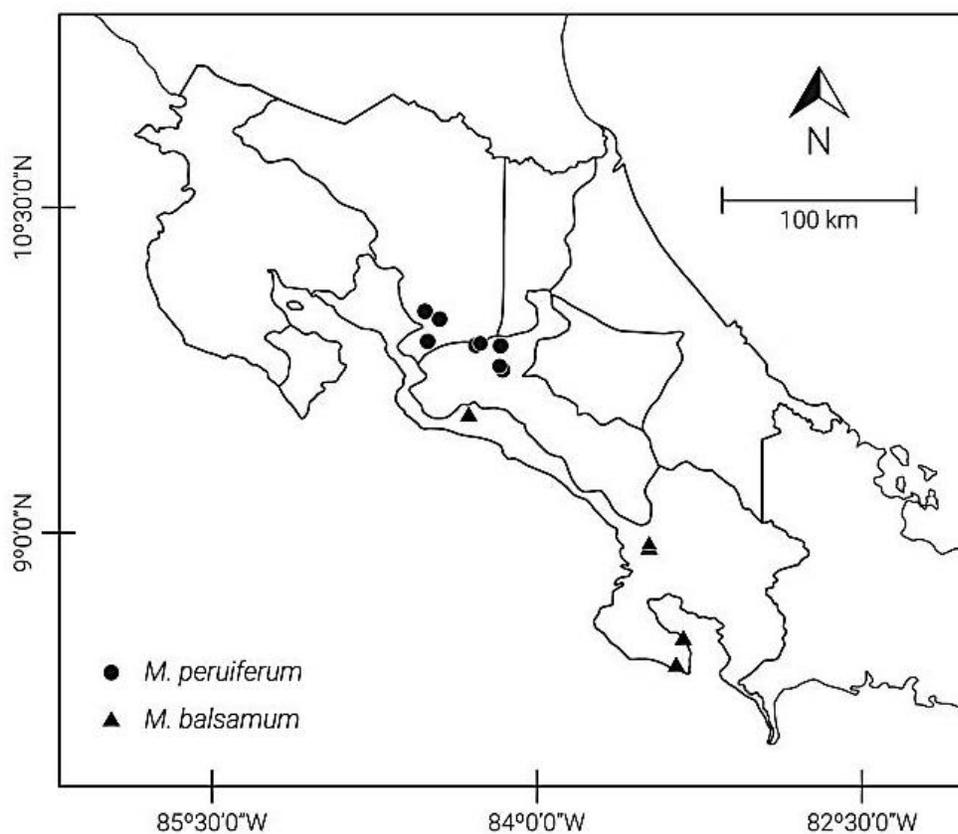


Figura 1. Distribución natural de las especies del género *Myroxylon* en Costa Rica [Tomado de Aguilar-Sandí (2020a)].

B) Descripción morfológica de *Myroxylon balsamum*

Árbol de 15–50 m de altura, con peridermis lenticelada, hojas imparipinnadas, alternas, folíolos alternos (raro subopuestos), lámina de los folíolos 4.5–8.5(–12.5) × 2–4.5 cm, con puntos y rayas translúcidos (poco evidentes en material fresco), ápices acuminados a largamente acuminados, inflorescencias racemosas, flores [zigomorfas], cáliz lobulado, estandarte estrechamente ovado, frutos [sámaras], cámara seminífera subglobosa (en frutos maduros), 1 o 2 semillas reniformes, testa lisa (Aguilar-Sandí, 2020a, p. 4) (Fig. 2).

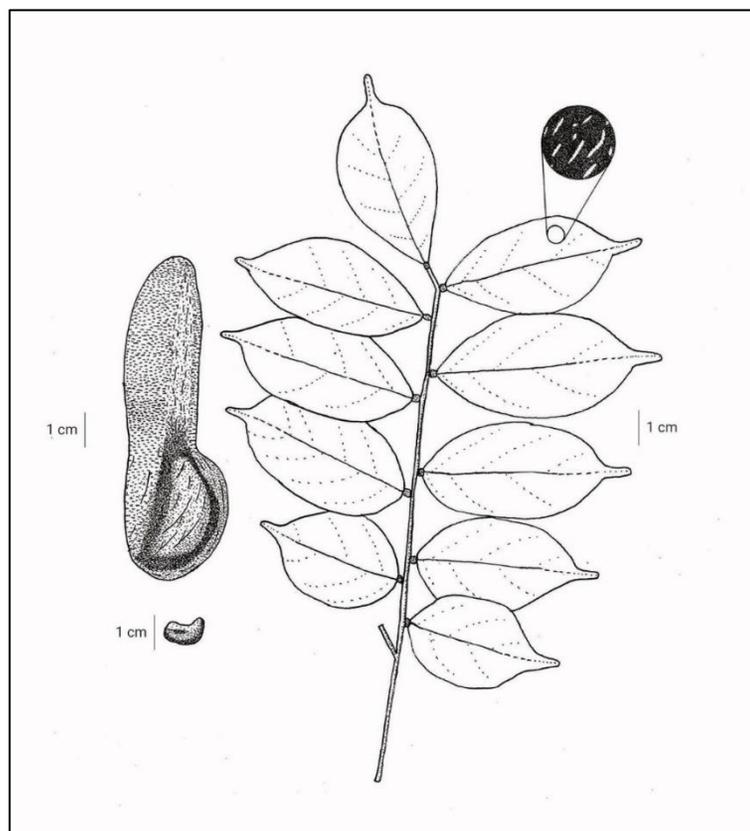


Figura 2. Detalle del fruto, la semilla y una hoja de *M. balsamum*. Se destacan los puntos y rayas translúcidos de un folíolo.

C) Etnobotánica de *Myroxylon balsamum*

Los árboles de esta especie reciben, al menos, 20 nombres comunes en América (Cuadro 2). Considerando que en sitios con alta biodiversidad no todas las plantas tienen nombre común (León & Poveda, 1999), cabe suponer que el elevado número de nombres con que se conocen está relacionado con el amplio uso que se les ha dado, ya que las plantas más utilizadas tienden a presentar más nombres vernáculos que aquellas poco usadas o del todo desconocidas (Luis J. Poveda, com. pers., 2018).

La madera de los árboles de bálsamo es aromática, resistente a la pudrición y muy pesada (0.72 g/cm^3); se utiliza en ebanistería, lutería y construcción de edificaciones. Del tronco se extrae una resina aromática, conocida como bálsamo del Perú, con la que se fabrican jabones, barnices, aromatizantes y cosméticos, entre otros productos. La resina también se ha utilizado con fines medicinales y en ritos religiosos (Aguilar-Sandí, 2020a).

La extracción de la resina es un proceso artesanal y se realiza principalmente en El Salvador (Fuentes, 1993). Grosso modo, los balsameros (i.e., las personas que benefician la resina del bálsamo) suben al árbol y hacen cortes rectangulares en la peridermis. A los cinco días calientan la zona del corte con leña encendida. Una semana después, colocan trapos en esas zonas. Al mes, retiran los trapos impregnados con resina y los sumergen en agua hirviendo, luego los exprimen con ayuda de una prensa, obteniendo una mezcla de agua y resina amarillenta. La purificación de la resina se logra al evaporar el agua de la mezcla. Al finalizar este procedimiento, la resina obtenida adquiere una tonalidad oscura (Fuentes, 1993; Revene, 2007; Martínez-Rivera, Blanco, Colorado, Guerra & Antonio, 2015).

CUADRO 2
Nombres comunes de los árboles de *M. balsamum* en América *

Nombre común	País	Referencia
Árbol del bálsamo	México	Salazar (2000)
Bálsamo	Brasil	Sartori et al. (2015)
	Colombia	Sartori et al. (2015)
	Costa Rica	León & Poveda (1999)
	Ecuador	Sartori et al. (2015)
	El Salvador	Sartori et al. (2015)
	Guatemala	Cordero & Boshier (2003)
	Honduras	Cordero & Boshier (2003)
	México	Sartori et al. (2015)
	Nicaragua	Cordero & Boshier (2003)
	Venezuela	Sartori et al. (2015)
Bálsamo del Perú	El Salvador	Sartori et al. (2015)
Bálsamo de Tolú	Colombia	Salazar (2000)
Barba	Panamá	Sartori et al. (2015)
Chichipale	México	Salazar (2000)
Chirraca	Costa Rica	León & Poveda (1999)
	Honduras	Cordero & Boshier (2003)
Chucté	México	Salazar (2000)
Crusnagua	El Salvador	Sartori et al. (2015)
Cumarú	Brasil	Sartori et al. (2015)
Estoraque	Perú	Sartori et al. (2015)
Maharasa	Honduras	Cordero & Boshier (2003)
Mattaluca	México	Sartori et al. (2015)
Nabá	Guatemala	Sartori et al. (2015)
	Honduras	Cordero & Boshier (2003)
	México	Sartori et al. (2015)
Palo de bálsamo	Honduras	Cordero & Boshier (2003)
	México	Sartori et al. (2015)
Palo de trapiche	México	Salazar (2000)
Pido-quera	Ecuador	Sartori et al. (2015)
Quino-quino	Perú	Salazar (2000)
Sándalo	Costa Rica	León & Poveda (1999)
Yarina-cocha	Perú	Sartori et al. (2015)

* Se destacan en negrita los utilizados en Costa Rica.

D) Conceptos básicos sobre germinación de semillas y crecimiento de plantas

La germinación inicia con la imbibición, proceso que activa vías metabólicas que promueven la división y diferenciación de las células del embrión, siendo clave para ello la

disminución de la concentración de ácido abscísico en los tejidos seminales y el aumento de giberelinas (Copeland & McDonald, 2001; Rajjou et al., 2012). La emergencia de la radícula, o de alguna otra parte del eje embrionario, es el punto culminante de la germinación, luego del cual inicia la etapa postgerminativa (Bewley, Bradford, Hilhorst & Nonogaki, 2013). Las plantas que se encuentran en este nuevo estado de desarrollo reciben el nombre de plántulas, aunque dicho término no tiene una definición precisa (De Vogel, 1980).

Las semillas ortodoxas mantienen la viabilidad luego de ser almacenadas con un contenido de humedad reducido y a bajas temperaturas, mientras que las recalcitrantes son sensibles a la deshidratación, razón por la cual no pueden almacenarse en iguales condiciones que las ortodoxas, pues pierden su viabilidad rápidamente. Las semillas intermedias presentan mayor tolerancia a la deshidratación que las recalcitrantes, pero menor tolerancia que las ortodoxas (Magnitskiy & Plaza, 2007). Las semillas ortodoxas pueden presentar latencia (Bewley et al., 2013), mientras que las recalcitrantes tienen una latencia corta o no la presentan del todo (Magnitskiy & Plaza, 2007).

La latencia, también llamada dormancia o letargo, se define como la incapacidad de completar el proceso de germinación en condiciones favorables de temperatura, hidratación y presencia de oxígeno; fenómeno que no debe confundirse con la quiescencia, que corresponde al estado de reposo de las semillas maduras cuya actividad metabólica está detenida y solo se reactiva cuando las semillas se exponen a condiciones favorables para la germinación (Bewley et al., 2013).

