



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTILÁN

Tratamientos pregerminativos en semillas de

Pinus cembroides.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
I N G E N I E R A A G R Í C O L A
P R E S E N T A :
MÓNICA YAZMÍN LÓPEZ SÁNCHEZ

ASESOR: M.C. FRANCISCO CRUZ PIZARRO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A Dios, por acomodar las cosas en el universo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser la institución pública que me ha brindado gran parte de lo que soy.

Al M.C. Francisco Cruz Pizarro, por ser el guía de este trabajo, por su paciencia, tiempo y disposición.

A mi madre Ofelia Sánchez Ortiz, por el impulso que me brindó para terminar este trabajo, por su entrega, por su fortaleza bien ganada por los años y por ser todos los días el soporte de mi vida.

A Nelson Martínez, por su apoyo y compañía.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo general.....	3
1.2. Objetivo particulares.....	3
1.3. Hipótesis	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Características de la especie.....	4
2.1.1. Distribución	4
2.1.2. Importancia.....	5
2.1.3. Situación ecológica-social	5
2.1.4. Usos	6
2.1.5. Problemática.....	6
2.1.6. Características de la formación de semillas.....	7
2.1.6.1. Formación de estructuras masculinas y femeninas	7
2.1.6.2. Polinización.....	9
2.1.6.3. Fertilización.....	10
2.1.6.4. Embriogénesis y desarrollo de semilla.....	11
2.1.6.5. Características de la semilla de pino	13
2.2. Germinación.....	14
2.2.1. Definición.....	14
2.2.2. Características generales	15
2.2.3. Fases o etapas	15

2.2.4.	Evaluación del proceso germinativo.....	18
2.2.5.	Requerimientos para la germinación	20
2.2.5.1.	Exógenos	20
2.2.5.2.	Endógenos	23
2.3.	Pruebas de viabilidad	26
2.4.	Referencias asociadas a la germinación de semillas.....	29
2.5.	Tratamientos pregerminativos	31
2.6.	Postmaduración del embrión.....	36
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1.	Ubicación del experimento	40
3.2.	Material vegetal	40
3.3.	Diseño experimental	40
3.4.	Sustrato	40
3.5.	Condiciones de siembra	41
3.6.	Pruebas previas a la aplicación de los tratamientos	43
3.6.1.	Pruebas de imbibición	43
3.6.2.	Pruebas de viabilidad.....	43
3.7.	Variables de estudio.....	43
3.7.1.	Días a inicio de germinación	43
3.7.2.	Valor germinativo.....	43
3.7.3.	Longitud de radícula.....	44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1	Pruebas previas a los tratamientos	45
4.1.1	Pruebas de imbibición	45
4.1.2	Pruebas de viabilidad.....	46

4.2	Variables de estudio.....	47
4.2.1.	Días a inicio de germinación	47
4.2.2.	Valor germinativo.....	50
4.2.3.	Longitud de radícula.....	55
5.	CONCLUSIONES	57
6.	BIBLIOGRAFÍA	59

1. INTRODUCCIÓN

El piñón (*Pinus cembroides*) es una especie endémica de México y uno de los pinos con mayor distribución en el territorio nacional, sus bosques presentan extensas superficies en ambas cadenas montañosas del norte del país, el área geográfica conocida se extiende hasta Puebla (Rzedowski, 1983).

Pinus cembroides pertenece al grupo de pinos piñoneros, de éste es la única especie comestible, su principal producto son las semillas llamadas piñones, quienes representan la mayor explotación económica de los piñoneros por su precio de semilla elevado en el mercado, además es un producto muy apreciado como complemento alimenticio de alto valor nutricional y alto porcentaje de grasas y proteínas. La colecta y venta del piñón representa ingresos a una numerosa cantidad de familias en las zonas rurales del país especialmente en climas semiáridos, aunque la venta de la semilla genera importantes ingresos económicos, también genera actividad comercial gracias a los diferentes usos que tiene el árbol. Es un producto agrícola valioso en las comunidades donde se encuentra, desafortunadamente ha sido escaso e inadecuadamente aprovechado (CONAFOR-SIRE).

Una característica que ha aprovechado el hombre es su resistencia, debido a que es un árbol que puede crecer en condiciones adversas (Duke, 2001), se utiliza para reforestar zonas áridas, semiáridas y suelos erosionados, también se recomienda como planta de sombra y ornato en regiones de clima seco (CONAFOR-SIRE).

Los bosques de piñón desafían diversos factores que impactan en su regeneración natural, entre los problemas a los que se enfrenta se encuentran los desmontes, incendios forestales, el lento crecimiento del árbol, la mortalidad presentada durante los primeros años de su vida y la incidencia de plagas y enfermedades que atacan y se alimentan de conos y semillas. Aunado a lo anterior se toma en cuenta que su ciclo reproductivo natural es lento, dura alrededor de 36 meses a partir del desarrollo de los primordios florales hasta la maduración de las semillas, la producción de semillas es cada 5 o 6 años (CONAFOR- SNIF) y la viabilidad de las semillas decrece rápidamente a partir de un año después de su dispersión; de un kilogramo de semilla

que posee de 2,250 a 3,144 unidades el porcentaje de semillas viables es de 60 a 90% (Martínez, 1945).

Esta especie se reproduce naturalmente por medio de sus semillas. La semilla del piñón presenta latencia, que de forma natural retrasa el proceso de germinación y proporciona a la semilla un tiempo adicional para que pueda dispersarse a grandes distancias, en la búsqueda de su propagación es importante la interrupción de la latencia para obtener el número de árboles deseados. La Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) recomienda sembrar de 2 a 3 semillas por envase y Martínez (1945) recomiendan exponer las semillas de piñón a periodos de frío para mejorar su germinación. La propagación asexual se puede realizar por medio de cortes del tallo, estacas y cultivo de tejidos. Se ha intentado el cultivo *in vitro* con fines de propagación (CONAFOR y De la Rosa 1995).

En los últimos años *Pinus cembroides* ha sido una especie recomendada por CONAFOR para reforestar y producir árboles de navidad, esta institución no produce la plántula en sus viveros por lo que realiza acuerdos con la Secretaría de la Defensa Nacional o ejidos para que estos produzcan planta y a su vez CONAFOR pueda distribuirla mediante programas gubernamentales.

1.1. Objetivo general

Evaluar la germinación de semillas de *Pinus cembroides* Zucc utilizando tratamientos pregerminativos.

1.2. Objetivo particulares

- I. Evaluar la exposición a frío de la semilla de *Pinus cembroides* a través de la estratificación.
- II. Determinar la influencia de la escarificación en la respuesta a la germinación de *Pinus cembroides*.

1.3. Hipótesis

La semilla de *Pinus cembroides* requiere de frío para germinar; entonces el tiempo de exposición a bajas temperaturas influye en la rapidez de su germinación.

La testa puede limitar la germinación como una barrera física en la semilla, al eliminarla se puede incrementar la respuesta a la germinación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Características de la especie

2.1.1. Distribución

En México se registra un total de 71 especies de coníferas en el territorio nacional, de las cuales el 50% son endémicas, esto representa el 48% del total de las especies conocidas en el mundo, lo que coloca a México en el primer lugar mundial en cuanto a riqueza en especies de pino (Peña, 2005). Los pinos piñoneros muestran una distribución geográfica restringida con excepción de *Pinus cembroides*, que se localiza desde Arizona y Nuevo México en U.S.A, hasta Puebla y Veracruz en México (García, 1987). Ocupa casi siempre zonas de transición entre la vegetación xerófila de clima áridos y la boscosa de las montañas más húmedas (Rzedowski, 1983). Tiene poblaciones en Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo (Perry, 1991). También forma bosques en los estados de Baja California, Baja California Sur, Jalisco, Puebla, Sonora y Estado de México (CONAFOR-SIRE, 2010). (Figura1)



Figura 1. Distribución geográfica del *Pinus cembroides* (Martínez 1945).

Se localiza en altitudes que van desde los 1,350 a los 2,700 msnm, latitudes entre 18° y 32°N, longitudes entre 90° y 116°W, con precipitaciones de 365 mm a 800 mm anuales. Soporta temperaturas mínimas extremas de -7°C y máximas extremas de 42°C, con una temperatura media anual de 17.9°C (Eguiluz, 1982).

2.1.2. Importancia

Pinus cembroides pertenece al grupo de pinos piñoneros. Esta especie es importante comercialmente por su semilla de alto valor nutricional, alto porcentaje de grasas y proteínas; representa la mayor explotación económica de los piñoneros. Su colecta y venta proporcionan ingresos a una numerosa cantidad de familias en las zonas rurales del país especialmente en climas semiáridos. Genera actividad comercial en zonas rurales gracias a los diferentes usos que tiene el árbol. Su principal producto son las semillas llamadas piñones, muy apreciadas como complemento alimenticio, figuran al lado de la nuez, pistacho, avellana y almendra con un precio elevado en el mercado.

2.1.3. Situación ecológica-social

Pinus cembroides es una especie endémica de México y uno de los pinos con mayor distribución, su área geográfica conocida se extiende desde los estados fronterizos al norte del país hasta Puebla (Rzedowski, 1983). Es importante conservar y procurar los bosques piñoneros por la generación de valores directos como madera, carbón y frutos; así como los valores indirectos que consisten en la influencia del bosque sobre el clima, el suelo y el agua, en donde en comparación con el campo abierto, el bosque genera un clima propio, la temperatura, humedad, viento y precipitación permiten la interacción continua de los organismos vivos (FAO, 1992). Se puede desarrollar en sitios con condiciones adversas, soporta baja humedad relativa, luz solar intensa, poca lluvia y suelos alcalinos (Duke, 2001).

2.1.4. Usos

El aprovechamiento de este recurso es de gran importancia para el campesino forestal toda vez que de él obtiene ingresos de la comercialización de su fruto o piñón, además de otros aprovechamientos como lo son madera para construcción de vivienda, cercas, leña, venta de árboles para adorno, arbolitos de navidad y venta de tierra para jardines. La resina que se obtiene del árbol es utilizada como materia prima en impermeabilizantes y como pegamento de ollas y canastas.

Por su hábito de crecimiento, esta especie se recomienda para reforestar zonas áridas, semiáridas y suelos erosionados, también se utiliza como planta de sombra y ornato en regiones de clima seco. Es un árbol recomendable para decorar parques, jardines y campos deportivos.

Desde 1984 existen reportes de producción de piñón para arbolitos de navidad en los estados de Coahuila, Durango, Nuevo León y Zacatecas (Mondragón, 1987). Actualmente existen plantaciones forestales de *Pinus cembroides* impulsadas por la CONAFOR con el objetivo de reforestar y promover el cultivo de árboles de navidad.

2.1.5. Problemática

Los bosques de piñón, al igual que cualquier bosque, se ven permanentemente afectados por una serie de factores que tienden a su deterioro parcial o total, entre ellos sobresalen los incendios forestales, los desmontes, las explotaciones irracionales y la incidencia de plagas y enfermedades. Entre estas se encuentran las que atacan y se alimentan de conos y semillas, impactando directamente en la regeneración natural del bosque.

Existen varias limitantes para la regeneración natural de *Pinus cembroides*, de inicio la periodicidad cíclica que tiene el árbol para la producción de sus semillas, debido a que los árboles tardan varios años en fructificar por primera vez, según Salazar (2001) comienzan a florecer a partir de los 25 años de edad; el tiempo transcurrido entre la polinización y la maduración del cono y las semillas es de 30 a 36 meses (Zavala, 1987; Salazar, 2001). La producción de numerosa cantidad de semilla es cada 5 o 6 años; las cosechas anuales se

producen solamente debido a que otras ramas de la misma planta alternan sus ciclos, lo que indica que su producción de semillas varía de un año a otro.

La viabilidad de la semilla también influye sobre la regeneración natural de *Pinus cembroides*, las semillas recién caídas tienen una viabilidad de 83 a 96%, pero ésta decrece rápidamente a partir de un año (Cetina, 1984), sin embargo las semillas germinan durante la primavera del año siguiente a su dispersión, aunque hay semillas que no germinan hasta el segundo o tercer año después de ser dispersadas. El porcentaje de germinación regularmente es inferior que el porcentaje de viabilidad; en trabajos de germinación realizados con *Pinus cembroides*, Cantero (1996) obtuvo una viabilidad del 95% y 90% con una germinación de 49.82% y 59.82% respectivamente; Cetina (1984) obtuvo un 76.6% de viabilidad pero un porcentaje de germinación de 56%.

La mortalidad de las plantas durante los primeros años de su vida, es un factor importante que limita su establecimiento. El 80% del total de las plántulas producidas mueren por diferentes causas en el curso del primer año de su vida, así en el transcurso de los primeros cuatro años pueden permanecer con vida un 6% de las plántulas originalmente producidas (Martínez, 1987).

2.1.6. Características de la formación de semillas

2.1.6.1. Formación de estructuras masculinas y femeninas

El proceso de formación y desarrollo de las células sexuales en el interior de las estructuras florales se conoce con el nombre de esporogénesis. La formación y desarrollo de los granos de polen recibe el nombre de microsporogénesis y la de óvulos recibe el nombre de megasporogénesis. En la mayoría de los pinos la duración del desarrollo completo de sus flores tanto masculinas como femeninas es de un año aproximadamente.