La temperatura contribuye a remover la dormancia primaria y a inducir la secundaria en semillas latentes, mientras que afecta la tasa de germinación y la capacidad germinativa

de las semillas quiescentes. La respuesta específica dependerá de cuáles sean las condiciones favorables de germinación de cada especie (Bewley et al., 2013). La respuesta a la luz está controlada a nivel molecular por los fitocromos, pigmentos proteicos presentes en los tejidos meristemáticos (Taiz & Zeiger, 1998), cuya forma activa, o forma absorbente luz roja-roja lejana (Pfr), es la responsable de regular las vías metabólicas que desencadenan la germinación (Tripathi, Hoang, Han & Kim, 2019), de acuerdo con la relación lumínica rojo/rojo lejano del entorno (Figueroa & Vázquez-Yanes, 2002). La exposición a la luz blanca estimula la germinación de las semillas fotoblásticas positivas y la inhibe en las fotoblásticas negativas (Botha & Small, 1988), mientras que no tiene un efecto estimulante ni inhibitorio de la germinación en las semillas indiferentes (Escobar & Cardoso, 2015).

La tolerancia a la sombra se define como la capacidad de sobrevivir, competir y crecer en ambientes con poca disponibilidad de luz durante periodos prolongados (Ávalos, 2019b). En general, las plantas tolerantes a la sombra presentan baja plasticidad fenotípica y responden a la escasa iluminación con modificaciones arquitectónicas, mientras que las intolerantes presentan alta plasticidad fenotípica y responden al sombreado con cambios morfológicos y fisiológicos (Guzmán & Cordero, 2013).

El grosor de las hojas se determina calculando la masa foliar por unidad de área (M_A), o su inverso, el área foliar específica (AFE), de manera que cuanto mayor sea el AFE, menor será el grosor de las láminas (Rodríguez & Leihner, 2006; Valladares & Niinemets, 2008). Por su parte, la razón biomasa seca raíz/biomasa seca de la parte aérea (R/S) y la razón de área foliar (RAF) son parámetros que miden el desempeño total de la planta en un ambiente determinado (Valladares & Niinemets, 2008).

Objetivos generales

- 1) Evaluar la germinación de semillas de *Myroxylon balsamum* en diferentes condiciones de temperatura, tiempo de almacenamiento e iluminación.
- 2) Evaluar el crecimiento de plántulas de *Myroxylon balsamum* en condiciones de iluminación y de sombra.

Objetivos específicos

- 1) Determinar la magnitud de la temperatura que favorece la germinación de semillas.
- 2) Determinar si el tiempo de almacenamiento influye en la germinación de semillas.
- 3) Determinar si las semillas son fotoblásticas positivas, negativas o indiferentes.
- 4) Determinar si las plántulas son tolerantes o intolerantes a la sombra.

Hipótesis y predicciones

- 1) Las semillas son sensibles a la temperatura. El porcentaje de germinación y la tasa de germinación aumentarán en la temperatura favorable.
- 2) Las semillas son recalcitrantes. El porcentaje de germinación y la tasa de germinación disminuirán conforme aumenta el tiempo de almacenamiento.
- 3) Las semillas son fotoblásticas indiferentes. El porcentaje de germinación será igual en condiciones de oscuridad y en condiciones de iluminación.
- 4) Las plántulas son tolerantes a la sombra. El área foliar específica, la razón de área foliar y la razón biomasa seca raíz/biomasa seca de la parte aérea, serán diferentes en condiciones de sombra y de iluminación.

Materiales y métodos

De noviembre de 2019 a junio de 2020 se recolectaron frutos maduros de dos árboles cultivados de *M. balsamum* en la Gran Área Metropolitana, provincia de San José⁵ (ver Apéndice A). Uno se ubica en el parqueo de un centro comercial en Santa Ana (SA) (09°55'58.6"N, 84°10'42.6"W) y el otro en el Jardín Botánico José María Orozco en Montes de Oca (JO) (09°56'07.3"N, 84°03'05.7"W). La región presenta estación seca de diciembre a abril y lluviosa de mayo a noviembre, temperatura promedio mensual entre 21 y 24 °C, y precipitación anual entre 1580 y 1750 mm (Fuente: Instituto Meteorológico Nacional)⁶.

A) Efecto de la temperatura en la germinación de semillas extraídas de los frutos

Se utilizaron frutos provenientes de SA que contaban con cinco meses de almacenamiento a temperatura ambiente (aprox. 24 °C). Se extrajeron las semillas de forma manual. Aleatoriamente se seleccionaron 525 en buen estado (ver Apéndice B), se desinfectaron (Protocolo A) y se distribuyeron en cajas de Petri (Protocolo B).

Se evaluaron 7 réplicas de 25 semillas cada una por tratamiento (20 °C, alternancia 20/30 °C y 30 °C). Se utilizaron cámaras de germinación con fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad programadas a las temperaturas respectivas. Además, se calculó el contenido de humedad (ver p. 28) de tres muestras de 16 semillas cada una, estas se maceraron y se

⁵ **Ejemplares testigo:** COSTA RICA: San José. Cantón Montes de Oca, Distrito San Pedro, Universidad de Costa Rica, Jardín Botánico J. M. Orozco, [09°56'07.3"N, 84°03'05.7"W], 1200 m, 26 setiembre 2012 (fr.), *Morales 2345* (USJ). Cantón Santa Ana, distrito Santa Ana, parqueo Plaza Koros, 09°55'58.6"N, 84°10'42.6"W, 900 m, 21 abril 2019 (fr.), *Aguilar-Sandí 13* (USJ).

⁶ Datos climáticos de las estaciones Aeropuerto Pavas Este (2009-2018), Aranjuez (1996-2018) y Belén (2010-2018); disponibles en <https://www.imn.ac.cr/mapa>

colocaron en una estufa a 105 °C durante 24 horas. La germinación se registró cada 2 o 3 días durante 24 días. Se consideró que una semilla había germinado cuando emergía la radícula. Este experimento se realizó del 5 al 29 de mayo de 2020 en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

Protocolo A. Desinfección de semillas (basado en 100 semillas)

- 1) Colocar las semillas en un colador; dejar pasar agua corriente por 1 min.
- 2) Colocar las semillas en un beaker; agregar 200 mL de agua destilada.
- 3) Agregar 4 gotas de Tween 20, para eliminar partículas de suciedad.
- 4) Agitar manualmente con un agitador de vidrio por 5 min.
- 5) Colocar las semillas en un colador; dejar pasar agua corriente por 1 min.
- 6) Colocar las semillas en el beaker; agregar 50 mL de H₂O₂ al 3 %.
- 7) Agitar manualmente con un agitador de vidrio por 1 min 30 s.
- 8) Colocar las semillas en un colador; dejar pasar agua corriente por 2 min.

Protocolo B. Preparación de las pruebas de germinación

- 1) Lavar y secar 21 cajas de Petri de 9.0 cm de diámetro; colocar una pieza de papel filtro (Q3 o Q5) en cada caja; agregar 10 mL de agua destilada; rotular las cajas.
- 2) Colocar 25 semillas previamente desinfectadas en cada caja de Petri.
- 3) Colocar papel toalla en el fondo de tres cajas plásticas de 30 × 21.5 × 6.5 cm con tapa; humedecer el papel toalla con agua destilada. Rotular.
- 4) Colocar 7 cajas de Petri en cada caja plástica y colocar estas dentro de una bolsa plástica (para mantener la humedad constante).
- 5) Colocar las cajas plásticas en las cámaras de germinación (según temperatura).
- 6) A los 8 días aplicar, mediante aspersion, Agri-mycin 16.5 WP (Estreptomycin y Oxitetraciclina) y Amistar (Azoxistrobina); ambas soluciones al 0.1 %

A.1) Efecto de la temperatura en la germinación de semillas dentro de los frutos

Se evaluaron frutos provenientes de SA con cinco meses de almacenamiento a temperatura ambiente (aprox. 24 °C) y que presentaban cámaras seminíferas con un grosor mínimo de 0.7 cm (ver Apéndice C). Se les removió el ala y se distribuyeron aleatoriamente en tres cajas plásticas con turba humedecida con agua destilada (N= 50 frutos/caja). Se aplicó una solución de Amistar al 0.2 %.

Las cajas se colocaron dentro de bolsas plásticas y se pusieron dentro de cámaras de germinación programadas a 20 °C, alternancia 20/30 °C y 30 °C, con fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad. Se evaluó el número de semillas germinadas cada 2 o 3 días durante 35 días. El criterio para determinar si una semilla había germinado fue la observación de la salida de la radícula a través del pericarpo. Esta prueba se realizó del 27 de mayo al 01 de julio de 2020 en las instalaciones del CIGRAS.

B) Efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación (en condiciones de oscuridad)

Se evaluaron frutos provenientes de JO que estuvieron almacenados en bolsas plásticas a temperatura ambiente (aprox. 24 °C) durante ocho, seis y dos meses. Las semillas no fueron extraídas. Se prepararon 8 réplicas de 25 frutos (cámara seminífera ≥ 0.7 cm) por periodo de almacenamiento (Protocolo C), que fueron colocadas en una cámara de germinación programada a 30 °C, que permaneció con las luces apagadas durante la prueba⁷.

⁷ En el diseño original de este experimento no se contemplaba evaluar la germinación en condiciones de oscuridad. Sin embargo, las luces de la cámara de germinación fallaron a los 5 días de iniciada la prueba, error técnico que no pudo resolverse a tiempo.

La germinación se registró cada 2 o 5 días durante 32 días. Se consideró que una semilla había germinado cuando la radícula emergía a través del pericarpo. Este experimento se realizó del 20 de agosto al 22 de setiembre de 2020 en los invernaderos de la Escuela de Biología (UCR).

Protocolo C. Preparación de la prueba de germinación con semillas dentro de los frutos

- 1) Lavar y secar 24 cajas plásticas de $30 \times 21.5 \times 6.5$ cm, con tapa. Rotular.
- 2) Mezclar turba limpia con agua destilada y distribuirla en las cajas en igual cantidad.
- 3) Lavar con agua corriente 200 frutos por tratamiento y removerles el ala.
- 4) Colocar 25 frutos desprovistos del ala en cada caja (8 cajas por tratamiento).
- 5) Colocar las cajas dentro de una bolsa plástica y en la cámara de germinación.
- 6) A los 8 días, aplicar Amistar al 0.2 % a todas las cajas por igual.

C) Efecto de la luz en la germinación

Se utilizaron frutos provenientes de JO que tenían siete meses de almacenamiento a temperatura ambiente (aprox. 24 °C). Se trabajó con una cámara de germinación programada a 30 °C. Se evaluaron 4 réplicas de 25 frutos cada una (cámara seminífera ≥ 0.7 cm) por tratamiento (Protocolo D). Estos consistieron en: *Luz* (cajas sin forrar/luces encendidas), *Luz reducida* (cajas forradas con papel periódico/luces encendidas), *Oscuridad* (cajas sin forrar/luces apagadas). Transcurridos 21 días se registró el porcentaje final de germinación, para lo cual se contabilizaron los frutos que tenían la radícula emergida. Se tomó nota del aspecto de las plántulas obtenidas. Esta prueba se realizó en los invernaderos de la Escuela de Biología (UCR) del 22 de setiembre al 13 de octubre (*Luz* y *Luz reducida*) y del 20 de octubre al 10 de noviembre (*Oscuridad*) de 2020.

Protocolo D. Preparación de la prueba de germinación para evaluar el efecto de la luz

- 1) Lavar y secar 12 cajas plásticas de $30 \times 21.5 \times 6.5$ cm, con tapa. Rotular.
- 2) Mezclar turba limpia con agua destilada y distribuirla en las cajas en igual cantidad.
- 3) Lavar con agua corriente 100 frutos por tratamiento y removerles el ala.
- 4) Colocar 25 frutos desprovistos del ala en cada caja.
- 5) Aplicar Amistar al 0.2 % a todas las cajas por igual (desde el primer día).
- 6) Colocar las cajas dentro de una bolsa plástica y en la cámara de germinación.

D) Efecto del sombreado en el crecimiento de las plántulas

Se sembraron 48 plántulas (con las hojas opuestas desarrolladas) en bolsas de almácigo de $20 \times 10 \times 6$ cm llenas con turba. Veinticuatro de ellas se colocaron sobre una mesa expuesta a las condiciones de iluminación del invernadero (tratamiento *Luz*: 1183.67 ± 232.58 lx); las otras se ubicaron en un área interna del invernadero y se cubrieron con una capa de sarán (tratamiento *Sombra*: 32.17 ± 2.72 lx). El nivel de iluminación se registró con un luxómetro MS6612-Mastech. La turba se mantuvo húmeda y a capacidad de campo. Semanalmente se midió la longitud del tallo (por arriba de las hojas opuestas y hasta la base de la yema apical) y se contabilizó el número de hojas alternas producidas.

Transcurridos 56 días las plántulas se diseccionaron. El área foliar se calculó a partir de fotografías de los folíolos tomadas sobre un fondo blanco acompañado de regla (cm). Las fotografías se procesaron con el programa ImageJ. Las muestras de raíces, tallos y folíolos (de cada plántula) fueron colocadas en una estufa a 65 °C durante 6 días. La biomasa seca se midió con una balanza SNOWREX EQ-1200. Este experimento se realizó del 15 de setiembre al 16 de noviembre de 2020 en los invernaderos de la Escuela de Biología (UCR).

E) Análisis de datos

La germinación se cuantificó considerando el número de semillas germinadas por día, el porcentaje de germinación (PG), el tiempo medio de germinación (T_{50}) y la tasa de germinación (TG). El crecimiento de las plántulas se analizó mediante la longitud del tallo, el número total de hojas alternas producidas, el área foliar específica (AFE), la razón de área foliar (RAF), y la razón biomasa seca raíz/biomasa seca de la parte aérea (R/S).

Los gráficos y las pruebas estadísticas (ANDEVA de una vía, Tukey, t de Student, Chi cuadrado, Kruskal-Wallis, Dunn), se realizaron en el programa RStudio (RStudio Team, 2020). Para confeccionar los gráficos se utilizó el paquete ggplot2 (Wickham, 2016).

F) Fórmulas utilizadas en los análisis

1) Contenido de humedad de las semillas

$$\% = \frac{\text{Masa fresca (g)} - \text{Masa seca (g)}}{\text{Masa fresca (g)}} \times 100$$

2) Tiempo medio de germinación

$$T_{50} = \frac{\sum(n_i \times t_i)}{\sum n_i}$$

n_i = número de semillas germinadas el día i

t_i = número de días i después de la siembra

3) Tasa de germinación

$$TG = \frac{1}{T_{50}}$$

T_{50} = *Tiempo medio de germinación (días)*

4) Área foliar específica

$$AFE = \frac{A_f}{B_f}$$

A_f = *Área foliar (cm²)*

B_f = *Biomasa seca foliar (g)*

5) Razón de área foliar

$$RAF = \frac{A_f}{B_t}$$

A_f = *Área foliar (cm²)*

B_t = *Biomasa seca total (g)*

Resultados

A) Efecto de la temperatura en la germinación de semillas extraídas de los frutos

Las semillas presentaron un contenido de humedad promedio (\pm desviación estándar) de 9.06 ± 0.01 %. A pesar de las precauciones que se tomaron, no pudo evitarse la proliferación de patógenos, lo que condujo a la muerte de semillas (Fig. 3). Esto obligó a reducir a seis el número de réplicas.

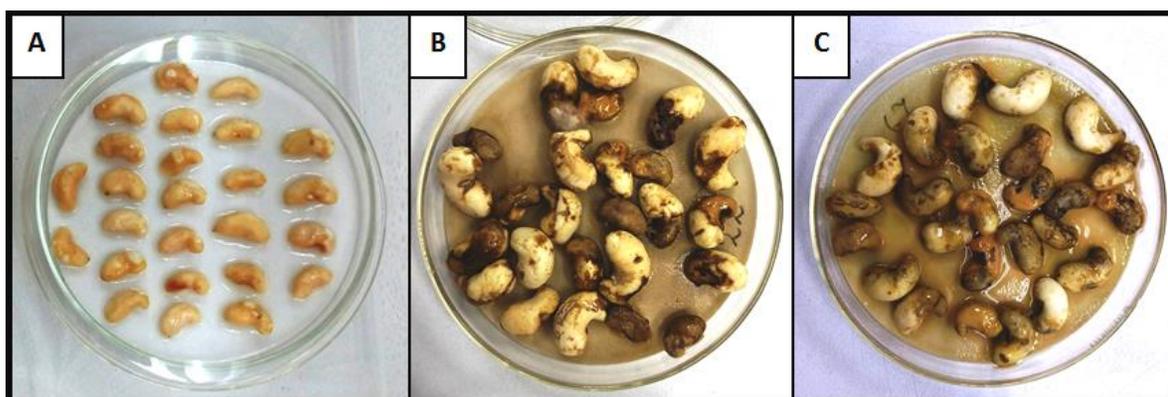


Figura 3. Semillas de *M. balsamum* afectadas por patógenos. **A.** Aspecto al inicio de la prueba. **B.** Trece días de iniciada la prueba a 20/30 °C. **C.** Trece días de iniciada la prueba a 30 °C. Las cajas de Petri tienen un diámetro de 9.0 cm.

La germinación inició al décimo día a 20/30 °C y a 30 °C, cinco días antes que a 20 °C (Fig. 4). Al decimotercer día se presentó el mayor número de semillas germinadas, valor que fue similar a 20/30 °C y a 30 °C ($t= 1.74$, g.l.= 10, $P= 0.11$, Fig. 4A), mientras que el máximo a 20 °C se alcanzó cuatro días después y no difirió del valor anterior ($t= 0.79$, g.l.= 10, $P= 0.44$, Fig. 4A). Al decimoquinto día hubo un efecto de la temperatura en el porcentaje acumulado de germinación ($KW= 8.33$, g.l.= 2, $P= 0.02$, Fig. 4B), siendo similar a 20 °C y a 30 °C, pero diferente a 20/30 °C (Cuadro 3). Sin embargo, los porcentajes finales de

germinación fueron similares en los tres tratamientos ($F= 2.43$, g.l.= 2, $P= 0.12$, Cuadro 3). Se detectó un efecto de la temperatura en el T_{50} ($F= 68.26$, g.l.= 2, $P< 0.001$, Cuadro 3) y en la TG ($F= 56.43$, g.l.= 2, $P< 0.001$, Fig. 5). En ambos casos, 20/30 °C y 30 °C fueron las temperaturas que más favorecieron el proceso de germinación.

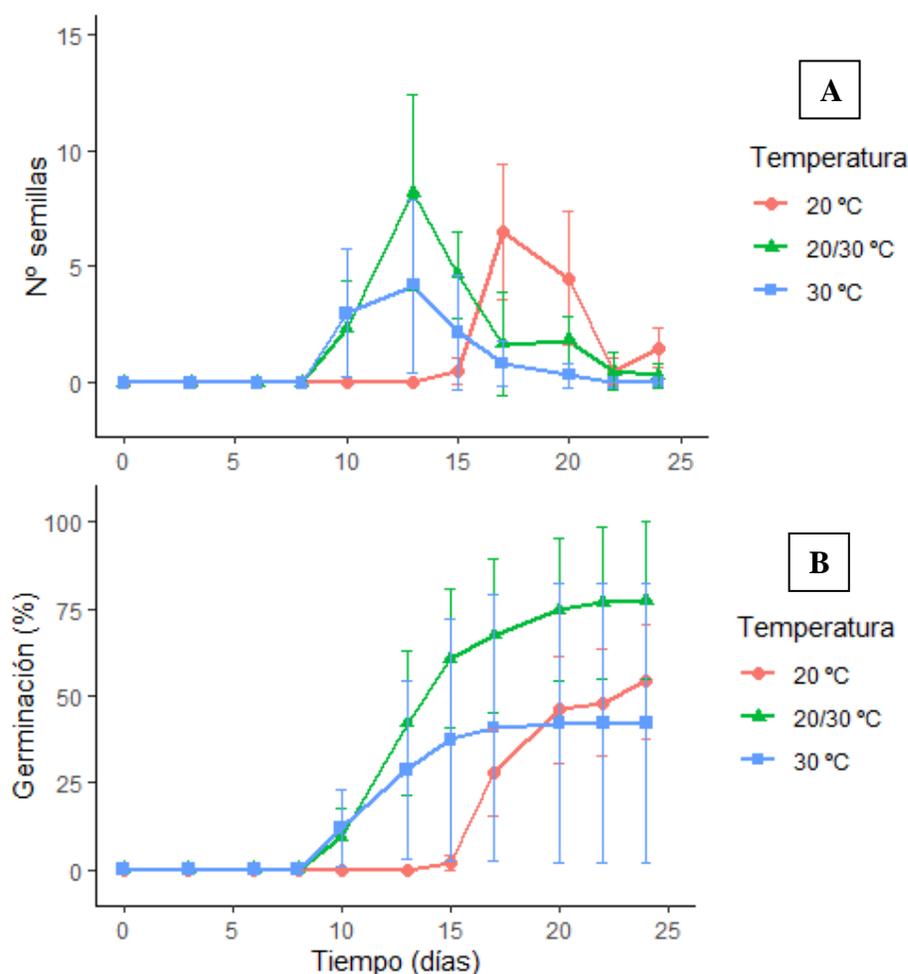


Figura 4. Germinación de semillas de *M. balsamum* según la temperatura. **A.** Promedio de semillas germinadas por día (\pm desviación estándar). **B.** Porcentaje acumulado de germinación promedio (\pm desviación estándar).

CUADRO 3
Germinación de semillas de *M. balsamum* según la temperatura *

Temperatura (°C)	Germinación Día 15 (%)	Germinación Final (%)	Tiempo medio (T ₅₀) (días)
20	2.00 ± 2.19 ^a	54.00 ± 16.35 ^A	18.89 ± 0.75 ^A
20/30	60.67 ± 19.83 ^b	77.33 ± 22.72 ^A	14.69 ± 1.02 ^B
30	37.33 ± 34.74 ^a	42.00 ± 40.14 ^A	12.85 ± 0.70 ^C

* Promedio ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas: minúsculas según la prueba de Dunn (P < 0.05); mayúsculas según la prueba de Tukey (P < 0.05).