Los primordios florales de las flores masculinas se inician durante la primavera o a principios de verano. En el interior de los microsporangios se encuentra una gran cantidad de células diploides llamadas microsporocitos o células madres de las microsporas quienes darán por meiosis a cuatro microsporas o granos de polen, éstos aun rodeados por la pared del microsporocito forman sacos aéreos que separan la pared externa e interna que rodea a cada

una de las microsporas. Antes de que sean liberadas las microsporas, su núcleo se divide tres veces consecutivas, para dar origen en las dos primeras divisiones a células protálicas. La tercera división del núcleo da origen a dos células diferentes la célula generadora y la célula vegetativa. Las microsporas al tiempo de ser liberadas del microsporangio están provistas de un par de sacos aéreos totalmente desarrollados, los cuales aligeran su peso y facilitan su dispersión por medio del viento (Niembro, 1986).

El inicio de primordios florales femeninos ocurre de mediados de agosto a finales de septiembre, dependiendo de la temperatura y precipitación de la zona (Zavala, 1990). Al llegar a la primavera del año siguiente las flores han completado su desarrollo y se encuentran listas para ser polinizadas.

Antes de que tome lugar la polinización los óvulos se encuentran formados por un tejido meristemático llamado nucela, al tiempo de la polinización se comienza a diferenciar en el interior de la nucela una célula llamada megasporocito o célula madre de las megasporas. Tiempo después, la célula madre se divide por meiosis en megasporas haploides de las cuales solo una es funcional y eventualmente irá dando origen al gametofito femenino. La megaspora funcional después de un breve periodo de letargo comienza su actividad con una serie de divisiones nucleares libres, las cuales generalmente ocurren a intervalos regulares; a medida que comienza a entrar en actividad, las células del tejido esponjoso se van transformando en alimento con el objeto de proporcionar la energía necesaria para el crecimiento del gametofito femenino y el continuo aumento en el número de sus núcleos. Como resultado de la digestión del tejido esponjoso y del alargamiento de la nucela, se va formando en el centro del óvulo una vacuola, la cual continuamente aumenta de tamaño.

El gametofito femenino se inicia en el centro del óvulo, el factor más importante que determina la continuación de su crecimiento es el suministro de alimento, es decir, depende de la continua digestión enzimática de la nucela, para lo cual se requiere un suministro de agua adecuado. Cuando ésta es deficiente, ya sea por haberse presentado un retraso por la temporada de lluvias, o bien por una disminución de las mismas, se origina el aborto de una gran cantidad de óvulos.

Al llegar la temporada invernal, el desarrollo del gametofito femenino queda suspendido para reanudarse rápidamente en la primavera siguiente (Niembro, 1986).

2.1.6.2. Polinización

La polinización consiste en la transferencia libre y al azar de las microsporas hacia los óvulos de la flor. En los pinos la polinización es alógama; cuando se realiza autopolinización en una planta alógama se incrementa la frecuencia de homocigosis de genes recesivos, provocando en la progenie problemas como albinismo, depresión en la tasa de crecimiento de las plántulas, así como la producción de gran número de semillas vanas o con embriones mal formados (Niembro, 1986).

El estado de receptividad de polen en la planta dura de 1 a 3 días, al cabo de los cuales las escamas se cierran como resultado de su crecimiento. Los conillos masculinos una vez que han liberado el polen se marchitan. Los óvulos secretan un fluido mucilaginoso que sale a través del canal micropilar, extendiéndose como una película sobre los tegumentos para favorecer la adherencia de los granos de polen que llegan a la flor. Cuando las escamas del conillo se han cerrado, el fluido mucilaginoso o la gota de polinización se reabsorbe a través del canal micropilar, llevando consigo a los granos de polen hasta que quedan adheridos a la superficie de la nucela; los óvulos que no fueron polinizados son abortados.

La gran mayoría de los granos de polen que han entrado a la cámara polínica comienzan a germinar unos cuantos días después, pero únicamente los que sobreviven emiten completamente su tubo polínico. Durante los 11 meses posteriores a la polinización, el gametofito masculino crece muy lentamente. Cada grano de polen produce un tubo polínico muy corto, el cual por lo general se ramifica al penetrar el ápice de la nucela. Al llegar el invierno el tubo polínico suspende su crecimiento para reanudarlo en la primavera del año siguiente (Niembro, 1986).

2.1.6.3. Fertilización

En la primavera del año siguiente a la polinización, los pequeños conillos han aumentado de tamaño debido a que en su interior los óvulos han aumentado de tamaño a consecuencia del crecimiento y desarrollo del gametofito femenino, encontrándose listos para ser fertilizados. Dos semanas antes de la fertilización, algunas células superficiales del gametofito femenino cercanas al extremo micropilar del mismo, se dividen y dan lugar a los arquegonios. Generalmente, la célula del canal ventral de la oosfera se desorganiza antes de que tome lugar la fertilización. El citoplasma del arquegonio está constituido por un gran número de vacuolas, las cuales contienen en su interior nucleoproteínas, proteínas, azúcares y algo de lípidos, que servirán como fuente de alimento al proembrión en sus primeros estadios.

El tubo polínico lentamente sale de su letargo invernal y reinicia su crecimiento a través de las células de la nucela, liberando a su paso una serie de enzimas que van solubilizando y metabolizando las paredes celulares del tejido nucelar con el objeto de facilitar su paso hacia el gametofito femenino y finalmente hacia el arquegonio. Aproximadamente 2 ó 3 semanas antes de que tome lugar la fertilización, el tubo polínico activa su crecimiento y desarrollo penetrando rápidamente a través del tejido nucelar (Niembro, 1986). Durante este tiempo el núcleo de la célula vegetativa se mueve hacia el centro del tubo polínico y la célula generadora se divide dando origen a la célula del pedicelo y a la célula del cuerpo. La célula del cuerpo se divide nuevamente y forma dos gametos masculinos de diferente tamaño, los cuales son soltados hacia el interior del tubo polínico. A mediados de la primavera la punta del tubo polínico ha penetrado entre las células del cuello del arquegonio. Poco tiempo después, la punta se rompe y descarga en el citoplasma del arquegonio a los cuatro núcleos. La fertilización toma lugar cuando el gameto masculino mayor se fusiona con la oosfera. Tiempo después, los tres núcleos restantes se desorganizan y forman parte del alimento para el posterior crecimiento del cigoto. Los óvulos que no fueron fertilizados abortan al poco tiempo.

2.1.6.4. Embriogénesis y desarrollo de semilla

El desarrollo del embrión se inicia con la fertilización de la oosfera por el mayor de los gametos procedentes de los granos de polen (Niembro, 1986). Los tamaños y estructuras de los embriones de las semillas maduras son características importantes para comprender el comportamiento fisiológico durante la germinación, se producen diferencias según el grado en que se desarrolle el embrión en la semilla. La embriogénesis establece el plan básico del cuerpo vegetal y forma los meristemos que generan órganos adicionales en el adulto. La mayor parte del desarrollo vegetal es post embrionario y se produce desde los meristemos (Taiz, 2006).

Durante la elongación las células embrionarias del proembrión se dividen, dando origen a una serie de células llamadas tubos embrionales, después de su formación el extremo apical del embrión se divide para dar origen a cuatro hileras verticales de células cada hilera está formada por una célula apical, las células del embrión, dos o más tubos embrionales y una célula del suspensor. Una vez que el sistema de embriones se ha dividido completamente, se manifiesta entre ellos una intensa competencia la cual trae por resultado que el más agresivo de los 4 embriones se coloque al frente de los demás miembros del grupo para continuar con su crecimiento y desarrollo hasta constituirse en el embrión de la semilla madura. Los embriones restantes generalmente abortan y no pueden ser detectados en la semilla cuando ésta llega a la madurez (Niembro, 1986).

La embriogénesis se produce en el saco embrionario del primordio seminal, mientras que el saco embrionario y las estructuras asociadas darán lugar a la semilla. La embriogénesis y el desarrollo de la semilla son procesos altamente ordenados e integrados. Una vez completados, la semilla y el embrión entran en latencia y son capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en condiciones desfavorables para el crecimiento (Taiz, 2006).

La embriogénesis establece los dos patrones básicos del desarrollo que se mantienen y pueden verse fácilmente en la planta adulta: el patrón del desarrollo del eje apical-basal y el patrón radial de tejidos en los tallos y raíces.

La embriogénesis y el desarrollo de la semilla comprenden los cuatro siguientes procesos:

❖ Desarrollo morfológico

El endospermo se desarrolla en el incremento inicial del tamaño del ovario y del óvulo, sin embargo, permanece pequeño y encierra al embrión en estado globular. Cuando el endospermo ha crecido, el embrión adquiere forma cordada a medida que sus cotiledones empiezan a agrandarse. Una vez que cesa el crecimiento del ovario y óvulo se acelera el aumento en el tamaño del endospermo, quien desempeña una función nutricional para el embrión. A medida que el endospermo crece, digiere el tejido nucelar, a su vez el endospermo es consumido por el embrión en desarrollo.

Diversos agentes ambientales pueden impedir el desarrollo normal del embrión, aunque el fruto mismo continúe desarrollándose. Las condiciones adversas, como las heladas durante el inicio del desarrollo del fruto, a veces matan al embrión, pero el fruto mismo sigue desarrollándose.

❖ Adquisición por el embrión de la capacidad para germinar

El desarrollo morfológico y fisiológico del embrión se denomina embriogénesis. Durante el desarrollo de la semilla ocurre la división y expansión celular en varias partes de la estructura del embrión. En la germinación, la división celular se realiza en los extremos del eje polarizado del embrión, esto es, las puntas de la raíz y del tallo.

Si el embrión se separa en diversas épocas de su desarrollo y se coloca en las condiciones apropiadas de cultivo aséptico, cesa la embriogénesis y el embrión inmaduro muestra germinación precoz. Sin embargo cualquier planta que se desarrolle del mismo tiende a ser normal. Entre mayor haya sido el desarrollo del embrión antes de la separación mayor será su capacidad para germinar normalmente (Hartmann, 1990).

❖ Acumulación de reservas alimenticias

Algunos de los incrementos en el peso seco de la semilla se pueden medir en la primera parte del periodo de desarrollo del fruto debido al aumento de tamaño. Después de que la semilla ha alcanzado su tamaño completo, los aumentos posteriores de peso seco son una medida de acumulación de materiales de reserva en la semilla. La causa principal de falta de alimentos de reserva es la inmadurez de las semillas al cosecharlas.

❖ Desarrollo de controles internos de la germinación

Una vez que el embrión ha alcanzado su capacidad para germinar, se desarrollan mecanismos para impedir la germinación de las semillas en la planta. Los dos medios principales por lo que es impedida, son el control del contenido de humedad y la imposición del letargo.

El control del contenido de humedad es un aspecto importante, tanto la semilla como los frutos se deshidratan de forma natural durante la maduración y diseminación a un contenido de humedad en donde no puede haber germinación.

Durante la maduración se desarrollan controles internos que impiden la germinación y persisten en la semilla durante un periodo posterior a la cosecha, el origen de esos controles de germinación es parte del desarrollo de la semilla. Para imponer el letargo interaccionan dos mecanismos principales: el primero es la acumulación en diferentes tejidos del fruto y de la semilla de inhibidores químicos de crecimiento y el segundo es el desarrollo de cubiertas de la semilla que controlan la absorción de agua, la permeabilidad a los gases y la lixiviación de los inhibidores. Es probable que el inhibidor de ocurrencia natural más importante sea el ácido abscísico, que se acumula en los frutos y semillas durante el desarrollo y está asociado con la maduración. Es posible que el control de la germinación implique interacciones de sustancias inhibitoras y estimulantes.

Las cubiertas de las semillas desempeñan un papel crucial en el control de la germinación. Las fases morfológicas para esos efectos se establecen durante la fase tardía de la maduración. Las cubiertas se originan principalmente de la capa externa de los tegumentos, la cual se vuelve dura, fibrosa o mucilaginoso durante el periodo de maduración y deshidratación. Estas capas fisiológicamente activas desempeñan una función vital en el mantenimiento del letargo primario debido a que esa naturaleza semipermeable restringe los movimientos de aireación y de los inhibidores (Taiz, 2006).

2.1.6.5. Características de la semilla de pino

La semilla de *Pinus cembroides* tiene un tamaño de 15 milímetros (Martínez, 1945), la testa es leñosa, hacia su interior esta revestida por una capa membranosa y traslúcida llamada tegmen, que protege directamente a la almendra, la cual está constituida por un albumen grasoso, a

veces impregnado de sustancia resinosa. El embrión está colocado longitudinalmente en el centro. (Figura 2)

El poder germinativo en condiciones favorables puede durar varios años, pero para la propagación conviene usar semillas recientes que se hayan conservado estratificadas en arena (Martínez, 1945).