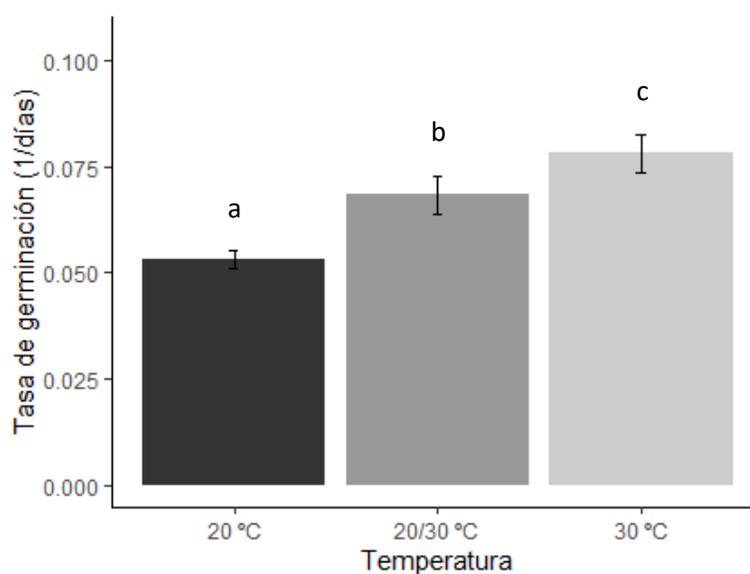


Figura 5. Tasa de germinación promedio (± desviación estándar) de semillas de *M. balsamum* según temperatura. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0.05).

A.1) Efecto de la temperatura en la germinación de semillas dentro de los frutos

La contaminación por patógenos pudo controlarse desde el inicio del experimento. La germinación se detectó por primera vez al decimocuarto día a 20/30 °C y a 30 °C (Fig. 6). Hubo un efecto de la temperatura en el porcentaje acumulado final de germinación, siendo diferente a 20 °C ($\chi^2 = 51.71$, g.l. = 2, P < 0.001), pero llegando a igualarse a 20/30 °C y 30 °C

($\chi^2 = 0.20$, g.l. = 1, $P = 0.65$), temperaturas en las que se alcanzó el 18 %, 92 % y 86 %, respectivamente (Fig. 6). Mantener las semillas dentro de los frutos favoreció la germinación a 20/30 °C y a 30 °C. El pericarpio no impidió la imbibición de la semilla, la salida de la radícula ni el crecimiento de la plántula (Fig. 7).

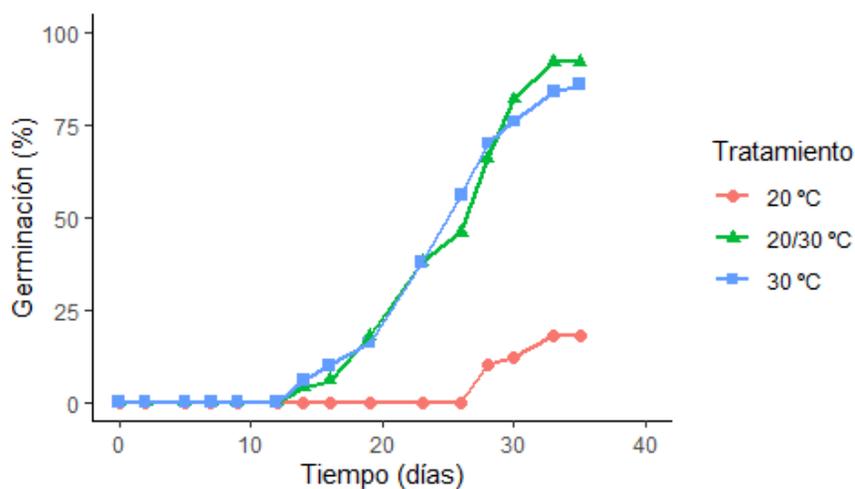


Figura 6. Porcentaje acumulado de germinación de semillas de *M. balsamum* dentro de los frutos (grosor de la cámara seminífera ≥ 0.7 cm).



Figura 7. Germinación de semillas de *M. balsamum* dentro de los frutos. **A.** Emergencia de la radícula a través del pericarpio. **B.** Desarrollo de una plántula dentro del pericarpio. (Fotografías tomadas por Guillermo Solano).

B) Efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación (en condiciones de oscuridad)

La germinación inició a los 12 días en los tres grupos de frutos y en ninguno se presentó afectación por patógenos. Hubo un efecto del tiempo de almacenamiento en el número de semillas germinadas en los días decimonoveno ($F= 13.8$, g.l.= 2, $P< 0.001$, Fig. 8A) y vigésimo cuarto ($KW= 15.80$, g.l.= 2, $P< 0.001$, Fig. 8A). En el primer caso, el máximo de germinación fue mayor en frutos con dos meses ($P< 0.01$), mientras que, en el segundo caso, el máximo de germinación fue mayor en frutos con seis meses ($P< 0.01$).

Se detectó un efecto del tiempo de almacenamiento en el porcentaje acumulado de germinación en los días decimocuarto ($KW= 17.59$, g.l.= 2, $P< 0.001$, Fig. 8B) y decimonoveno ($KW= 17.69$, g.l.= 2, $P< 0.001$, Fig. 8B). En ambos casos, el porcentaje fue mayor en frutos con dos meses (Cuadro 4). En el vigésimo primer día, el porcentaje de germinación fue similar en los frutos con dos y seis meses, pero mayor respecto a ocho meses ($F= 33.71$, g.l.= 2, $P< 0.001$, Fig. 8B, Cuadro 4).

El tiempo de almacenamiento también tuvo un efecto en el T_{50} ($KW= 12.01$, g.l.= 2, $P< 0.01$) y en la TG ($KW= 12.01$, g.l.= 2, $P< 0.01$), de manera que se requirió de menor tiempo para que el 50 % de las semillas germinaran en frutos con dos meses que en aquellos con seis y ocho meses (Cuadro 4). Es decir, que la germinación se dio de forma más rápida (TG mayor) en frutos con dos meses (Fig. 9).

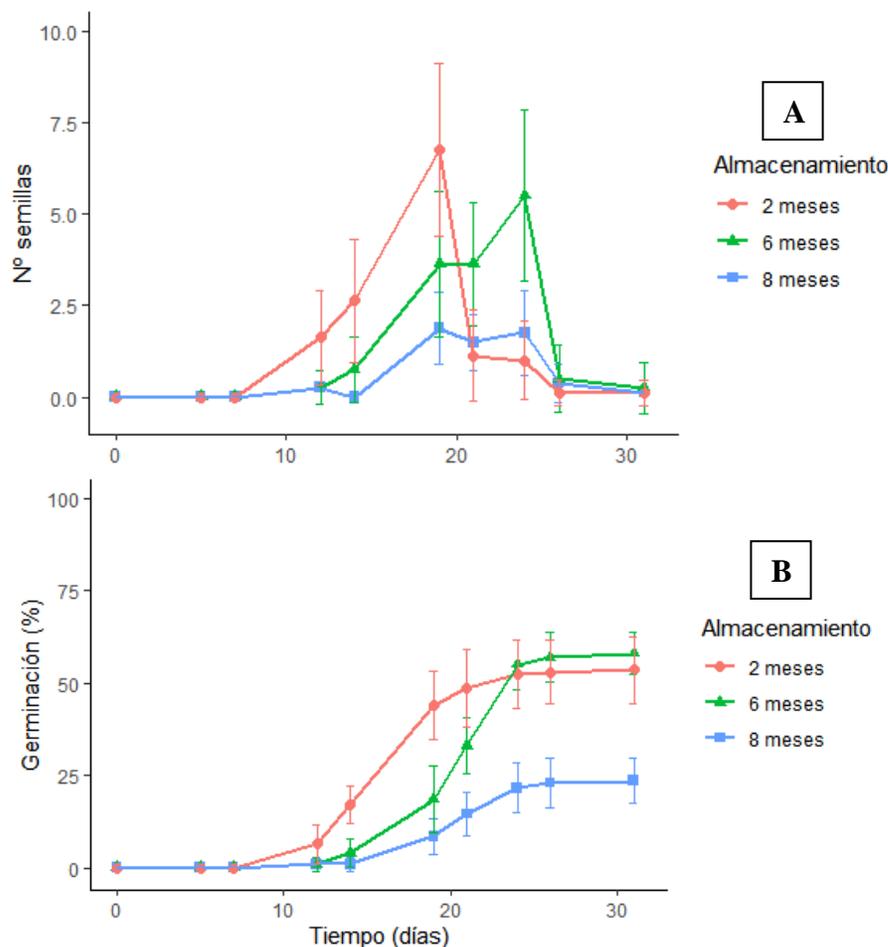


Figura 8. Germinación de semillas de *M. balsamum* en condiciones de oscuridad según el tiempo de almacenamiento a aprox. 24 °C. **A.** Promedio de semillas germinadas por día (\pm desviación estándar). **B.** Porcentaje acumulado de germinación promedio (\pm desviación estándar).

CUADRO 4

Geminación de semillas de *M. balsamum* en condiciones de oscuridad según el tiempo de almacenamiento a aprox. 24 °C *

Tiempo (meses)	Germinación Día 14 (%)	Germinación Día 19 (%)	Germinación Día 21 (%)	Germinación Final (%)	T ₅₀ (días)
Dos	17.00 \pm 5.13 ^a	44.00 \pm 9.07 ^a	48.50 \pm 10.5 ^a	53.50 \pm 9.06 ^a	17.00 \pm 0.41 ^a
Seis	4.00 \pm 3.70 ^b	18.50 \pm 9.06 ^b	33.00 \pm 7.63 ^a	58.00 \pm 5.66 ^a	21.29 \pm 0.95 ^b
Ocho	1.00 \pm 1.85 ^b	8.50 \pm 4.99 ^b	14.50 \pm 6.03 ^b	23.50 \pm 6.21 ^b	20.83 \pm 1.74 ^b

* Promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

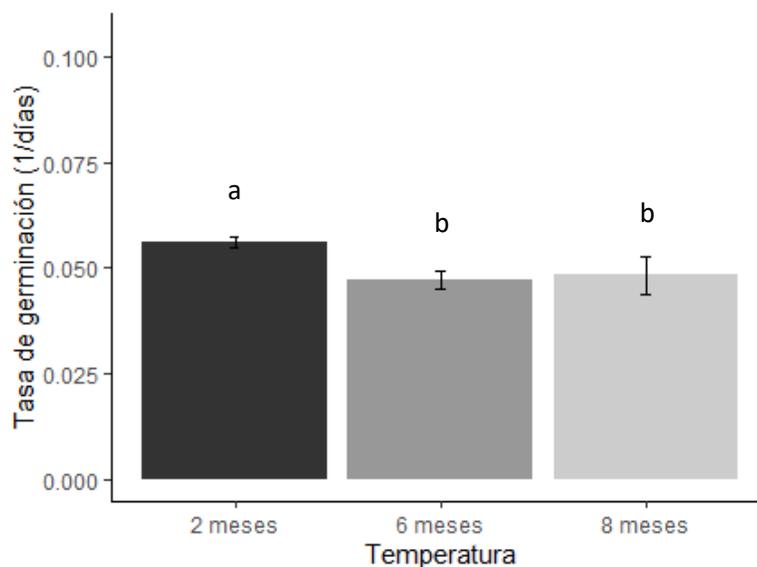


Figura 9. Tasa de germinación promedio (\pm desviación estándar) de semillas de *M. balsamum* en condiciones de oscuridad según tiempo de almacenamiento a aprox. 24 °C. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

C) Efecto de la luz en la germinación

Hubo un efecto de la iluminación en el porcentaje final de germinación ($F = 17.16$, g.l. = 2, $P < 0.001$), el cual fue menor en frutos que estuvieron en *oscuridad*, y similar en aquellos que estuvieron en *luz* y en *luz reducida* (Fig. 10A). Esto indica que la luz no fue un factor determinante para que iniciara la germinación, aunque su presencia favoreció la capacidad germinativa de las semillas. Adicionalmente, se observó que las plántulas que crecieron en *oscuridad* mostraban síntomas de etiolación (Fig. 10B), mientras que aquellas que crecieron en *luz* y *luz reducida* presentaban epicótilos fotosintéticos (Fig. 10C).

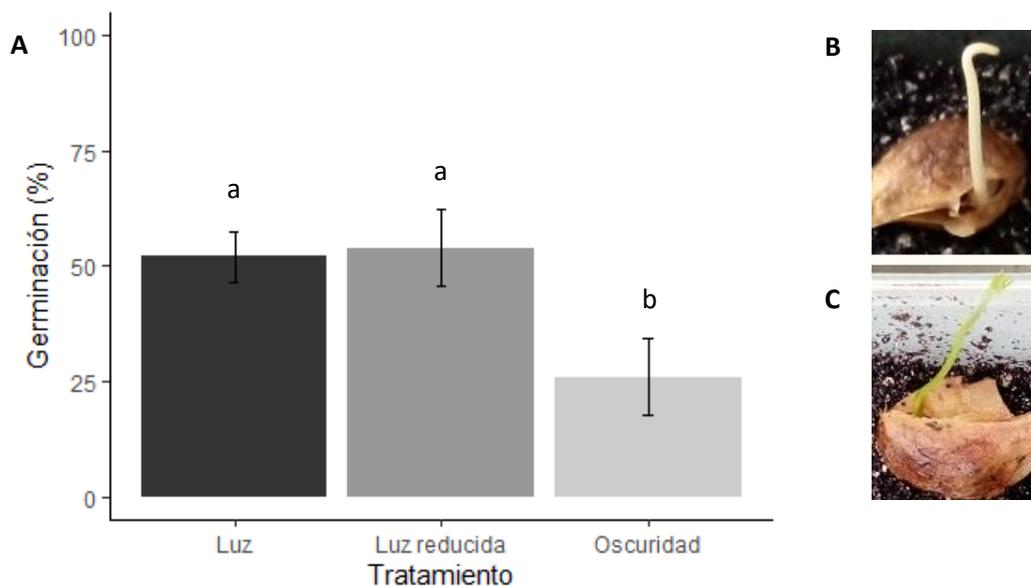


Figura 10. Germinación de semillas de *M. balsamum* y apariencia de las plántulas según las condiciones lumínicas. **A.** Porcentaje final de germinación promedio (\pm desviación estándar). Las letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$). **B.** Plántula obtenida en oscuridad. **C.** Plántula obtenida en luz.

D) Observaciones sobre el proceso de germinación y crecimiento de la plántula

La germinación es hipogea y criptocotilar. Veinticinco semillas maduras absorben hasta 10 mL de agua destilada en 24 h (Figs. 11A, B). Los cotiledones son pálidos y carnosos. La radícula emerge después de 10–12 días de incubación a 30 °C (Figs. 11C, D). Seguidamente inicia el desarrollo del epicótilo, el cual es fotosintético y experimenta una rápida elongación, mientras que el hipocótilo no es visible (Figs. 11E, F). Las primeras hojas son compuestas imparipinnadas (con cinco folíolos alternos) y presentan filotaxia opuesta (Fig. 11G), menos frecuente subopuesta.

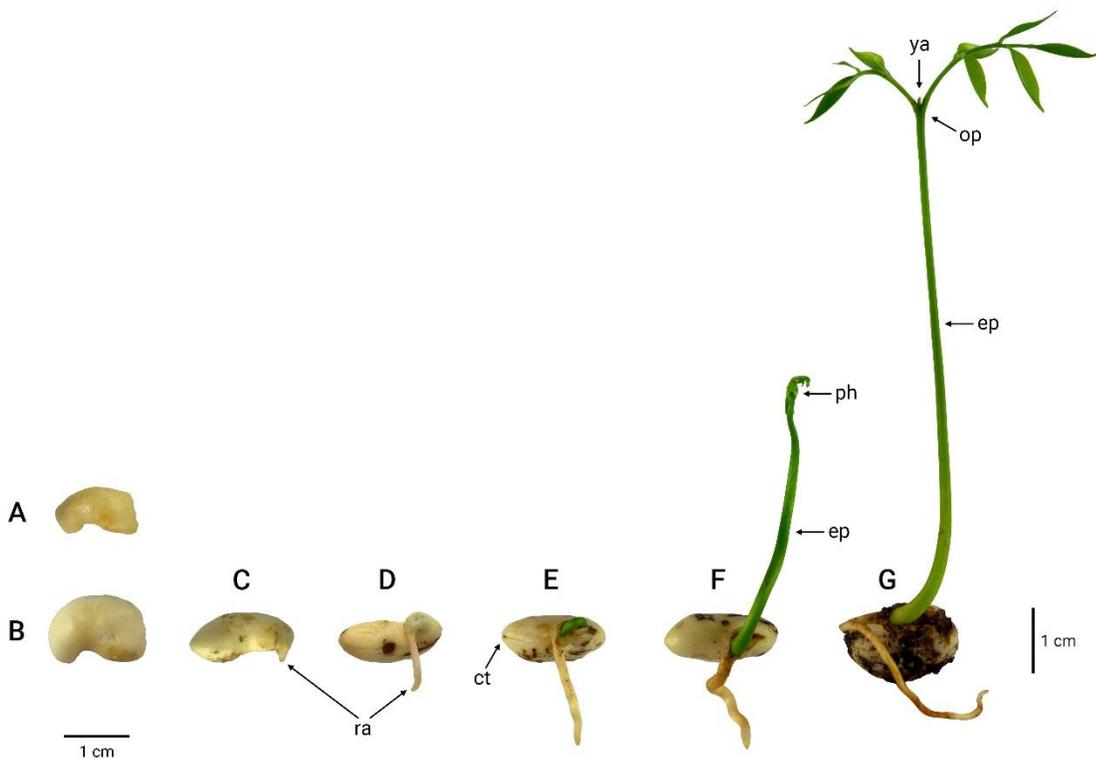


Figura 11. Germinación y crecimiento de una plántula de *M. balsamum*. **A.** Semilla sin imbibir. **B.** Semilla con 24 horas de imbibición. **C.** Semilla a los 12 días de iniciada la imbibición (a 30 °C). **D.** Desarrollo de la radícula. **E.** Desarrollo del epicótilo. **F.** Desarrollo del primer par de hojas compuestas. **G.** Plántula con 10 días de haber germinado. **Abreviaturas**— **ct:** cotiledones; **ep:** epicótilo; **ph:** primeras hojas; **op:** filotaxia opuesta; **ra:** radícula; **ya:** yema apical.

El subsecuente desarrollo de la yema apical genera la elongación del tallo y la formación de nuevas hojas compuestas imparipinnadas, las cuales presentan filotaxia alterna (Fig. 12). El número y tamaño de los folíolos es variable; presentan puntos y líneas translúcidas, y ápices acuminados. Durante los primeros dos meses de edad de la plántula, contados a partir del inicio del desarrollo del epicótilo (Fig. 11F), los cotiledones están presentes. En ese lapso no se observó desarrollo de yemas laterales ni de estípulas.

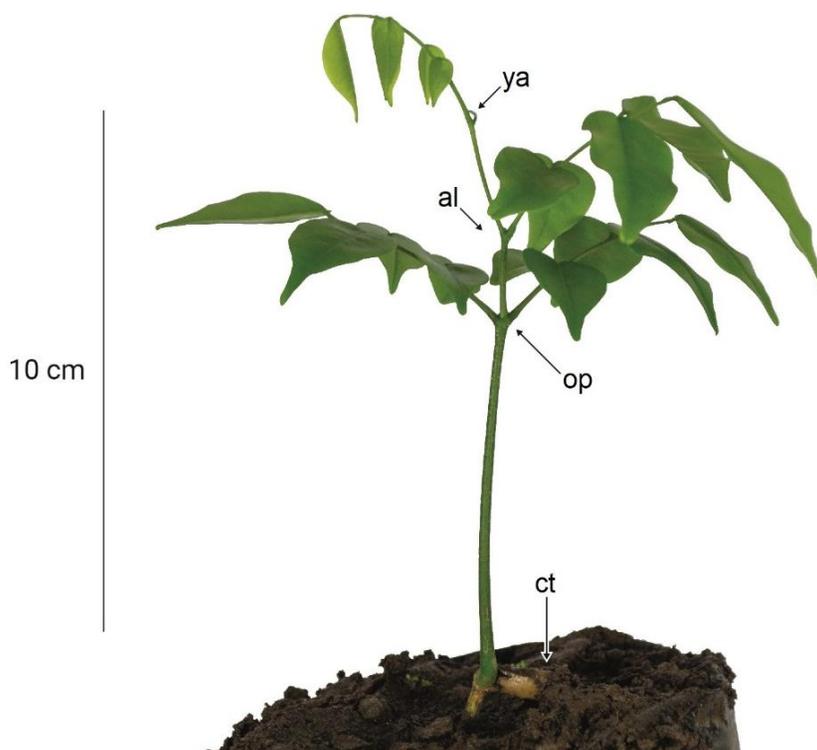


Figura 12. Plántula de *M. balsamum* de dos meses de edad. **Abreviaturas**— **al**: primera hoja compuesta alterna; **ct**: cotiledones; **op**: primer par de hojas compuestas opuestas; **ya**: yema apical.

E) Efecto del sombreado en el crecimiento de las plántulas

Al inicio del experimento las plántulas de ambos tratamientos tenían tallos de la misma longitud ($W= 264$, $P= 0.60$, Fig. 13) y ninguna había producido hojas alternas. Transcurridos 56 días, las que crecieron en condiciones de iluminación presentaron tallos de mayor longitud ($W= 576$, $P< 0.001$, Fig. 13) y desarrollaron en promedio dos hojas alternas, a diferencia de las que crecieron en sombra, las cuales no experimentaron elongación del tallo (Fig. 13) ni produjeron hojas alternas.