Figura 2. Semilla de Pino (Hartmann, 1990)

2.2. Germinación

2.2.1. Definición

La germinación de la semilla se puede definir como una recuperación del crecimiento del embrión y depende de las mismas condiciones ambientales de las que depende el crecimiento vegetativo. Deben tener agua y oxígeno disponibles, temperatura adecuada y ausencia de sustancias inhibitoras (Taíz, 2006). El término germinación incluye secuencias de procesos complejos que conducen a la iniciación del crecimiento en el embrión en reposo, el desarrollo de la plántula y la emergencia de la tierra (Benech, 2004).

2.2.2. Características generales

En el ciclo de vida de las plantas, la germinación y el establecimiento del cultivo son las más vulnerables. La germinación es muy importante para el productor siempre que tiene relación con la propagación de plantas por medio de semillas, pues éste es uno de los métodos principales de reproducción de las plantas en la naturaleza y uno de los más eficientes y utilizados en la propagación de plantas cultivadas. La siembra de la semilla es el inicio físico de la propagación de plántulas (Hartmann, 1990).

La germinación incorpora aquellos eventos que se inician con la absorción de agua por la semilla seca y terminan con la elongación del eje embrionario. El proceso concluye cuando la radícula penetra y atraviesa las estructuras que rodean al embrión (Herrera, 2006).

La germinación de *Pinus cembroides* es epígea, es decir los cotiledones se desarrollan sobre la superficie del suelo debido a la elongación del hipocótilo, el cual surge empujando los restos de la envoltura de las semillas. Cuando ésta se desprende aparecen las hojas cotiledonales. La germinación se inicia de 9 a 22 días después de la siembra y se requiere de 35 a 42 días para la germinación total (Salazar, 2001).

2.2.3. Fases o etapas

En 1957, Evenari dividió el proceso de germinación en tres fases (Herrera, 2006). En la fase I ocurre la imbibición, en la fase II se produce la activación del metabolismo y finalmente en la fase III tiene lugar la emergencia de la radícula.

Fase I. Imbibición del agua.

La imbibición consiste en la entrada de agua a la semilla, administrada por el gradiente o la diferencia de potenciales hídricos dentro y fuera de ésta. Cuando la semilla seca absorbe agua, en un principio el contenido de humedad se incrementa con rapidez, luego se

estabiliza por lo que una curva de absorción de agua por semillas secas tiene 3 partes: a) una absorción inicial rápida, que en su mayor parte es de imbibición, b) un periodo lento o fase estacionaria y c) un segundo incremento rápido a medida que emerge la radícula y se desarrolla la plántula (Figura 3).

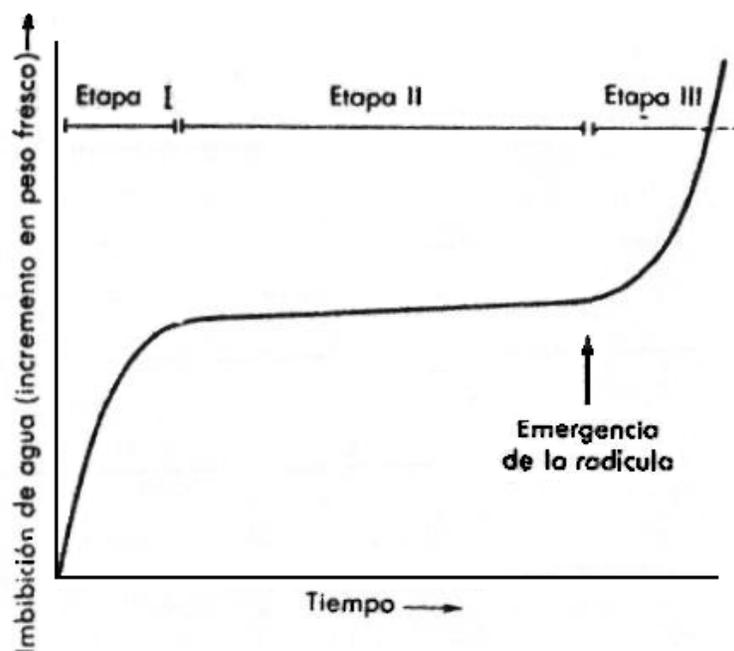


Figura 3. Curva de absorción de agua por una semilla seca. Tomado de Hartmman (1990).

Al absorber agua se hincha y es posible que se rompan las cubiertas. La imbibición es un fenómeno físico y puede efectuarse aun en semillas muertas. La rehidratación permite que las enzimas y estructuras presentes en la semilla deshidratada, se reactiven, esto resulta en parte de la reactivación de enzimas previamente almacenadas que se formaron durante el desarrollo del embrión y en parte de la síntesis de nuevas enzimas al comenzar la germinación. La actividad de las enzimas empieza muy rápidamente después del inicio de la germinación, a medida que se hidrata la semilla, requiere de moléculas de ARN que están presentes en el eje del embrión.

Fase II. Activación del metabolismo

Durante esta fase ocurre la síntesis a partir de las reservas disponibles de nuevas estructuras y compuestos necesarios para las siguientes fases del desarrollo.

Para el caso de las coníferas, como lo es el *Pinus cembroides*, en el gametofito femenino se almacenan grasas, proteínas y carbohidratos. Estos compuestos son digeridos a sustancias más simples, que son traslocadas a los puntos de crecimiento del eje embrionario. Las grasas y los aceites, los principales constituyentes de alimentación en la mayoría de las plantas superiores, son convertidos enzimáticamente en ácidos grasos y al final en azúcares. Los patrones metabólicos que ocurren durante la geminación implican la activación de enzimas específicas en la secuencia apropiada y la regulación de su actividad. La absorción de agua y la respiración continúan con una tasa constante. Los sistemas celulares existentes han sido activados y el sistema de síntesis de proteínas está funcionando para producir nuevas enzimas, materiales estructurales, compuestos reguladores y ácidos nucleicos para realizar las funciones de la célula y sintetizar nuevos materiales.

Previo a la aparición de la radícula, se producen cambios para realizar la elongación y división celular. En general, los genes que codifican para el proceso de elongación tienden a ser activados en forma temprana en relación con la división celular (Herrera, 2006).

Fase III. Crecimiento de la radícula

El desarrollo de la plántula resulta de la división celular continuada en puntos de crecimiento separados del eje embrionario, seguido de la expansión de sus estructuras. La tasa de respiración medida por la absorción de oxígeno aumenta constantemente con el progreso del crecimiento. La absorción del agua aumenta en forma constante a medida que las nuevas raíces exploran el medio de germinación y el peso fresco de la plántula aumenta (Hartmann, 1990). A medida que avanza la germinación se vuelven evidentes las estructuras de la plántula. La radícula es el punto de crecimiento de la raíz, ésta emerge de la base del eje embrionario y resulta de la elongación de las células más que de la división celular.

Con la penetración de las envolturas de la semilla por parte de la radícula, se marca el final del proceso de germinación y el inicio del crecimiento de la plántula (Herrera, 2006).

2.2.4. Evaluación del proceso germinativo

La germinación se mide con dos parámetros: el porcentaje de germinación y la tasa de germinación. Estas medidas pueden indicar vigor, pero también hay que considerar la tasa de crecimiento de las plántulas y su aspecto morfológico. A veces de las semillas de baja calidad resultan plántulas de crecimiento anormal (Hartmann, 1990).

El porcentaje bajo de germinación, la tasa baja de germinación y el vigor reducido con frecuencia están asociados. La baja germinación puede deberse a las propiedades genéticas de ciertas cultivares, desarrollo incompleto en la planta, daños durante la cosecha, procesamiento inadecuado, almacenamiento impropio, enfermedades y envejecimiento de la semilla (Hartmann, 1990).

Los valores del porcentaje de germinación deben implicar un elemento de tiempo, indicando el número de plantas producido en un lapso específico.

Si se mide la secuencia cronológica de la germinación de un lote dado de semillas, o de la emergencia de plántulas en un almácigo, de ordinario se encuentra un patrón de germinación similar a la curva de germinación, en donde hay una demora inicial en el comienzo de la germinación, luego un incremento rápido en el número de semillas que germinan, seguido por una disminución en la tasa de aparición.

Una medida para las semillas de leñosas perenes cuya germinación puede ser lenta es el valor de germinación (VG), que incluye tanto la tasa como el porcentaje de germinación. Para calcular el valor VG se debe obtener una curva de germinación mediante conteos periódicos de la emergencia de las plúmulas o de las radículas. El valor germinativo se puede obtener con la siguiente fórmula:

$$VG = PV \times MDG$$

En donde:

VG = Valor Germinativo

PV (valor pico) = es el porcentaje de germinación en el punto en que la tasa de germinación empieza a disminuir, dividido entre un número de días necesarios para llegar a ese punto.

MDG (germinación media diaria) = porcentaje de germinación final dividido entre el número de días que las semillas estuvieron en prueba.

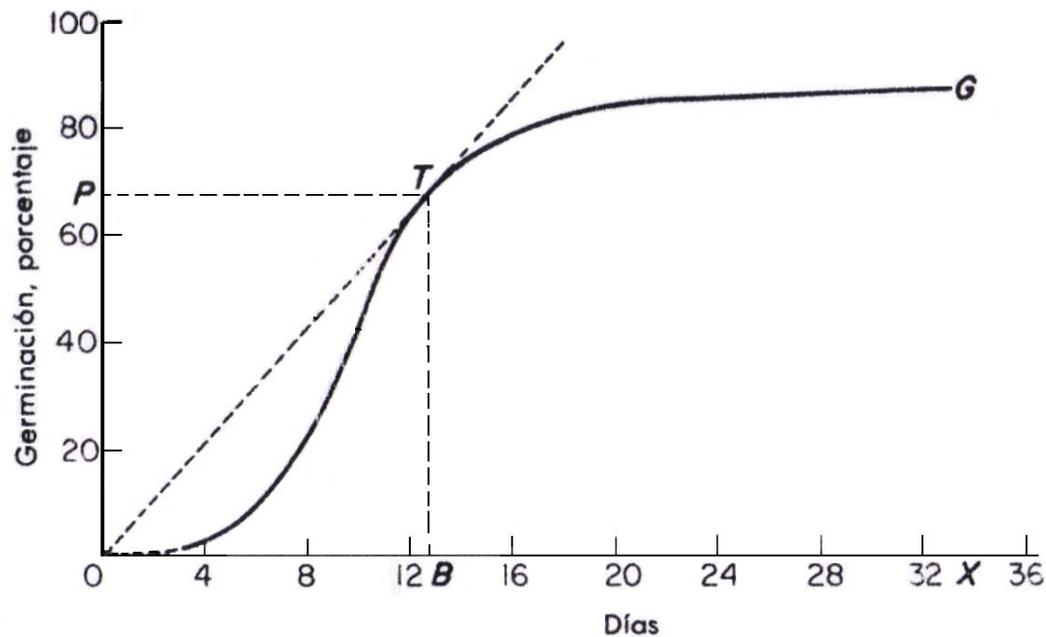


Figura 4. Curva de germinación típica de una muestra de semillas en germinación. En donde G= porcentaje de germinación final, en un determinado número de días (X); T= punto en que la tasa de germinación empieza a disminuir, que corresponde a un determinado porcentaje (P) al número de días para llegar a éste (B). Tomado de Hartmann (1990).

Una curva de germinación típica es como la que muestra la figura 4, en donde los puntos importantes de la curva son: T, el punto en el que la tasa de germinación empieza a disminuir y G, el porcentaje de germinación final. Estos puntos dividen a la curva en dos fases, una rápida y una lenta.

Los porcentajes de germinación registrados en *Pinus cembroides* varían, según Batis(1999) de 60 a 90%, Cetina (1984) reporta un 56%, Cantero (1996) un 49.82% y 59.82%, Sánchez (2005) un 48%.

2.2.5. Requerimientos para la germinación

2.2.5.1. Exógenos

- Agua.

El agua es el componente químico más abundante en las plantas. Normalmente entre los tejidos activos alcanza valores entre el 80 y el 95% en peso. En cambio en los órganos en dormición o quiescencia su descenso es un mecanismo central en la regulación de su inactividad (Barceló, 2007). Es por eso que la absorción de agua por las semillas es un requisito previo a una germinación adecuada. El flujo del agua del suelo en la semilla se debe a una diferencia del potencial de agua entre la semilla y el suelo, éste es controlado por la conductividad del suelo al agua (Benech, 2004). El potencial hídrico de una semilla seca es muy bajo comparado con el potencial del suelo, es por eso que la semilla tiene una gran capacidad de absorción de agua durante la imbibición, esta capacidad de absorción varía con la naturaleza de la semilla y la permeabilidad de las cubiertas, pero la absorción depende también de la disponibilidad de agua en el medio circundante. La fuerza que conduce el gradiente potencial del agua, se define como $(\Delta\psi = \psi_{\text{semilla}} - \psi_{\text{suelo}}) / \text{distancia}$, es muy grande con el inicio de la imbibición y decrece a medida que la semilla embebida alcanza el nivel de hidratación necesario (Benech, 2004). Con menos del 40 o 60 % de agua en la semilla, con base en peso fresco, no se efectúa la germinación (Viémont, 2000). Las especies y cultivares pueden diferir notablemente en sus necesidades de agua para la germinación, estas diferencias se atribuyen a los diferentes regímenes de agua en el suelo a los que se adaptaron y las diferencias físicas del suelo encontradas durante la germinación. Una vez que la semilla germina y emerge la radícula, la provisión de agua de la plántula depende del sistema radical para crecer en el medio de germinación y de la capacidad de las nuevas raíces para absorber agua.

La cantidad de humedad proporcionada a la raíz en imbibición antes de que salga la radícula es de particular importancia ya que puede afectar tanto el porcentaje como la tasa de germinación.

El mantenimiento de una provisión de humedad adecuada y continua a la semilla puede resultar difícil ya que la germinación se efectúa en la capa superior del medio de germinación, que está expuesta a fluctuaciones de humedad y a pérdidas rápidas de la misma.

En ocasiones, antes de la siembra se remojan las semillas para acelerar su germinación y superar ciertos problemas de letargo. Las semillas leñosas pueden ser lixiviadas por periodos más largos sin sufrir daños, aunque el exceso de agua puede ser atrapado entre los cotiledones y sofocar al embrión. Los resultados más perjudiciales se han atribuido a los efectos de microorganismos y a una reducción de la provisión de oxígeno. Si el remojo va a prolongarse el agua debe cambiarse cuando menos cada 24 hrs. Todas las semillas requieren de la humedad suficiente para la imbibición y germinación.

- Temperatura.

La temperatura es tal vez el factor ambiental más importante que regula la germinación y controla el crecimiento subsecuente de las plántulas. Las semillas secas que no han iniciado la imbibición pueden soportar temperaturas extremosas; es posible colocar las semillas en agua hirviendo durante cortos periodos sin perjudicarlas.

La temperatura afecta tanto el porcentaje como la tasa de germinación. A temperaturas bajas la tasa de germinación tiende a disminuir, pero aumenta paralelamente con la elevación de la temperatura, en forma similar a la curva de una reacción química.

Para la germinación de las semillas por lo regular se definen 3 puntos de temperatura: mínima, óptima y máxima. La temperatura mínima es aquella más baja para una germinación efectiva; la máxima es la temperatura más elevada en la que puede ocurrir la germinación. La temperatura óptima para la germinación queda en el rango en el que se obtiene mayor porcentaje de plántulas con la tasa más elevada. Para las semillas de la mayoría de las plantas que no están en letargo la temperatura óptima es de 25 a 30 ° C. Las semillas de las diferentes especies pueden ser divididas en los grupos a continuación mencionados de acuerdo a cuatro grupos de requerimientos de temperatura (Hartmann, 1990).

- Tolerantes de bajas temperaturas. Las semillas de muchas especies de plantas, en su mayor parte nativas de zonas templadas germinan desde 4.5°C hasta el límite letal de 30° a 40°C.

- Que necesitan temperaturas bajas. Las semillas de algunas plantas de estación fría requieren temperaturas bajas y no germinan a temperaturas más elevadas que alrededor de 25°C.
- Con requerimientos de temperaturas elevadas. Las semillas de otro amplio grupo de especies, originadas principalmente en regiones tropicales o subtropicales, tienen un requerimiento mínimo de germinación de alrededor de 10°C. La exposición de las semillas a temperaturas de 10° a 15° durante la imbibición inicial, como puede ocurrir si se siembra en suelo frío puede dañar el eje embrionario y conducir a la producción de plántulas anormales, el daño por las bajas temperaturas es mayor si las semillas están muy secas al inicio de la imbibición o si la provisión de oxígeno es limitada.
- Temperaturas alternadas. Las temperaturas fluctuantes del día y de la noche producen buena germinación como plantas mejor desarrolladas que las expuestas a temperaturas constantes. El uso de temperaturas fluctuantes es una práctica estándar en los laboratorios de semillas, aun para semillas que no lo requieren.

La temperatura óptima puede desplazarse después del inicio de la germinación ya que las plántulas tienden a tener requerimientos de temperaturas diferentes a aquellos de la germinación de las semillas.

- Disponibilidad de oxígeno.

El oxígeno (O_2) es esencial para el proceso de respiración de las semillas en germinación. La absorción del oxígeno puede medirse poco después de que se inicie la absorción de agua. La tasa de absorción de oxígeno es un indicador del avance de la germinación y se ha sugerido como una medida del vigor de las semillas. En general la absorción de O_2 es proporcional a la cantidad de actividad metabólica que se esté efectuando.

La provisión de oxígeno al embrión puede estar limitada por las condiciones del medio del suelo o por restricciones impuestas por las cubiertas de las semillas, en donde hay un exceso de agua en el medio del suelo la provisión de oxígeno es escasa.

El bióxido de carbono (CO_2) es un producto de la respiración y en condiciones de mala aireación puede acumularse en el suelo e inhibir la germinación en cierto grado.

- Luz

Desde la mitad del siglo XIX se ha sabido que la luz puede afectar la germinación de las semillas de ciertas especies. El mecanismo básico de la sensibilidad en las semillas a la luz implica un pigmento llamado fitocromo, ampliamente presente en las plantas.

El fitocromo es una cromoproteína de las plantas, se compone de una proteína y un grupo no proteico llamado cromóforo o pigmento. Se presenta en dos conformaciones fisiológicas: fitocromo rojo (P_r) y fitocromo rojo lejano (P_{fr}). Para que puedan ejercer su función, estas dos conformaciones fisiológicas deben encontrarse en equilibrio dinámico.

El fitocromo se descubrió en estudios de germinación de lechuga dependiente de luz, lo que indica que en algunas semillas la calidad de la luz juega un papel importante en la regulación de su germinación. En general las especies de semillas grandes con amplias reservas permiten mantener el crecimiento prolongado de las plántulas en oscuridad, es decir, bajo el suelo, y generalmente no necesitan luz para germinar. Sin embargo, este requerimiento se observa frecuentemente en plantas de especies herbáceas (Taiz, 2006).

2.2.5.2. Endógenos

En muchos casos la semilla viable no germina, este fenómeno se denomina dormición o dormancia de semilla. La dormancia es un estado fisiológico que reduce la habilidad de una semilla o brote para germinar o crecer (Khan, 1997). En español se han usado las palabras dormancia, dormición, latencia, letargo, reposo y vida latente, para referirse a la ausencia o inhibición del crecimiento vegetal y en particular de la germinación (Camacho, 1994).

Según sea el factor responsable para inducir la latencia, ésta puede ser interna o externa, según Bradbeer (1992) los mecanismos de latencia se pueden encontrar en dos diferentes sitios: en la cubierta del embrión y en el propio embrión (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales mecanismos identificados en latencia de semillas

A. Latencia causada por las cubiertas del embrión (pericarpio, testa, perispermo y endospermo).
1. Restricción del intercambio gaseoso
2. Restricción del consumo de agua
3. Resistencia mecánica del crecimiento del embrión.
4. Inhibidores solubles en agua en los revestimientos del embrión
5. Latencia ocasionada por falta de reservas en el embrión
B. Latencia del embrión
1. Embriones subdesarrollados
2. Bloqueo de ácido nucleico y síntesis de proteínas
3. Falta de reservas movilizadas al embrión
4. Deficiencia de sustancias para el crecimiento de la planta.
5. Presencia de inhibidores

Debido a que cada autor ha retomado el significado de dormancia de acuerdo al trabajo presentado, existen diversos términos con significados diferentes impidiendo que se logre una clasificación universal de la latencia o dormancia, creando cierta confusión en los términos (Lang, 1987). La dormancia está controlada por:

1. Factores que residen en el embrión o el brote, también denominada endodormancia o dormancia primaria, usada cuando la reacción inicial que conlleva al control del crecimiento es debido a una señal endógena de la estructura afectada, Bariogilio (2006) en su Diccionario de las Ciencias Agropecuarias define la endolatencia como el tipo de latencia que consiste en la incapacidad de la propia estructura para crecer aunque las condiciones ambientales sean favorables para el incremento. En el caso de la semilla reside en el embrión y se manifiesta incluso cuando éste es separado de las restantes estructuras que lo rodean. Requiere frío para su desaparición.
2. Factores situados fuera del embrión tal como las estructuras de cubierta o brote terminal, el cual puede ejercer una inhibición mecánica, química o correlativa; a ésta se le denomina paradormancia e involucra señales bioquímicas específicas originadas en cualquier otra estructura que la estructura afectada que llevará a la reacción inicial para perder la dormancia. Esta señal puede tener origen ambiental o factores morfogénicos producidos en órganos cercanos (Lang, 1987).

3. Factores ambientales, se le nombra ecodormancia a la ausencia de factores ambientales únicamente necesarios para el desarrollo de las plantas, como son altas temperaturas, desfavorable radiación o fotoperiodo, bajo potencial hídrico en el medio de crecimiento o la aplicación de inhibidores químicos.

Se puede afirmar que existe latencia en poblaciones de semillas cuya germinación tenga una o más de las siguientes características:

- a) Germinación incompleta, ya que parte de la población permanece firme mucho tiempo, o sea, se embebe pero no germina ni se pudre, o bien, permanece dura, es decir, ni siquiera se embebe.
- b) Germinación lenta debido a que las semillas (individualmente o en conjunto) tardan en completar su germinación.
- c) Extremadamente sensible al medio, ya que para realizarse requiere determinadas condiciones de iluminación, temperatura o composición de la atmósfera, entre otros factores.

La dormición retrasa el proceso de germinación y proporciona a la semilla un tiempo adicional para que pueda dispersarse a grandes distancias. Preserva la viabilidad de las semillas porque permite que la germinación no se realice de forma indiscriminada y que las mismas plantas la programen al disponer de un banco permanente de semillas viables en el suelo, dispuestas a germinar cuando el ambiente sea propicio; siempre y cuando se den tres condiciones internas:

- ❖ Primera. La semilla debe ser viable; esto es que el embrión debe estar vivo y ser capaz de germinar.
- ❖ Segunda. La semilla no debe estar en letargo y el embrión debe estar quiescente. No deben existir barreras fisiológicas o físicas que induzcan letargo ni barreras químicas para la germinación.
- ❖ Tercera. La semilla debe estar expuesta a las condiciones ambientales apropiadas: disponibilidad de agua, temperatura adecuada, provisión de oxígeno y en ocasiones luz.

2.3. Pruebas de viabilidad

La viabilidad se refiere a la capacidad de las semillas para germinar y producir una nueva planta (Amarjit, 2006). También puede expresarse como el porcentaje de germinación que indica el número de plantas producido por un número dado de semillas (Hartmann, 1990). La prueba de viabilidad es un elemento importante de la calidad de la semilla; para que una semilla pueda germinar, crecer, desarrollar una nueva planta y completar el ciclo de vida, tiene que ser viable, es decir, estar viva. Sin embargo, es difícil determinar si la semilla está viva o muerta observando únicamente su apariencia física. Dos semillas pueden parecer iguales si tienen el mismo tamaño, forma y color, sin embargo, una de ellas puede estar viva y la otra muerta. La semilla muerta o en proceso de muerte se caracteriza por una declinación gradual del vigor y en áreas localizadas pueden aparecer necrosis o lesiones. Muchos factores contribuyen a la pérdida de viabilidad de la semilla incluyendo los siguientes:

1. Las condiciones climáticas durante la maduración de semillas: las condiciones de estrés, la sequía, el exceso de agua y temperaturas extremas contribuyen a la pérdida de capacidad de germinación de semillas.
2. Deficiencia de nutrientes y lesiones provocadas por plaguicidas durante la maduración y el desarrollo de semillas.
3. Las condiciones ambientales después de la madurez fisiológica, durante la cosecha, la limpieza, el secado, el almacenamiento y la manipulación. Las condiciones adversas durante este período, tales como fuertes lluvias o heladas pueden afectar la viabilidad de la semilla, también el almacenamiento inadecuado conduce a un deterioro en la semilla y a la pérdida de la viabilidad.

En la propagación exitosa por semillas es esencial tener un método para juzgar la viabilidad. Ésta puede determinarse por varias pruebas, entre las más importantes se encuentran la de la germinación directa, la de el embrión separado y la de cloruro 2, 3, 5 trifeníl tetrazolio (Hartmann, 1990). De éstas las dos más utilizadas por los laboratorios son: la prueba de germinación y la de cloruro 2, 3, 5 trifeníl tetrazolio (Amarjit, 2006).

- Pruebas de germinación directa

Es una prueba de germinación estándar, las semillas se colocan en condiciones de luz y temperatura para inducir la germinación. Las condiciones requeridas para llenar los requisitos legales se especifican en las normas de ensaye de semillas, las cuales pueden incluir tipo de prueba, condiciones ambientales y duración de la prueba.

En los laboratorios para ensaye de semillas se emplean varias técnicas para germinar las semillas. Cuando son semillas pequeñas se colocan en charolas de germinación, cajas de plástico, de cartón encerado o las de petri cubiertas. El papel absorbente se corta en dos partes pequeñas y las semillas se colocan encima o entre dos capas. Otros medios para la germinación son el algodón absorbente, toallas de papel, papel filtro y, para semillas grandes, arena, vermiculita, perlita o tierra (16mm). Los recipientes se colocan en condiciones especiales en las cuales se controlan temperatura, humedad y luz (Moreno, 1996). En la prueba de germinación directa el porcentaje de germinación se determina por la cantidad de plántulas normales producidas por la semilla pura de la clase que se examina.