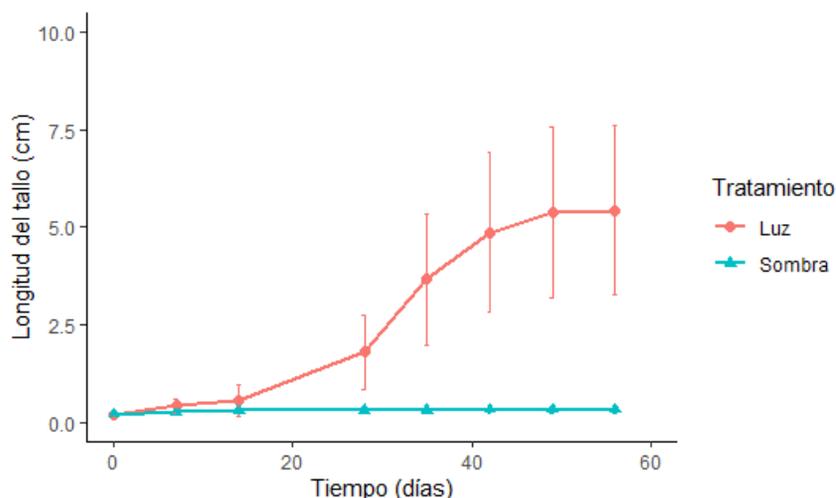


Figura 13. Longitud promedio (\pm desviación estándar) del tallo de plántulas de *M. balsamum* según las condiciones lumínicas en las que crecieron.

Las plántulas que crecieron en sombra presentaron mayor R/S, mayor AFE y mayor RAF que las que crecieron en condiciones de iluminación (Cuadro 5). Es decir, que invirtieron una mayor proporción de biomasa en la producción de raíces, desarrollaron láminas foliares con folíolos más delgados y con mayor superficie, y destinaron mayor cantidad de asimilados a la formación de hojas. Ninguna plántula presentó síntomas evidentes de clorosis, etiolación, herbívora, fitopatologías o deficiencia de nutrientes.

CUADRO 5

Parámetros de crecimiento de plántulas de *M. balsamum* según la condición lumínica *

Tratamiento	R/S **	AFE ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)	RAF ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)
Luz	0.15 ± 0.04^a	26.70 ± 10.62^a	15.45 ± 5.84^a
Sombra	0.20 ± 0.06^b	45.20 ± 15.17^b	23.90 ± 7.72^b

* Promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba U de Mann-Whitney ($P < 0.05$). ** Durante el proceso de medición de la biomasa seca de las raíces se pierden fragmentos de raíz, lo que genera imprecisiones en el cálculo de la R/S.

Discusión

El efecto de la temperatura en las semillas quiescentes se determina mediante las variaciones en la tasa de germinación (Bewley et al., 2013; Arana et al., 2016). Si bien el porcentaje de germinación final fue similar en las tres temperaturas evaluadas, el valor de TG fue mayor a 30 °C que a 20 °C, resultado que confirma la hipótesis propuesta. Aunque la germinación de las semillas de *M. balsamum* se favoreció a 30 °C, ese valor no corresponde a la temperatura óptima, ya que para determinarla deben evaluarse magnitudes aún mayores hasta encontrar el punto en el que la TG disminuye; análisis en el que se aplican modelos matemáticos (Bewley et al., 2013). Si se considera la distribución geográfica natural de los árboles de *M. balsamum* en Costa Rica (Aguilar-Sandí, 2020a), cabe suponer que las temperaturas mínima, óptima y máxima rondan los 20 °C, 30 °C y 40 °C, respectivamente, dado que la respuesta de las semillas a la temperatura es un rasgo adaptativo relacionado con la detección de las condiciones favorables para la germinación (Copeland & McDonald, 2001, Escobar & Cardoso, 2015). En relación con esto, Cordero & Boshier (2003) señalaron que la germinación de las semillas de *M. balsamum* se favorece entre 25 y 35 °C, pero no indicaron el comportamiento de la TG en ese intervalo; tampoco lo hacen Payares-Díaz et al. (2014) ni Loayza-Cabezas et al. (2018), quienes evaluaron el efecto de la temperatura en el porcentaje de germinación, pero no su efecto en la TG.

Debe tenerse presente que la proliferación de hongos también se favorece a 30 °C, lo que ocasiona descomposición y muerte de semillas; este problema se resuelve manteniendo las semillas dentro de los frutos y aplicando fungicidas. Sin embargo, en ninguno de los trabajos previos se informó sobre afectación por patógenos. Y mientras que Salazar (2000)

recomendó extraer las semillas de los frutos, Cordero & Boshier (2003) no lo aconsejaron, pero en ningún caso se dio una justificación para aplicar, o no, esta operación. Según Loayza-Cabezas et al. (2018) la extracción de las semillas mejora la capacidad germinativa, pues el pericarpo induce latencia física, pero ese resultado no coincide con el del presente estudio, ya que se comprobó que el pericarpo no impide la imbibición, la emergencia de la radícula ni la elongación del epicótilo. Dichos autores no tomaron en cuenta que existen frutos maduros de *M. balsamum* que no tienen semillas o que las tienen dañadas de forma natural (Aguilar-Sandí, 2020b; Apéndice B), tampoco fueron conscientes de que el grosor de la cámara seminífera puede usarse como criterio para seleccionar los frutos en los que es esperable que haya semillas sanas (Apéndice C). El bajo porcentaje de germinación encontrado por ellos puede explicarse debido a la existencia de frutos vanos en las muestras que evaluaron y no por la existencia de latencia física. En relación con esto, en una investigación realizada con semillas de *M. peruiferum* se determinó que el pericarpo no ejercía ningún tipo de latencia (Galíndez et al., 2015), lo cual se entiende si se considera que los frutos de los árboles del género *Myroxylon* son la unidad de dispersión, puesto que son sámaras (Vidal, 1978; Aguilar-Sandí, 2020b).

Tomando en cuenta que luego de cinco meses de almacenamiento a temperatura ambiente, las semillas de *M. balsamum* conservaron su capacidad germinativa y presentaron un contenido de humedad de 9.06 ± 0.01 %, entonces pueden clasificarse como ortodoxas, tal como lo propusieron Salazar (2000), Cordero & Boshier (2003) y Loayza-Cabezas et al. (2018). La confirmación de este hecho invalida la hipótesis de que las semillas del bálsamo son recalcitrantes como se proponía al inicio de esta investigación. Si bien, el porcentaje de

germinación y la TG disminuyeron al aumentar el tiempo de almacenamiento, lo que podría interpretarse como un comportamiento recalcitrante, ya que la pérdida de viabilidad está asociada con una disminución en la tasa de germinación (Magnitskiy & Plaza, 2007; Bewley et al., 2013), lo cierto es que esos resultados no reflejan el efecto directo del tiempo de almacenamiento (variable de interés), sino un efecto combinado con las condiciones de oscuridad presentes durante la realización de la prueba (ver p. 25). Si se considera que los árboles de bálsamo crecen de forma natural en sitios que permanecen húmedos a lo largo del año (Aguilar-Sandí, 2020a), entonces existe la posibilidad de que en las poblaciones naturales de esta especie las semillas se comporten como recalcitrantes (Rajjou et al., 2012). Sin embargo, los frutos evaluados provenían de árboles ubicados en el Valle Central de Costa Rica, una región estacionalmente seca (Di Stéfano, Nielsen, Hoomans & Fournier, 1996; Cascante & Estrada, 2001) y se sabe que la respuesta germinativa depende de las condiciones ambientales en las que se desarrolla la planta madre (Vayda, Donohue & Auge, 2018).

En lo concerniente al efecto de la luz, la hipótesis se verificó de forma parcial, pues se esperaba que el porcentaje de germinación fuera igual en condiciones de iluminación y de oscuridad, lo que no sucedió. Sin embargo, dado que hubo germinación en las tres condiciones evaluadas (*luz*, *luz reducida* y *oscuridad*), cabe inferir que las semillas no son exclusivamente fotoblásticas positivas o negativas, sino que presentan un comportamiento indiferente (Escobar & Cardoso, 2015). Si se toma en cuenta que las semillas de esta especie pueden germinar dentro de los frutos y que en el sotobosque predominan condiciones lumínicas de baja relación rojo/rojo lejano (De Souza & Válio, 2001; Figueroa & Vázquez-

Yanes, 2002), entonces se entiende que la luz no sea un factor determinante en la germinación, rasgo propio de semillas de especies no pioneras (Escobar & Cardoso, 2015).

Aunque las semillas tengan la capacidad de germinar en total oscuridad, las plántulas que se obtienen en esa condición muestran síntomas evidentes de etiolación, mientras que las que se obtienen de semillas germinadas en condiciones de iluminación presentan un aspecto lozano. Queda pendiente investigar las diferencias en el desarrollo (fotomorfogénesis) de las plántulas en los días inmediatos a su emergencia, cambios que están relacionados con la inactivación/activación de los fitocromos según sea la calidad de la luz del entorno en el que crecen (Taiz & Zeiger, 1998; Figueroa & Vázquez-Yanes, 2002).

Las plantas tolerantes a la sombra presentan láminas foliares delgadas y con mayor superficie que las intolerantes a la sombra; asimismo invierten mayor cantidad de asimilados en la producción de follaje (Rodríguez & Leihner, 2006; Valladares & Niinemets, 2008). En relación con esto, los valores de AFE y RAF fueron mayores en las plántulas de *M. balsamum* que crecieron en sombra que en las que crecieron en iluminación, lo que indica que se comportan como tolerantes. Esto verifica la hipótesis formulada y coincide con el hecho de que las semillas de esta especie son fotoblásticas indiferentes, rasgo asociado a especies de sucesión tardía (De Souza & Válio, 2001). Las diferencias en el crecimiento entre las plántulas de ambos tratamientos (capacidad de desarrollar tallo y hojas en presencia de luz, y desarrollar folíolos delgados en sombra), son un indicio de variación arquitectónica (Guzmán & Cordero, 2013). No obstante, se necesitan estudios de mayor duración para demostrarlo, en caso contrario se incurriría en sesgos de interpretación (Ávalos, 2019b). El hecho de que las plántulas de sombra no desarrollaran tallos ni hojas indica que los

fitocromos de la yema apical no se activaron (Taiz & Zeiger, 1998). Sin embargo, dado que no se midió la calidad de la luz de los tratamientos, no puede asegurarse que las plántulas de sombra estuvieran privadas de luz roja (650–680 nm). También debe considerarse que la temperatura dentro del invernadero estuvo sujeta a fluctuaciones diarias y que el sustrato que se usó para cultivar las plántulas fue turba inerte. Aunque no hubo síntomas de deficiencia de nutrientes, en estudios de larga duración es preferible usar un sustrato fertilizado.

Conclusiones y recomendaciones

Se determinó que las semillas de *M. balsamum* son quiescentes, su germinación se favorece a 30 °C, se comportan como ortodoxas y son fotoblásticas indiferentes. Además, las plántulas son tolerantes a la sombra. Adicionalmente, se pudo determinar que el pericarpo no induce latencia física, de modo que no es necesario extraer las semillas de los frutos para que germinen. La realización de esta tesis permitió actualizar y aumentar el conocimiento sobre el proceso de geminación y el crecimiento de las plántulas de esta especie, verificar datos de estudios previos, reunir la literatura publicada sobre el tema y generar nuevas preguntas de investigación.