Una prueba de germinación de ordinario dura de una a cuatro semanas, pero en semillas de árboles, de baja germinación y con letargo, puede durar hasta unos tres meses. A menudo las semillas de árboles y de arbustos requieren que antes de efectuar la prueba de germinación se les someta a tratamientos de pregerminación especiales (Hartmann, 1990).

- Prueba con embriones aislados

La prueba con embriones separados se aplica para determinar la viabilidad de semillas de árboles y arbustos leñosos cuyos embriones necesitan largos periodos de postmaduración antes de que pueda efectuarse la verdadera germinación. En esta prueba se separa al embrión de la semilla y se le hace germinar solo. Las semillas se remojan de uno a cuatro días, hasta que están hinchadas por completo, con alguno de los siguientes métodos: a) en agua que corra lentamente; b) en agua en reposo a menos de 15°C; o en c) en agua en reposo a 20°C haciendo cuando menos dos cambios al día. Cuando existan cubiertas duras, éstas deben quitarse

primero. Las cubiertas humedecidas de las semillas se cortan con un escarpelo, una hoja de afeitar o una navaja afilada, en condiciones de limpieza.

Los procedimientos para poner a germinar los embriones separados son similares a los que se utilizan para semillas intactas, utilizando cajas de Petri con un substrato húmedo, como papel secante o papel filtro. Los embriones se colocan sobre el papel filtro de manera que no se toquen. El tiempo necesario para la prueba varía de tres días a tres semanas.

- Prueba con cloruro 2, 3, 5-trifenil tetrazolio

La prueba con cloruro 2, 3, 5 trifenil tetrazolio es un método bioquímico ampliamente utilizado para medir la viabilidad de las semillas, fue desarrollada por el científico alemán George Lakon en la década de 1940 (Amarjit, 2006) para distinguir entre los tejidos viables y muertos de embriones de semillas sobre la base de la actividad de la enzima deshidrogenasa en la cual la viabilidad de las semillas se determina por el color rojo que aparece cuando la semilla se remoja en una solución de cloruro 2, 3,5-trifenil tetrazolio. Los tejidos vivos cambian el trifenil tetrazolio a un compuesto insoluble rojo químicamente conocido como formazán. En los tejidos no vivos el trifenil tetrazolio permanece incoloro, la reacción se efectúa igualmente bien en semillas que estén en letargo que en las que no lo estén. Los resultados pueden obtenerse dentro de un plazo de 24 hrs, a veces en 2 o en 3 horas. Por lo común se usa una solución de 0.1 a 1% de concentración, el pH debe de ser de 6.5 a 7.5 (Moreno, 1996), ó 6 a 7 (Hartmann, 1990).

La prueba distingue en una semilla individual los tejidos vivos y no vivos y puede indicar debilidad antes que la germinación se efectúe. La principal ventaja de esta prueba es la rapidez de la ejecución y obtención de resultados. A pesar de esas ventajas verificadas en su uso no debe ser considerado un sustituto de la prueba de germinación, pues sus resultados no caracterizan anomalías y otros disturbios en las plántulas, la presencia de microorganismos y la latencia o dormancia en semillas.

Los porcentajes de viabilidad obtenidos en la prueba de tetrazolio son los porcentajes de germinación que se esperan cuando el lote es germinado bajo condiciones muy favorables, dentro de éstas se incluye el uso de fungicidas adecuados. Las diferencias entre las pruebas de germinación y tetrazolio pueden deberse a varias razones como: diferencias en la muestra,

pruebas de germinación en condiciones impropias y técnica inadecuada para realizar la prueba de tetrazolio.

La prueba de tetrazolio no diferencia entre semillas latentes y no latentes, la variabilidad en cantidad de semillas duras, presencia de hongos y daños químicos (Moreno, 1996). La interpretación de los resultados depende de la clase de semilla y de su estructura morfológica. En las coníferas debe teñirse tanto el gametofito femenino como el embrión.

Se han desarrollado otras pruebas para viabilidad de las semillas utilizando agentes de contraste, como soluciones de ciertas sales o metales pesados haciendo después una radiografía. Las radiografías de las semillas se pueden usar como una prueba rápida del buen estado de las mismas. No miden la viabilidad de las semillas pero proporcionan una imagen interna que permite examinarlas respecto a disturbios mecánicos, ausencia de tejidos vitales como el embrión o el endospermo, infestación de insectos, cubiertas agrietadas o quebradas y encogimiento de tejidos internos.

Se han desarrollado otras pruebas para determinar viabilidad en semillas forestales como evaluación mediante el pH, pruebas basadas en rayos X y pruebas con índigo-carmín (Moreno, 2001).

2.4. Referencias asociadas a la germinación de semillas

El conocimiento de las técnicas apropiadas para recolectar, procesar y germinar las semillas de las especies forestales, es importante para contribuir de manera positiva con los proyectos de reforestación, de conservación de las especies y su diversidad genética. Existen grandes diferencias entre las semillas de las diversas especies en cuanto a su respuesta a las técnicas de manejo, almacenamiento y germinación. Esto requiere realizar las investigaciones que permitan conocer con certeza, cuáles son los métodos de manejo más apropiados para las semillas de cada especie y así asegurar su viabilidad y la obtención de altos porcentajes de germinación (Salazar, 2001).

Frecuentemente las semillas sometidas a estratificación contienen inhibidores y promotores del crecimiento por lo que al aplicar un tratamiento se altera el balance inhibidor-promotor que controlaba este tipo de latencia. Se encontró que en el embrión de *Juglans regia* descendió la cantidad de un inhibidor cuando fue sometido a estratificación, por lo cual se ha considerado como un tratamiento altamente efectivo para semillas de cedro negro. También reportaron que las semillas sembradas sin estratificación presentan plantas atípicas (Taiz, 2006).

Ruano (1998) determinó la calidad física de las semillas de cuatro especies de pino, en sus pruebas de germinación obtuvo un 94.8% en *Pinus pseudostrobus*, un 74 y 53% en *Pinus tecunumanii*, porcentajes de 67.8% y 68.8% para *Pinus oocarpa* y 46.8 y 53.5 para *Pinus maximinoi*. En donde determino que el porcentaje de germinación dependía del lugar en donde se colectaron las semillas, además se evaluó la energía germinativa, pureza, viabilidad y número de semillas por kilogramo, en donde menciona que una desventaja cuando el porcentaje de germinación es bajo es que se tiene que adquirir mayor cantidad de semillas de una especie para cubrir un área determinada.

Además de las formas tradicionales de propagación de plantas, vía semillas o estacas, la micropropagación *in vitro* es una herramienta que se ha utilizado años atrás, la primera gimnosperma generada mediante cultivo de tejidos fue *Pinus palustris* en 1975 a partir de embriones (Roca y Mroginski, 1991). Con posterioridad a estas investigaciones se han publicado diversos trabajos que señalan la regeneración de plantas por sistemas similares. La regeneración de plantas en especies forestales vía embriogénesis somática y organogénesis está progresando. Los inóculos comúnmente usados para promover la regeneración de coníferas son ricos en almidón, como cotiledones, hipocótilos y embriones (Roca y Mroginski, 1991). Se ha obtenido la regeneración de órganos y embriones a partir de semilla en *Abies alba*, *A. fraseri* y *P. radiata*. En coníferas la principal fuente de inóculo para la producción de callos son embriones aislados de semilla, pero en *Abies religiosa* no son un buen inóculo (Álvarez, 2008).

En la silvicultura mundial, la aplicación de las técnicas de micropropagación en especies forestales de uso maderable ha constituido una alternativa muy útil para aumentar el número de plantas requeridas para el establecimiento de plantaciones en los programas de propagación masiva, protección y aprovechamiento (Shuler, 2005). En Chile, la propagación de embriones

maduros ha sido utilizada para propagar *Pinus radiata* (Sánchez, 2008), y *Nothofagus procera* (Sánchez, 2004).

2.5. Tratamientos pregerminativos

En la naturaleza, para que se realice la germinación de las semillas en letargo, ocurren diversos agentes ambientales que ocasionan el desgaste de las cubiertas, incluyendo la abrasión mecánica, la alteración del hielo y deshielo, el ataque por microorganismos del suelo, el paso por el tracto digestivo de aves o mamíferos o por el fuego y el ablandamiento de cubiertas por bacterias y hongos, entre otros. El motivo por el que las semillas presentan letargo es para preservarse, regulando la germinación de manera que coincida con períodos del año en que las condiciones naturales son favorables para la supervivencia de las plántulas.

Para la producción de plantas que nacen de semillas con letargo, es necesario que se eliminen los mecanismos que inhiben la germinación debido a que las semillas durmientes no permiten aprovechar al máximo la capacidad germinativa de los lotes y dificultan las labores de cultivo debido a lo lento e incompleto de su germinación. El principal problema agronómico que se tiene con las semillas durmientes es la elección del mejor tratamiento pregerminativo con el fin de:

- Aprovechar al máximo la capacidad de un lote para obtener plantas productivas.
- Lograr una germinación rápida, completa y uniforme que facilite las labores y ayude al establecimiento del cultivo.
- Disminuir la magnitud de la contaminación en suelos agrícolas con semillas de malezas y plantas parásitas, al inducir su germinación para poder destruir las plantas resultantes por medios mecánicos y químicos.

Los tratamientos pregerminativos son la aplicación de procedimientos y el manejo apropiado de las semillas con el objetivo de estimular su germinación, se aplican en función del

mecanismo causante de dormición en la semilla. Entre los tratamientos conocidos se encuentran:

Cuadro 2 Tipos de estratificación.

<p>Estratificación: Es un método de tratamiento de semillas en letargo en el cual las semillas embebidas de agua son sometidas a un periodo de enfriamiento para que se efectúe la postmaduración del embrión. El término se originó debido a que los viveristas colocaban las semillas en capas intercaladas en un medio húmedo, como tierra o arena, durante el invierno (Hartmann 1990). La expresión <i>enfriamiento en húmedo</i> se ha usado como sinónimo de estratificación. La temperatura usual utilizada es de 0 a 10°C y el tiempo depende de la especie.</p>		
Tipo	Descripción	Desventaja/ventaja
Directa	Plantar a la intemperie directamente en almácigo, cama fría o surcos en épocas que proporcionan las condiciones para la post maduración.	Es a largo plazo y se deben cuidar de plagas y predadores.
Refrigerada	<ul style="list-style-type: none"> • Con sustrato: La semilla se mezcla con un medio que retenga humedad y se coloca en bandejas que permitan aireación y drenaje. • Sin sustrato: las semillas remojadas se colocan en bolsas de polietileno. Se cambian las bolsas semanalmente para airear las semillas 	<p>Sembrar inmediatamente por que quedan embebidas. La temperatura debe permanecer constante. (Cockrell, 2000)</p>

Cuadro 3. Tipos de escarificación

<p>Escarificación: Proceso de romper, rayar, alterar mecánicamente o ablandar las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases (Hartmann 1990).</p>		
Tipo	Descripción	Desventaja/ventaja
Mecánica	Lijar, o quebrar las cubiertas sin dañar la semilla.	Son más susceptibles a patógenos.
Térmica	<ul style="list-style-type: none"> • Agua caliente: Sumergir las semillas en agua caliente (77-100°C) • Temperaturas elevadas: Quemado de los frutos¹. 	<p>Sembrar terminando el tratamiento.</p> <p>Puede reducir la tasa de germinación.</p>
Productos cáusticos	Las semillas secas se cubren con ácido sulfúrico concentrado en una proporción de semilla-ácido 1:2, de 10 min a 6 horas dependiendo la especie. Al término lavar con abundante agua y un poco de bicarbonato de sodio.	Se requiere cuidado al manipular
Cálida	Se conservan las semillas en un medio no estéril, cálido-húmedo, durante algunos meses para que los microorganismos ablanden las cubiertas de las semillas	<p>Control de la temperatura</p> <p>Requiere tiempo</p>

¹En algunas plantas nativas las cubiertas de las semillas son modificadas en el incendio del bosque o pastizal, germinando después de este.

Cuadro 4. Diferentes tratamientos pregerminativos.

Tipo	Descripción	Desventaja/ventaja
Cosecha de frutos inmaduros.	Extracción de las semillas del fruto inmaduro impidiendo el desarrollo de cubiertas duras.	Las semillas se deben plantar de inmediato sin secarlas.
Fermentación	Poner las semillas en estiércol y dejar fermentar durante varios días provocando la descomposición de las cubiertas.	Los resultados varían debido a que no se tiene control de todos los factores.
Intemperización	Se pretende debilitar la cubierta dura por las tensiones provocadas por el humedecimiento y pérdida de humedad. Se puede llegar a abrir el endocarpio además de lixiviar los inhibidores. Se pueden dejar las semillas expuestas al sol y a la lluvia o provocarlo de manera artificial en el laboratorio.	Cuando se realiza a la intemperie no se tiene control sobre los cambios en el tiempo.
Lixiviación	Remover inhibidores con periodos continuos de remojo en agua corriente o cambiando el agua con frecuencia.	Sembrar inmediatamente por que se induce la imbibición.
Congelamiento	Se realiza con gases licuados o en refrigeración.	---

Atmósfera controlada	Aumentar la concentración de CO ₂ .	La utilidad de este método se restringe a trabajos de investigación.
Radiación y tratamiento sónicos.	Se han probado la aplicación de gas plasma, rayos infrarrojos y radiofrecuencia en semillas de varios pinos.	Puede producir plantas anormales.
Utilización de aceptores de electrones	Compuestos como el azul de metileno, cloruro trifeniltetrazolio, nitratos, nitritos y peróxido de hidrógeno se pueden aplicar al medio de germinación o en remojo continuo.	---
Hormonas	Las sustancias más empleadas son: las giberelinas, las citocininas-cinetina, benziladenina y 6 aminopurina, el etileno y la fucocinica. La dosificación se realiza en ppm y la concentración depende de la especie. Se puede realizar a) aplicación directa al medio, b) remojo continuo en solución y c) solución en disolventes orgánicos.	Su alto costo y lo difícil de conseguirlas. Los tratamientos son efectivos para la dormición secundaria aunque en algunos casos puede inducirlos.
Disolventes orgánicos	Inmersión de semillas en acetona, éter, diclorometano, cloroformo, etanol, y metanol. Su efecto puede atribuirse a la lixiviación de inhibidores, la liberación	Son tóxicos y altamente inflamables.

	de promotores y a cambios en la cubierta de la permeabilidad de las membranas.	
Tiourea y compuestos sulfhídricos	Se aplican directamente al medio de germinación en soluciones acuosas, a 0.2% o se emplea el remojo continuo en soluciones de 0.5 a 3%. Al término del remojo las semillas deben lavarse con agua corriente.	Puede causar anomalías radiculares y una baja producción de plantas.
Control de temperatura e iluminación	En laboratorio se pueden obtener las temperaturas y fotoperiodos que favorezcan la germinación de semillas con dormición fisiológica, en el campo estas condiciones se logran al sembrar en una época determinada del año, para cubrir las exigencias de luz se hacen siembras superficiales.	En campo se tiene que esperar una época adecuada para la siembra, lo que evita el cultivo intensivo.

2.6. Postmaduración del embrión

La postmaduración es un proceso fisiológico que ocurre en el embrión, produciéndose una serie de cambios enzimáticos y químicos, que contribuyen a la formación de la semilla y garantizan su germinación (Cockrell, 2000). En las zonas templadas este proceso se produce de forma natural, cuando las semillas permanecen a la intemperie durante el invierno. El letargo del embrión se caracteriza principalmente porque para llegar a la germinación se requiere un periodo de enfriamiento en húmedo y por la incapacidad del embrión separado de germinar con normalidad. Desde hace mucho tiempo los propagadores han sabido que las semillas de muchas especies de árboles y arbustos que maduran en el otoño, para que puedan germinar en la primavera siguiente deben ser enfriadas al invernarse. Este requerimiento

condujo a la práctica hortícola llamada estratificación en la cual se colocan las semillas en cajas entre capas de tierra o arena húmedas y se les expone a temperaturas bajas ya sea a la intemperie o en refrigeradores.

En esta situación se han encontrado dos condiciones separadas pero interactuantes que controlan la germinación. La primera es la semipermeabilidad de las membranas que cubren la semilla que ejerce efectos sobre la aireación y la retención de inhibidores. La segunda es la condición interna del letargo dentro del embrión mismo, en particular en los puntos de crecimiento del eje embrionario. También pueden intervenir las influencias del endospermo o del gametofito femenino circundantes. La modificación de todos éstos se lleva a cabo con el tiempo durante el enfriamiento, de manera que al final las semillas puedan germinar rápidamente cuando se les dan temperaturas más altas, es decir cuando se someten a estratificación en frío. Los cambios fisiológicos que ocurren durante la estratificación y la postmaduración de embriones en letargo son muy complejos. Sin embargo, se les ha asociado con cambios en las concentraciones de sustancias estimuladoras del crecimiento (Hartmann, 1990).

Las semillas de las plantas de este grupo por lo general tienen un requerimiento de enfriamiento absoluto de uno a cuatro meses para que pueda efectuarse la germinación. Cuando los embriones se separan y se colocan en agar nutritivo no germinan bien sino que muestran, en varios grados, síntomas de letargo. Esas respuestas incluyen el crecimiento y coloración verde en los cotiledones; desarrollo de radícula corta y gruesa y sin crecimiento del epicótilo o desarrollo normal del sistema radical con varios grados de epicótilos anormales y enanos.

Los embriones en letargo son más comunes en las semillas de árboles, arbustos y algunas plantas herbáceas de zonas templadas o aun de climas más fríos, en donde las semillas invernan para germinar en primavera.

Las condiciones requeridas para superar el letargo del embrión comprenden humedad, temperatura, aireación y tiempo.

- Imbibición de humedad por la semilla

La postmaduración requiere que las semillas hayan embebido agua. Una semilla seca con embrión en letargo inicialmente absorbe por imbibición alrededor del 50% de humedad; si la semilla está encerrada por un endocarpio duro la absorción puede ser lenta de manera que requiere un periodo de postmaduración más prolongado. La iniciación de la postmaduración se retrasa, de tal modo que todo el tiempo de estratificación se alarga. Durante el periodo de enfriamiento siguiente, el contenido de humedad en las semillas permanece constante hasta que absorbe agua rápidamente. A medida que termina el letargo el embrión absorbe agua rápidamente para dar inicio al proceso de germinación. La reducción del contenido de humedad puede tener varios efectos: si se realiza cerca del término de la estratificación puede dañar al embrión; cuando se realiza durante la estratificación, detiene el proceso de postmaduración y también puede desarrollarse letargo secundario.

- Exposición a temperaturas bajas

La temperatura es el factor más importante que afecta la tasa de postmaduración. La temperatura exacta varía con las diferentes especies y las diferentes etapas de postmaduración. A temperaturas bajas las semillas germinan con lentitud pero el porcentaje es elevado. A temperaturas más elevadas las tasas de germinación son más aceleradas, pero el porcentaje de germinación disminuye en proporción al incremento de la temperatura. Las temperaturas más efectivas para la germinación son similares a las del medio natural, en donde las temperaturas del suelo son relativamente frías al inicio de la primavera, pero aumentan a medida que avanza la estación. En embriones separados de la semilla, no sometidos a postmaduración se ha mostrado que el achaparramiento fisiológico resulta de la exposición de los meristemas apicales a temperaturas de germinación cálidas.

- Aireación

Para una postmaduración adecuada es necesario que durante la estratificación de la semilla haya una buena aireación que proporcione oxígeno. La cantidad de oxígeno necesaria depende

de la temperatura. Las cubiertas húmedas de semillas embebidas de agua y en letargo restringen la absorción de oxígeno debido a su baja solubilidad en agua y a su fijación por las sustancias fenólicas de las cubiertas de las semillas. Sin embargo a temperaturas bajas, los requerimientos de oxígeno del embrión son reducidos y por lo general la cantidad de oxígeno es adecuada.

- Tiempo.

En la mayoría de las especies perennes leñosas, el tiempo requerido para la postmaduración de semillas en letargo es de uno a tres meses; el mismo, depende de la especie y existe una correlación general entre los requerimientos de enfriamiento de las yemas de las plantas y de sus semillas. El tiempo de germinación puede ser influenciado por la exposición ambiental de la planta madre durante el desarrollo de la semilla.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Micropropagación del departamento de Ciencias Agrícolas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 UNAM, ubicada en el Km 2.5 carretera Cuautitlan – Teoloyucan, San Sebastián Xala, Cuautitlan Izcalli, Estado de México.

3.2. Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Pinus cembroides* Zucc colectadas en San Luís Potosí en el 2009 y fueron sometidas a pruebas de imbibición y viabilidad. Las semillas utilizadas para tratamientos *in vivo* fueron escarificadas trozando con pinzas un pequeño segmento en el extremo de la testa.

3.3. Diseño experimental

En el ensayo se utilizó un experimento en un arreglo completamente al azar que consta de 14 tratamientos pregerminativos aplicados a las semillas (Cuadro 5), cada tratamiento tiene 4 repeticiones, haciendo un total de 56 unidades experimentales. La unidad experimental utilizada fue de 5 semillas, en total el número de semillas utilizadas fue 280.

3.4. Sustrato

Se utilizó como sustrato en los tratamientos *in vivo* la vermiculita, manteniendo la humedad a capacidad de campo. Para los tratamientos *in vitro* el medio de cultivo utilizado fue el Cruz-Pizarro (2000) sin hormonas (Cuadro 6).

Cuadro 5. Tratamientos aplicados a semillas de *Pinus cembroides* Zucc.

Tratamientos	Descripción
T1	Escarificado y estratificado por 720 horas.
T2	Escarificado y estratificado por 480 horas.
T3	Escarificado y estratificado por 240 horas.
T4	Estratificado por 720 horas.
T5	Estratificado por 480 horas.
T6	Estratificado por 240 horas.
T7	Escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas.
T8	Escarificado sin exposición al frío.
T9	Escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas con estratificación por 480 horas.
T10	Cultivo de embriones <i>in vitro</i> estratificados por 720 horas.
T11	Cultivo de embriones <i>in vitro</i> estratificados por 480 horas.
T12	Cultivo de embriones <i>in vitro</i> estratificados por 240 horas.
T13	Cultivo de embriones <i>in vitro</i> sin estratificación.
T14	Testigo: no escarificado ni estratificado

3.5. Condiciones de siembra

A excepción de los tratamientos con agua corriente, antes de sembrar las semillas *in vivo* fueron espolvoreadas con fungicida Benomil. Una vez sembradas, fueron rociadas, con Benomil al 1% cada tercer día.

En el caso de la desinfección de semilla y siembra de embriones las semillas de *Pinus cembroides* fueron lavadas con agua corriente y jabón líquido, después se colocaron en una solución con cloro comercial (cloralex) al 10% en un vaso de precipitados sobre un agitador magnético durante 20 minutos, posteriormente en la campana de flujo laminar se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada. Con ayuda de una pinza se eliminó la testa de la semilla y se procedió a separar el embrión del gametofito femenino. El embrión fue sembrado en el medio de cultivo contenido en un tubo de ensaye. Lo anterior fue realizado con la ayuda de pinzas, bisturí y aguja de disección previamente lavadas, esterilizadas y flameadas entre cada siembra.

Cuadro 6. Medio de cultivo Cruz-Pizarro (2000), con un pH de 5.7 ± 0.1 , aplicado a tratamientos *in vitro* con semillas de *Pinus cembroides* Zucc.

Compuesto	Peso molecular	Concentración (mM ó μML^{-1})	Concentración ($\text{mg L}^{-1}=\text{ppm}$)
NH_4NO_3	80	2.5	200
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236	1.25	295
KH_2PO_4	136	1.25	170
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246	1.5	369
KNO_3	101	5	50
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278	0.09	25
Na-edta	380	0.1	38
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169	5	0.84
H_3BO_3	62	100	6.1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	242	1	0.21
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287	30	8.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249	0.1	0.0000249
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	238	0.1	0.0000238
Mio-inositol	180	0.55	100
Tiamina HCL	337	0.29	0.1
Piridoxina HCL	205	2.44	0.5
Acido Nicotínico	123	4.07	0.5
Sacarosa	342	0.0878	30 000
Agar			6 000

Fuente: Cruz- Pizarro (2000)

Las semillas correspondientes a tratamientos con frío se etiquetaron y se colocaron en un refrigerador a una temperatura de 9°C , las que no requerían frío se acomodaron en un cuarto de incubación a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, con fotoperiodo de 16 horas luz y una intensidad luminosa de $49 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$.

3.6. Pruebas previas a la aplicación de los tratamientos

3.6.1. Pruebas de imbibición

Se elaboró la curva de imbibición en la semilla de *Pinus cembroides* y se registró el peso seco de 4 grupos de semillas, cada grupo conformado de 10 semillas con ruptura parcial en la testa. El peso fue tomado con una balanza granataria. Las semillas se colocaron en cajas de petri con toallas de papel humedecidas con agua destilada. El peso de las semillas se registró cada media hora durante las primeras 5 horas y posteriormente cada 12 horas durante 2 días con el propósito de determinar la dinámica de absorción de agua con relación al peso seco.

3.6.2. Pruebas de viabilidad

La prueba se realizó con Cloruro 2, 3, 5-trifenil tetrazolio al 1%. Se retiró completamente la testa y se humedecieron las semillas en una caja de petri con papel. Una vez ablandados los tejidos se efectuaron los cortes longitudinales y la extracción de los embriones.

3.7. Variables de estudio

3.7.1. Días a inicio de germinación

Se registra el día en que empiezan a germinar las plántulas, tomando como germinación el momento en el que la semilla muestra su radícula; y como día uno la fecha en la que termina el tratamiento con frío. En el caso de los tratamientos sin frío el día uno es la fecha de siembra.