En este sentido, se recomienda diseñar investigaciones dirigidas a determinar el efecto de diferentes gradientes de luz y temperatura, así como de la procedencia de las semillas, en la germinación; identificar los factores que prolongan la longevidad de las semillas, y evaluar el crecimiento de las plántulas en gradientes de iluminación, en distintos sustratos, durante más tiempo y en su hábitat natural. El abordaje de estos aspectos contribuirá con la conservación de una especie de árbol cuyas poblaciones podrían ser más escasas cada día.

Referencias

- Aguilar-Sandí, D. (2019). El árbol *Myroxylon peruiferum* (Fabaceae), nuevo registro en la flora de Costa Rica. *UNED Research Journal*, 11 (3), 424-429. doi: 10.22458/urj.v11i3.2722
- Aguilar-Sandí, D. (2020a). Sinopsis del género *Myroxylon* (Fabaceae) en Costa Rica. *Phytoneuron*, 2020-20, 1-10.
- Aguilar-Sandí, D. (2020b). ¿Sámaras o frutos samaroides? Estructura macroscópica de los frutos maduros de *Myroxylon balsamum* (Fabaceae, Papilionoideae). *Lilloa*, 57 (2), 89-98. doi: 10.30550/j.lil/2020.57.2/1
- Arana, M. V., Gonzalez-Polo, M., Martinez-Meier, A., Gallo, L. A., Benech-Arnold, R. L., Sánchez, R. A., & Batlla, D. (2016). Seed dormancy responses to temperature relate to *Nothofagus* species distribution and determine temporal patterns of germination across altitudes in Patagonia. *New Phytologist*, 209, 507-520. doi: 10.1111/nph.13606
- Ávalos, G. (2019a). Still searching the rich coast: Biodiversity of Costa Rica, numbers, processes, patterns, and challenges. En T. Pullaiah (Ed). *Global Biodiversity. Volume 4. Selected countries in the Americas and Australia* (pp. 101-138). [No place]: Apple Academic Press & CRC Press.
- Ávalos, G. (2019b). Shade tolerance within the context of the successional process in tropical rain forests. *Revista de Biología Tropical*, 67 (2), S53-S77.
- Barstow, M., Jiménez, Q., & Klitgård, B. B. (2018). *Platymiscium parviflorum*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2018*: e.T124098500A124100622.

- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy* (3rd ed.). New York: Springer Science & Business Media.
- Botanic Gardens Conservation International & IUCN SSC Global Tree Specialist Group. (2019). *Myroxylon peruiferum*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2019*: e.T62026679A149025717.
- Botha, F. C., & Small, J. G. C. (1988). The germination response of the negatively photoblastic seeds of *Citrullus lanatus* to light of different spectral compositions. *Journal of Plant Physiology*, 132 (6), 750-753.
- Cascante, A., & Estrada, A. (2001). Composición florística y estructura de un bosque húmedo premontano en el Valle Central de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 49 (1), 213-225.
- Copeland, L. O., & McDonald, M. B. (2001). *Principles of seed science and technology* (4th ed.). New York, USA: Springer Science + Business Media.
- Cordero, J., & Boshier, D. H. (Eds). (2003). *Árboles de Centroamérica, un manual para extensionistas*. [Oxford, Reino Unido]: Oxford Forestry Institute/Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- De Souza, R. P., & Válio, I. F. M. (2001), Seed size, seed germination, and seedling survival of Brazilian tropical tree species differing in successional status. *Biotropica*, 33 (3), 447-457.
- De Vogel, E. F. (1980). *Seedlings of dicotyledons*. Wageningen, Netherlands: Centre for Agricultural Publishing and Documentation.

- Decreto Ejecutivo N° 25700-MINAE. (1997). [Última versión]. Recuperado de http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=29811&nValor3=108834&strTipM=TC
- Decreto Ejecutivo N° 40477-MINAE (2017). [Última versión]. Recuperado de http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=84368&nValor3=108829&strTipM=TC
- Di Stéfano, J. F., Nielsen, V., Hoomans, J., & Fournier, L. A. (1993). Regeneración de la vegetación arbórea en una pequeña reserva forestal urbana del nivel premontano húmedo, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 44 (2), 575-580.
- Escobar, D. F., & Cardoso, V. J. (2015). Germinación y latencia de semillas de *Miconia chartacea* (Melastomataceae), en respuesta a luz, temperatura y hormonas vegetales. *Revista de Biología Tropical*, 63 (4), 1169-1184.
- Estrada, A., Rodríguez, A., & Sánchez, J. (2005). *Evaluación y categorización del estado de conservación de plantas en Costa Rica*. Recuperado de http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Bosques/Estrada_2005_Estado_Conservacion_plantas_CR.pdf
- Figuroa, J. A., & Vázquez-Yanes, C. (2002). Efecto de la calidad de la luz sobre la germinación de semillas en el árbol pionero tropical *Heliocarpus appendiculatus* (Tiliaceae). *Revista de Biología Tropical*, 50 (1), 31-36.
- Fournier, L. A. (2004). Conozcamos los árboles de Costa Rica. *Revista Biocenosis*, 19 (1), 35-40.

- Fuentes, R. E. (1993). El Bálsamo en El Salvador: una especie con potencial económico. *Revista Forestal Centroamericana*, 6, 38-41.
- Galíndez, G., Malagrina, G., Ceccato, D., Ledesma, L., Lindow-López, L., & Ortega-Baes, P. (2015). Dormición física y conservación ex situ de semillas de *Amburana cearensis* y *Myroxylon peruiferum* (Fabaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 50 (2), 153-161.
- Gómez, L. D., & Savage, J. M. (1991). Investigadores en aquella rica costa: biología de campo costarricense 1400-1980. En D. H. Janzen (Ed.). *Historia Natural de Costa Rica* (pp. 1-11). San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Grayum, M. H., Hammel, B. E., Troyo, S., & Zamora, N. (2004). Historia/History. En B. E. Hammel, M. H. Grayum, C. Herrera & N. Zamora (Eds.). *Manual de Plantas de Costa Rica. Vol. I. Introducción* (pp. 1-50). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 97, 1-299.
- Guzmán, J. A., & Cordero, R. A. (2013). Growth and photosynthetic performance of five tree seedlings species in response to natural light regimes from the Central Pacific of Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 61 (3), 1433-1444.
- Jiménez, Q. (1998). *Árboles maderables en peligro de extinción en Costa Rica* (2da ed.). Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad.
- León, J., & Poveda, L. J. (1999). *Los nombres comunes de las plantas en Costa Rica*. Heredia, Costa Rica: EFUNA.
- Loayza-Cabezas, S., Rodríguez-Trejo, D. A., Hernández-Acosta, E., & Almaráz Suárez, J. (2018). Effect of light, temperature and scarification on the germinative capacity and

- initial growth of *Myroxylon balsamum* (L.) Harms. *Revista Caatinga*, 31 (2), 415-423.
- Magnitskiy, S. V., & Plaza, G. A. (2007). Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 96-103.
- Martínez-Rivera, J. C., Blanco, J., Colorado, R., Guerra, Ó., & Antonio, H. (2015). El impacto cultural del árbol de bálsamo en Chiltiupán, La Libertad, El Salvador. *Revista entorno*, 58, 25-33.
- Obando, V. (2013). Conservación y biodiversidad. Vigésimo informe Estado de la Nación en Desarrollo Humano Sostenible. Recuperado de https://www.estadonacion.or.cr/files/biblioteca_virtual/020/ambiente/Obando_Conservacion.pdf
- Payares-Díaz, I., Mario-Contreras, O. A., Medrano-Vélez, M. A., & Millán-Romero, E. (2014). Germinación y desarrollo de plántulas de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms en el departamento de Sucre. *Colombia Forestal*, 17(2), 193-201.
- Programa REDD/CCAD-GIZ-SINAC (2015). *Inventario Nacional Forestal de Costa Rica 2014-2015. Resultados y Caracterización de los Recursos Forestales*. San José, Costa Rica: Programa Reducción de Emisiones por Deforestación y Degradación Forestal en Centroamérica y la República Dominicana (REDD/CCAD-GIZ) y Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC).
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., & Job, D. (2012). Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 507-533.

- Revene, Z. (2007). Los Balsameros de Atiluya, Sonsonate, El Salvador. *El Salvador Investiga*, 3, 5-23.
- Reyes Avilés, I. & Gutiérrez Chaparro, J. J. (2010). Los servicios ambientales de la arborización urbana: retos y aportes para la sustentabilidad de la ciudad de Toluca. *Quivera*, 12 (1), 96-102.
- Rodríguez, W., & Leihner, D. (2006). *Análisis del crecimiento vegetal. Fisiología de la producción de los cultivos tropicales. Vol.7*. San José, Costa Rica: Editorial UCR.
- Rojas-Rodríguez, F., & Torres-Córdoba, G. (2014). Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción. Chirraca (*Myroxylon balsamum*). Nota Técnica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú (Costa Rica)*, 11 (27), 76-78.
- RStudio Team (2020). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio, PBC, Boston, MA, USA. <http://www.rstudio.com>.
- Salazar, R. (Coordinador). (2000). *Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina*. Vol. I. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Sartori, A. L. B, Lewis, G. P., Mansano, V. F., & Tozzi, A. M. G. A. (2015). A revision of the genus *Myroxylon* (Leguminosae: Papilionoideae). *Kew Bulletin*, 70, 48. doi: 10.1007/S12225-015-9604-7
- Taiz, L., & Zeiger, E. (1998). *Plant Physiology* (2nd ed.). Massachusetts, USA: Sinauer Associates.

- Tripathi, S., Hoang, Q. T. N., Han, Y. -J., & Kim, J. -I. (2019). Regulation of photomorphogenic development by plant phytochromes. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*, 6165. doi:10.3390/ijms20246165
- Valladares, F., & Niinemets, Ü. (2008). Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *39*, 237-257.
- Vayda, K., Donohue, K., Auge, G. A. (2018). Within- and trans-generational plasticity: seed germination responses to light quantity and quality. *AoB PLANTS*, *10*, ply023. doi: 10.1093/aobpla/ply023
- Vidal, W. N. (1978). Considerações sobre as sâmaras que têm ala paranuclear. *Rodriguésia*, *30* (47), 109-168.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York, USA: Springer-Verlag.

Apéndices

A) Búsqueda de árboles de *Myroxylon balsamum*

Se revisaron las colecciones disponibles de esta especie en el Herbario Nacional de Costa Rica (CR), Herbario Juvenal Valerio Rodríguez (JVR) y Herbario Luis A. Fournier Origgí (USJ). Asimismo, se buscó información en libros sobre árboles de Costa Rica. A partir de la información recopilada se exploraron once sitios entre febrero y agosto de 2019.

Se encontraron árboles de *M. balsamum* en cinco de los once sitios visitados (Cuadro A1). Todos son cultivados, a excepción del que se localizó en Palmar Norte de Osa. De ellos solo dos produjeron suficientes frutos maduros para realizar las pruebas de germinación (Figs. A1 y A2). En los restantes seis sitios se encontraron árboles de *M. peruiiferum*.