3.7.2. Valor germinativo

Se graficó la curva de germinación de cada tratamiento mediante conteos diarios de la emergencia de las plantas y se obtuvo el valor germinativo (VG) aplicando la formula de Czabator (1962): $GV = PV \times MDG$; en donde seutiliza el valor pico (VP) que es el porcentaje

de germinación en el punto en que la tasa de germinación empieza a disminuir, dividido entre un número de días necesarios para llegar a ese punto, multiplicado por la germinación media diaria (MDG) que se refiere al porcentaje de germinación final dividido entre el número de días que las semillas estuvieron en prueba.

3.7.3. Longitud de radícula

Transcurridos los 60 días de haber sembrado las semillas se tomó la longitud de raíz bajo el método Bohm (1979) el cual utiliza recipiente transparente con agua, colocado sobre papel milimétrico. En el caso de los tratamientos *in vitro*, la longitud de raíz se tomó en forma directa con una regla.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Pruebas previas a los tratamientos

4.1.1 Pruebas de imbibición

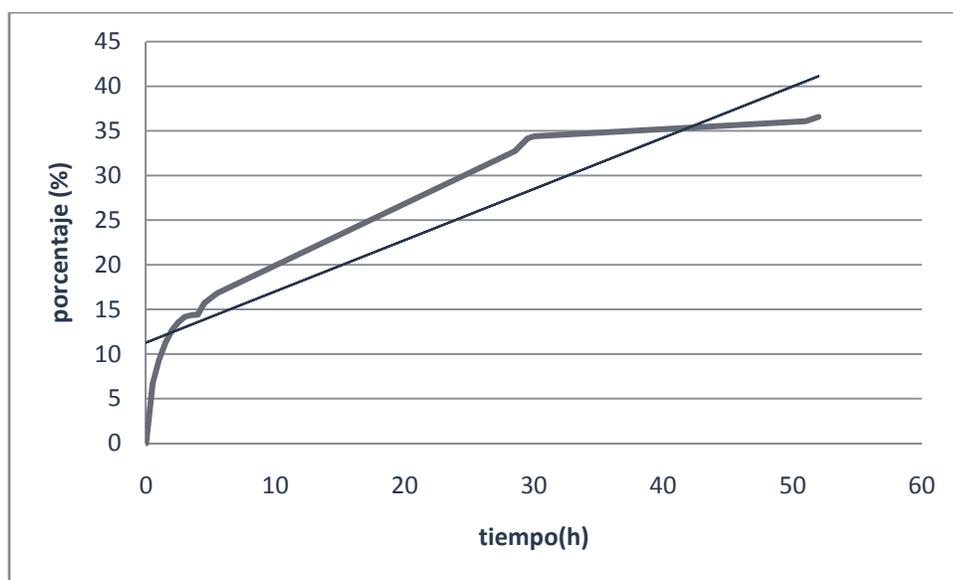
La absorción de agua por las semillas secas de *Pinus cembroides* manifestó en la primera hora un rápido incremento de hasta el 10% de su peso en absorción de agua. La mayor tasa de imbibición se obtuvo durante las primeras 30 horas, en donde en promedio del lote de 10 semillas se obtuvo en peso inicial 4.15 gramos (peso seco), al final presentó un incremento promedio de 1.4gr lo que equivale a un aumento del 35% del peso inicial de las semillas, punto en donde la absorción de agua comienza a disminuir y tiende a estabilizarse.

La primera etapa en el proceso de la germinación se debe a la imbibición, que es considerada un proceso físico dado a través de la hidratación. El primer periodo de activación del metabolismo comienza entre el 20 y 23% del contenido de agua que incluye la activación inicial de la respiración, el inicio de la formación de aminoácidos y el funcionamiento del ciclo de Krebs. La activación del metabolismo y degradación de proteínas de reserva se realiza a contenidos del 42 al 52% de agua (Viémont, 2000), lo que indica que la semilla tenía un potencial hídrico favorable que le permitió incorporar el agua necesaria para iniciar los procesos de germinación.

Los porcentajes de referencia en otras especies forestales como *Pseudotsuga menziesii* son del 60% de aumento en el contenido de agua en las primeras 32 horas (Mápula, 2008) y 42% en 48 horas para semillas sin testa comparadas con semillas con testa de *Hebea brasilienss Muell* (Moreno, 2006), el incremento representa el 50 y 20% más de lo obtenido para *Pinus cembroides*. Siendo probable que las restricciones mecánicas de la testa limiten en determinado momento el paso de agua, el cual se deberá incrementar a medida que la testa sea removida así como lo sustenta Moreno (2006) en semilla de *Hevea Brasiliensis* escarificadas y no escarificadas.

La línea de tendencia presentada en la gráfica de imbibición de *Pinus cembriodes* muestra una tendencia lineal positiva que indica la estabilidad en los incrementos de absorción de agua de la semilla (Gráfica 1).

Gráfica 1. Dinámica de la absorción de agua destilada en un lote de semillas escarificadas de *Pinus cembroides*.

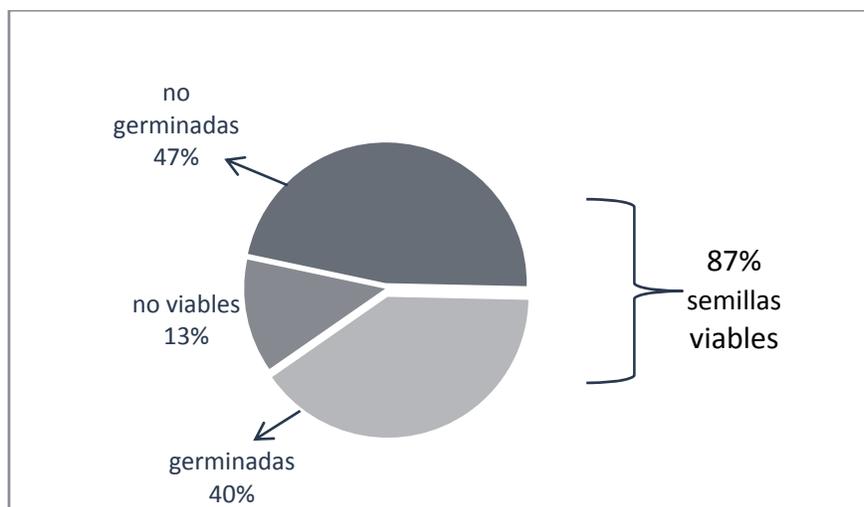


4.1.2 Pruebas de viabilidad

Las semillas presentaron un porcentaje de viabilidad de 87%, con la prueba de cloruro 2, 3, 5-trifenil tetrazolio. Se presentó variación en la velocidad de tinción, las estructuras que obtuvieron coloración rápidamente fueron los embriones, mismos que presentaron el color más intenso. Es importante resaltar que la prueba de tetrazolio muestra la actividad de enzimas reductasas provenientes de la actividad respiratoria del embrión, midiendo la capacidad de respuesta muestran la viabilidad potencial que presenta el lote de semillas; es decir el porcentaje de germinación potencial. En la prueba de viabilidad previa a los tratamientos del presente trabajo se obtuvo una viabilidad del 87%, al final del trabajo resultó un promedio general de germinación de 40% (como media de todos los tratamientos), lo que significa que del 87% de semillas viables germinaron el 45 % del total (Gráfica 2). Los resultados de la prueba de viabilidad son aproximados a los reportados en trabajos anteriores por Cantero

(1996) con un 95 y 90% y Cetina (1984) con un 76.6 % de viabilidad, ambos experimentos realizados en *Pinus cembroides*, lo que indica que la semilla estaba en condiciones de viabilidad para realizar el experimento.

Gráfica 2. Viabilidad obtenida con prueba de cloruro 2, 3, 5 trifenil tetrazolio y porcentaje de germinación final en pruebas del mismo lote de semillas de *Pinus cembroides*.



4.2 Variables de estudio

4.2.1. Días a inicio de germinación

Las semillas del tratamiento 7 (escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas) fueron las que presentaron un inicio de germinación más precoz que las semillas del resto de los tratamientos, solo necesitaron de 2 días para desarrollar este proceso, la rapidez se atribuye a que al colocar la semilla escarificada en agua corriente inició la imbibición antes que las otras semillas, además de considerar que durante el remojo se da un proceso de lavado, lixiviación y separación de inhibidores de la germinación (Hartmann, 1990). El tratamiento 14 (testigo) necesitó de 17 días para iniciar la germinación, lo que representa hasta ocho veces más del tiempo requerido con el tratamiento 7.

Para las semillas escarificadas el inicio de la germinación se presentó de forma temprana y uniforme, los tratamientos sin escarificación mostraron lapsos más prolongados para obtener el 100% de las semillas que germinaron. La emergencia de la planta en las semillas

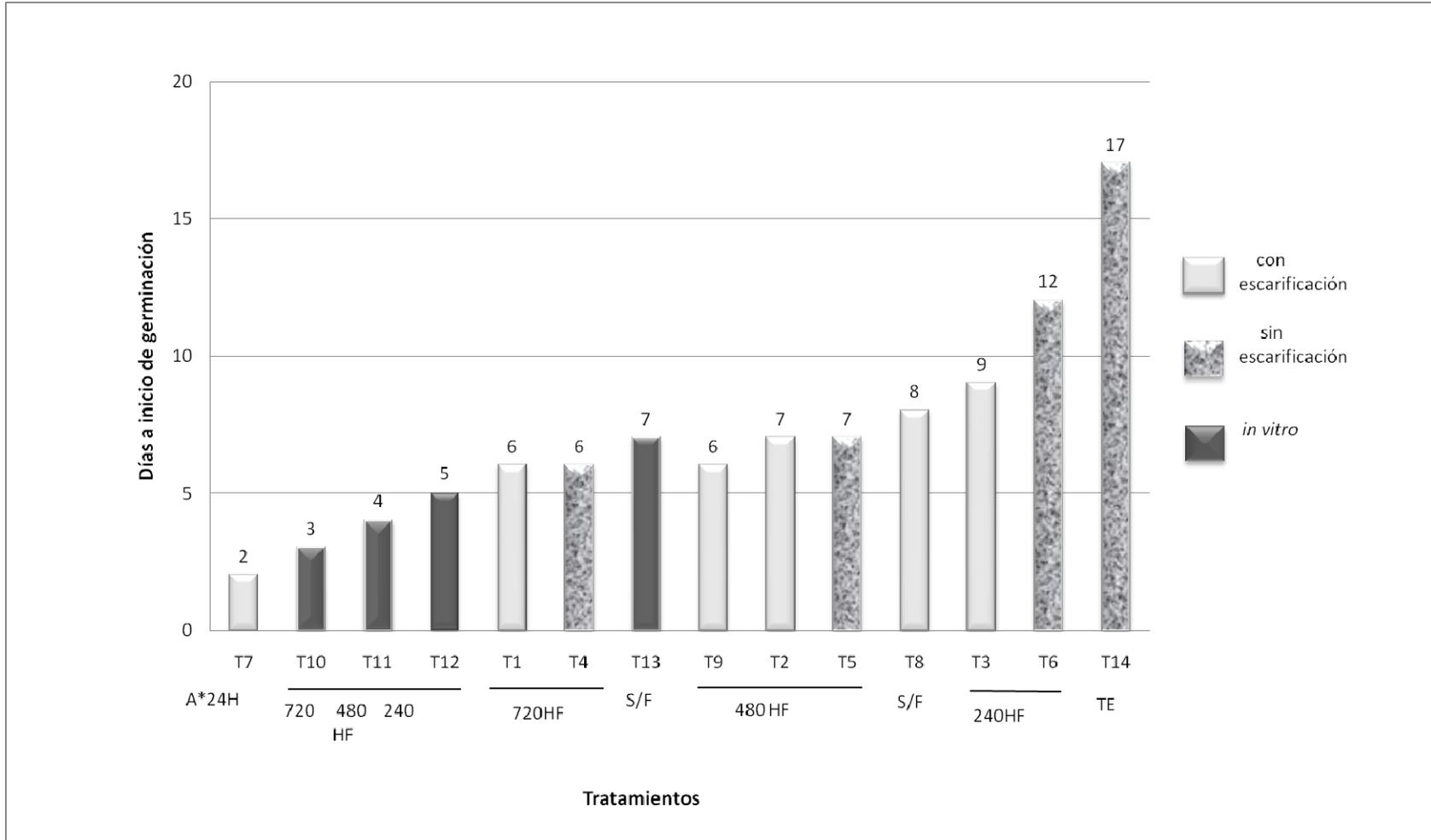
escarificadas inició entre el día 2 y el día 8; el 100% de la emergencia total de las semillas que germinaron se alcanzó aproximadamente a los 12 días (Gráfica 6). El intervalo de inicio en germinación fue más amplio para las semillas no escarificadas en donde se registró la primera semilla germinada a partir del día 5 y se extendió hasta el día 17 con una emergencia total del 100% de semillas germinadas en el día 39 (Gráfica 7).

La escarificación de forma general puede ayudar a acelerar la absorción de agua y al inicio temprano de germinación, por lo que se puede justificar la realización de escarificación parcial en la testa antes de sembrar las semillas.