CUADRO A1
Sitios visitados en busca de árboles de *M. balsamum* en Costa Rica

Provincia	Cantón	Distrito / Sitio	Especie encontrada
Alajuela	Alajuela	Alajuela / Parque central	<i>M. peruiiferum</i>
San José	Acosta	San Ignacio / Parque central	<i>M. peruiiferum</i>
		San Ignacio / Chirracá	<i>M. peruiiferum</i>
	Mora	Ciudad Colón / El Rodeo	<i>M. peruiiferum</i>
	Montes de Oca	San Pedro / Campus UCR	<i>M. balsamum</i>
		Mercedes / Campus UCR	<i>M. peruiiferum</i>
		San José	Central / Museo Nacional
	Santa Ana	Santa Ana / Plaza Koros	<i>M. balsamum</i>
Puntarenas	Osa	Uruca / Centro de Conservación	<i>M. balsamum</i>
		Salitral / Alto Raicero-Chirracal	<i>M. peruiiferum</i>
		Palmar / Parmar Norte	<i>M. balsamum</i>



Figura A1. *Myroxylon balsamum*. Árbol ubicado en el parqueo de la plaza Koros, Santa Ana (Aguilar-Sandí 13, USJ). **A.** Tronco y copa (DAP= 85 cm; Altura= 28 m). **B.** Detalle de una rama con frutos inmaduros (30 de julio de 2019).

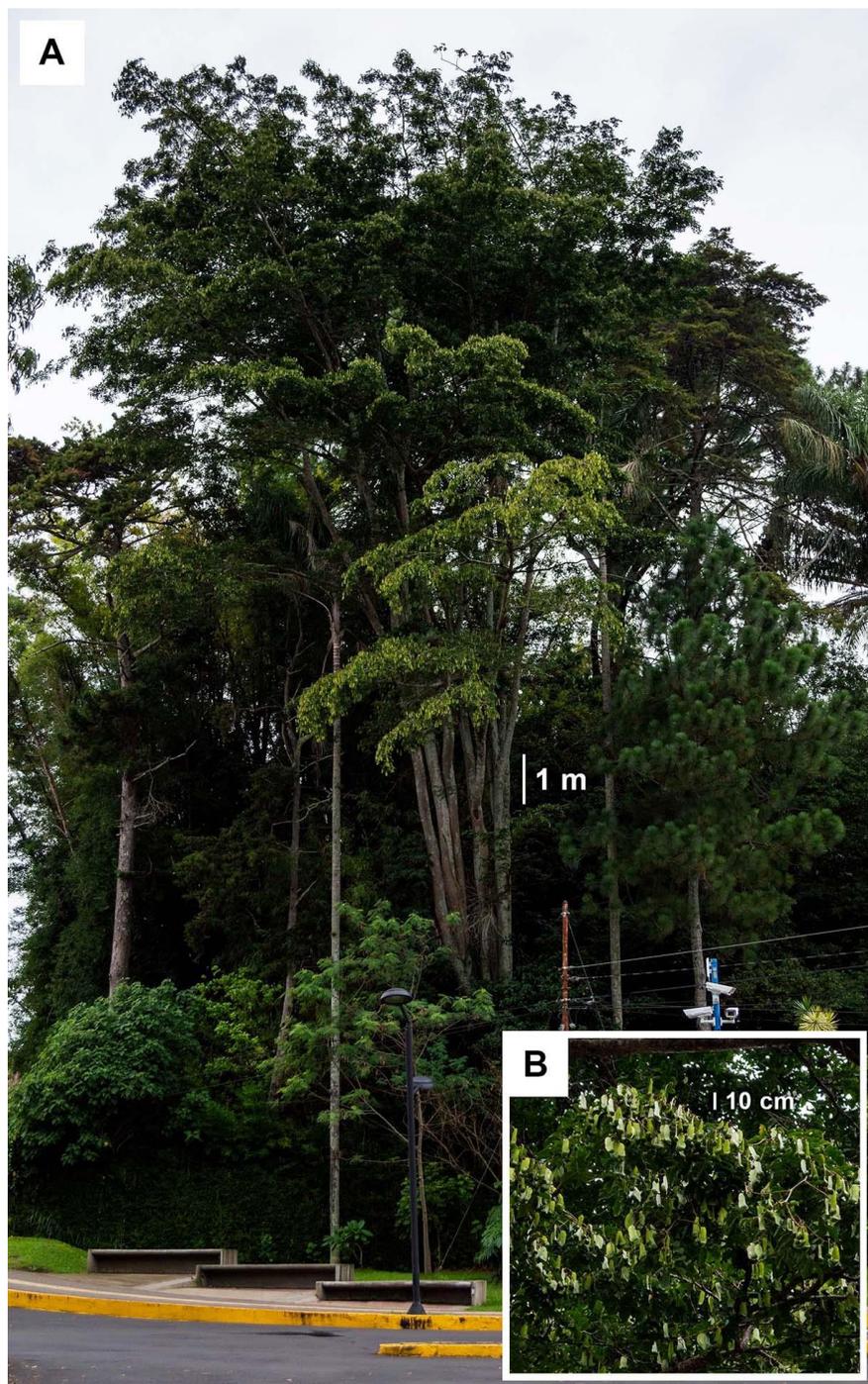


Figura A2. *Myroxylon balsamum*. Árbol ubicado en el Jardín Botánico José María Orozco, Montes de Oca (*Morales 2345*, USJ). **A.** Tronco y copa (DAP= 106 cm; Altura= 38 m). **B.** Detalle de una rama con frutos inmaduros (16 de agosto de 2019).

B) Variación en el contenido de la cámara seminífera

Se seleccionaron aleatoriamente 400 frutos maduros provenientes del árbol ubicado en Santa Ana. Se cuantificó el número de semillas por fruto, así como el estado de las mismas (ausente, sana o dañada). Los datos se analizaron con pruebas chi cuadrado.

Los porcentajes de frutos sin semilla, con semillas sanas y con semillas dañadas se ajustaron a una proporción 1:3:1 ($\chi^2= 4.27$, g.l.= 2, P= 0.12, Fig. A3). Por lo tanto, de un lote de frutos seleccionados aleatoriamente cabe esperar que el 20 % no tengan semilla, el 60 % las tenga sanas y el restante 20 % las tengan dañadas (Fig. A4). El 96 % de los frutos presentó una semilla, mientras que el 4 % presentó dos ($\chi^2= 338.56$, g.l.= 1, P< 0.05).

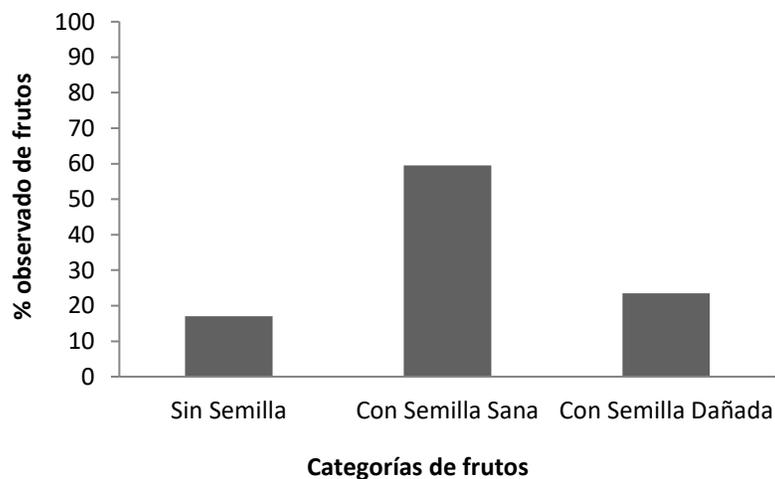


Figura A3. Porcentaje de frutos de *M. balsamum* según la presencia de semillas y el estado de la semilla (N= 400 frutos).



Figura A4. Semillas de *M. balsamum* dañadas naturalmente

C) Grosor de la cámara seminífera como predictor de la presencia de semillas

Con un vernier se midió el grosor de la cámara seminífera de 200 frutos maduros aleatoriamente seleccionados (100 del árbol ubicado en Santa Ana y 100 del árbol del Jardín Orozco), que fueron diseccionados y clasificados en dos categorías: frutos con material germinable (i.e. con semillas sanas) y frutos sin material germinable (i.e. sin semilla o con semillas dañadas). Los promedios se compararon con pruebas U de Mann-Whitney.

Se encontró que el grosor promedio (\pm desviación estándar) de la cámara seminífera es mayor en frutos con material germinable (0.82 ± 0.10 cm) que en frutos sin material germinable (0.68 ± 0.15 cm) ($W= 1798.5$, $P < 0.001$).

A partir del resultado anterior, se diseñó una prueba de germinación con frutos provenientes del árbol de Santa Ana que tenían cinco meses de almacenamiento a temperatura ambiente (aprox. 24 °C). Se catalogó como frutos con material germinable aquellos cuya cámara seminífera tuviera un grosor mayor o igual que 0.7 cm; y como frutos sin material germinable aquellos en los que este grosor fuera menor a 0.7 cm.

A los frutos se les removió el ala y se colocaron en cajas plásticas con turba humedecida y con Amistar al 0.1 %. Posteriormente, las cajas se colocaron dentro de tres cámaras de germinación programadas a 20 °C, 20/30 °C y 30 °C, respectivamente, con fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad (N= 50 frutos/temperatura). El porcentaje acumulado final de germinación fue de 0 % a 20 °C y a 30 °C y fue de 4 % a 20/30 °C en frutos sin material germinable. Este último valor fue menor al obtenido en los frutos con material germinable a esa misma temperatura ($\chi^2 = 80.67$, g.l.= 1, $P < 0.001$, Fig. A5).

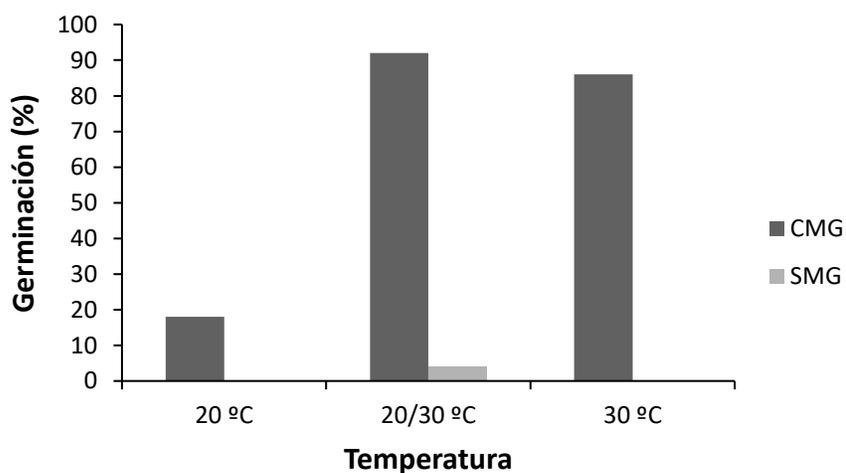


Figura A5. Porcentaje acumulado final de germinación en frutos de *M. balsamum* con material germinable (CMG) y sin material germinable (SMG).

*Todo arte y toda investigación e, igualmente, toda acción
y libre elección parecen tender a algún bien*

ARISTÓTELES, ÉTICA NICOMÁQUEA, 1094A



Inflorescencias del árbol de bálsamo (*Myroxylon balsamum*, Fabaceae)