Los embriones cultivados de manera aséptica combinados con estratificación mostraron la germinación más rápida que la mayoría de los tratamientos. Pierik (1990) menciona que los embriones aislados *in vitro*, generalmente muestran una germinación precoz debido a que se produce una pérdida de inhibidores al retirar la cubierta seminal, o que el potencial osmótico negativo que existe *in vivo*, tenga un valor más alto *in vitro*.

En los tratamientos con mayor exposición a horas frío el inicio de germinación se presentó de forma más acelerada y uniforme que en el resto de los tratamientos, a medida que las horas frío disminuían en los tratamientos, no existía una uniformidad en el proceso germinativo. Lo anterior se atribuye a que en la mayoría de las especies leñosas el tiempo requerido para la postmaduración de semillas en letargo es de uno a tres meses (Hartmann, 1990; Camacho, 1994), aunque los periodos de estratificación en la presente prueba son menores que los recomendados, la semilla y el embrión respondieron favorablemente a la presencia de frío, esto se puede observar en lo lento del día de inicio en la germinación de los tratamientos sin frío, como los embriones del T13 (cultivo de embriones *in vitro* sin estratificación) que fueron los últimos en germinar de los tratamientos *in vitro*, las semillas del T14 (testigo) fueron las últimas en germinar de toda la prueba y las semillas del T8 (escarificación sin exposición al frío) fueron las penúltimas en germinar de los tratamientos escarificados (Gráfica 3).

Gráfica 3. Días a inicio de germinación en semillas de *Pinus cembroides* expuestas a diferentes tratamientos pregerminativos.



HF= horas frío; TE= testigo (sin escarificación ni estratificación); S/F= sin frío, A*24= escarificado y sumergido en agua corriente por 24 horas.

De manera general los tratamientos en los que se escarificó presentaron mejor respuesta que los no escarificados, mostrando más efectividad al combinarse con la estratificación.

4.2.2. Valor germinativo

Las semillas del tratamiento número 13 (cultivo de embriones *in vitro* sin estratificación), presentaron el valor más alto en la tabla de Valor Germinativo (VG). Si bien el VG de las pruebas *in vitro* obtuvieron la mayoría de las puntuaciones altas de toda la prueba (Cuadro 7), es importante señalar que los embriones *in vitro* que mostraron inicialmente crecimiento y coloración verde en los cotiledones, poco tiempo después se deformaron y tornaron color café.

Cuadro 7. Porcentaje de germinación, Valor Pico, Germinación Media Diaria y Valor germinativo en semillas de *Pinus cembroides* sometidas a diferentes tratamientos pregerminativos.

Tratamientos	Germinación (%)	(VP)	MDG	Valor Germinativo
13	80	4.615	2.000	9.230
10	70	3.529	1.750	6.176
12	65	3.055	1.600	4.88
11	55	2.500	1.370	3.437
7	40	4.000	0.816	3.265
9	64	1.931	1.306	2.522
5	56	1.455	1.143	1.662
8	40	1.770	0.816	1.445
2	40	1.429	0.816	1.166
4	52	1.026	1.061	1.088
1	36	0.865	0.735	0.635
3	16	0.800	0.327	0.261
14	16	0.571	0.326	0.187
6	12	0.242	0.245	0.059

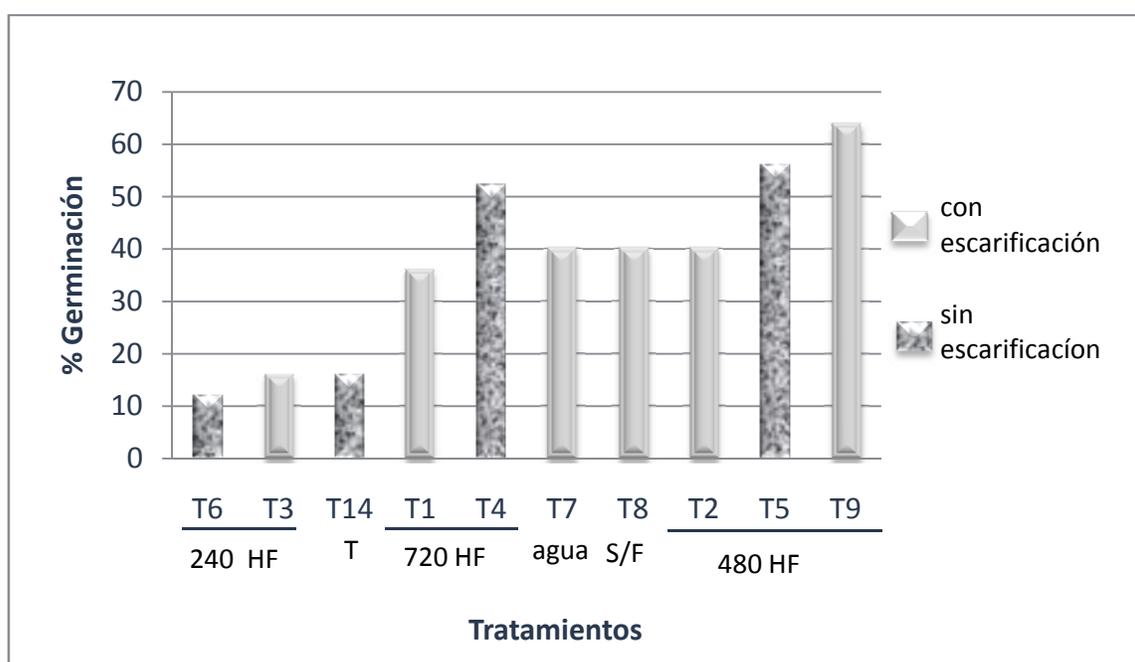
VP= Valor Pico; MDG= Germinación Media Diaria

Hartmann (1990) menciona que cuando los embriones de semillas aún durmientes se colocan en un medio de cultivo, no germinan bien, sino que muestran en varios grados síntomas de letargo.

Las semillas expuestas al tratamiento número 7 (escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas) presentaron el mejor VG de los tratamientos *in vivo*, sin embargo su porcentaje de

germinación fue de 40%. El segundo VG alto de los tratamientos *in vivo* lo presentaron las semillas sometidas al tratamiento número 9 (escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas con estratificación por 480 horas), mismas que mejoraron el porcentaje de germinación obteniendo un 64% de semillas germinadas, mientras que los resultados en las semillas del tratamiento número 6 (estratificación por 240 horas) presentaron el menor VG con un 12% de germinación (Gráfica 4).

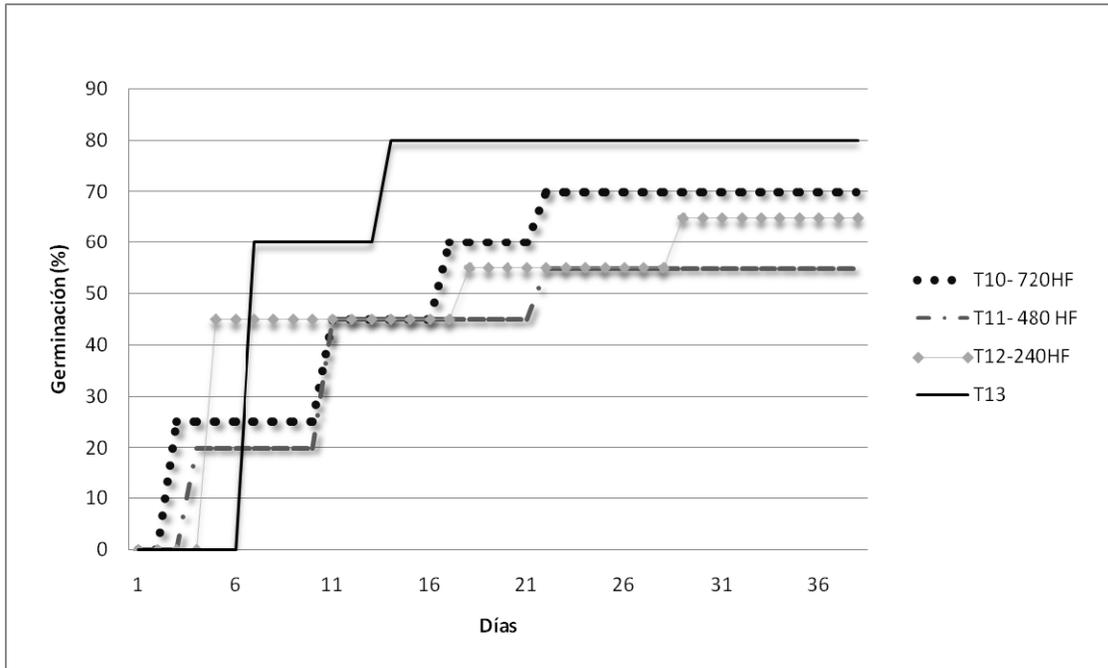
Gráfica 4. Porcentaje de germinación en semillas de *Pinus cembroides* sometidas a diferentes tratamientos pregerminativos *in vivo*.



HF= Horas frío; T= testigo; S/F= sin frío

Los porcentajes más altos de germinación se obtuvieron en los embriones de los tratamientos *in vitro*, que en promedio reflejaron porcentajes arriba de la media general del experimento. Los embriones *in vitro* presentaron los mejores valores germinativos debido a los altos porcentajes de germinación en cortos periodos de tiempo (Gráfica 5).

Gráfica 5. Curva de germinación de semillas de *Pinus cembroides* utilizando embriones cultivados *in vitro* expuestos a diferentes tiempos de estratificación expresados en horas frío.



T10= cultivo de embriones in vitro con estratificación por 720 horas; T11= cultivo de embriones in vitro con estratificación por 480 horas; T12= cultivo de embriones in vitro con estratificación por 240 horas); T13= cultivo de embriones in vitro sin estratificación.

Existe diferencia significativa entre las semillas de los tratamientos. De acuerdo con el análisis de varianza se mostró similitud entre las respuestas de los tratamientos 13 (cultivo de embriones *in vitro* sin estratificación), 10 (cultivo de embriones *in vitro* con estratificación por 720 horas), 9 (escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas con estratificación por 480 horas) y 12 (cultivo de embriones *in vitro* con estratificación por 240 horas), que fueron similares entre sí, pero diferentes que el resto de los tratamientos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de germinación y nivel de significancia del mismo aplicado a semillas de *Pinus cembroides*.

Tratamiento	Promedio de semillas germinadas (%)
13	80 a ¹
10	68 a
9	64 a
12	64 a
11	56 ab
5	56 ab
4	52 ab
2	44 ab
7	40 ab
8	40 ab
1	36 ab
14	16 b
3	16 b
6	12 b

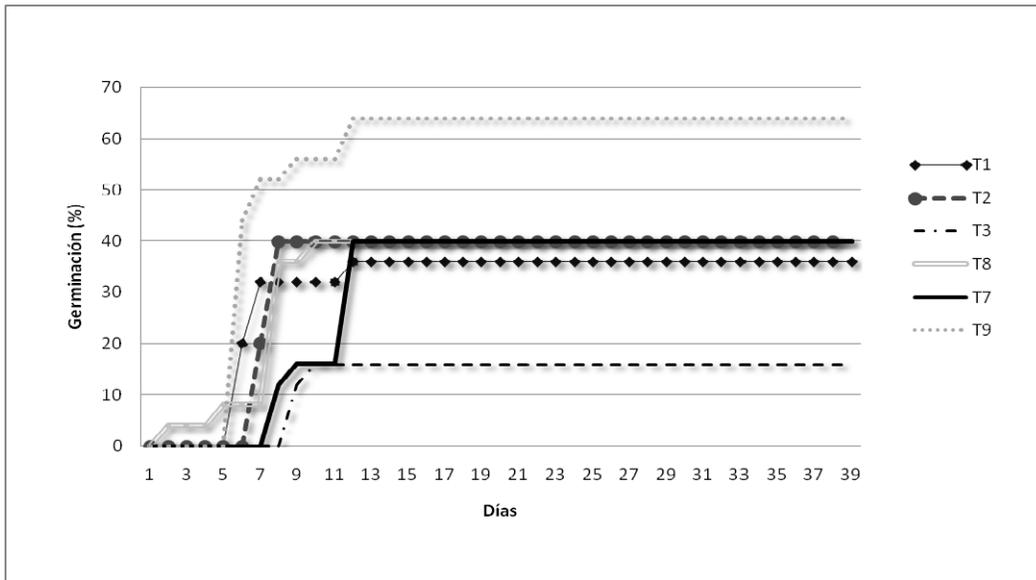
Prueba Tukey ($\alpha=0.01$) ¹ *Valores con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales.*

Los resultados de las semillas expuestas al tratamiento 9 (Escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas con estratificación por 480 horas) se colocaron en el grupo de los *in vitro* con un porcentaje de germinación sobresaliente (cuadro 8), sin embargo en la tabla del VG (cuadro 7) el tratamiento número 7 fue el que presentó el mejor VG de los tratamientos *in vivo*, aunque en su porcentaje de germinación se colocó debajo de los resultados de las semillas del T9.

El valor germinativo es un parámetro que incluye el porcentaje de germinación tomando el tiempo en días para la germinación de las semillas, por esta razón no coinciden los valores referentes a porcentaje de germinación y valor germinativo.

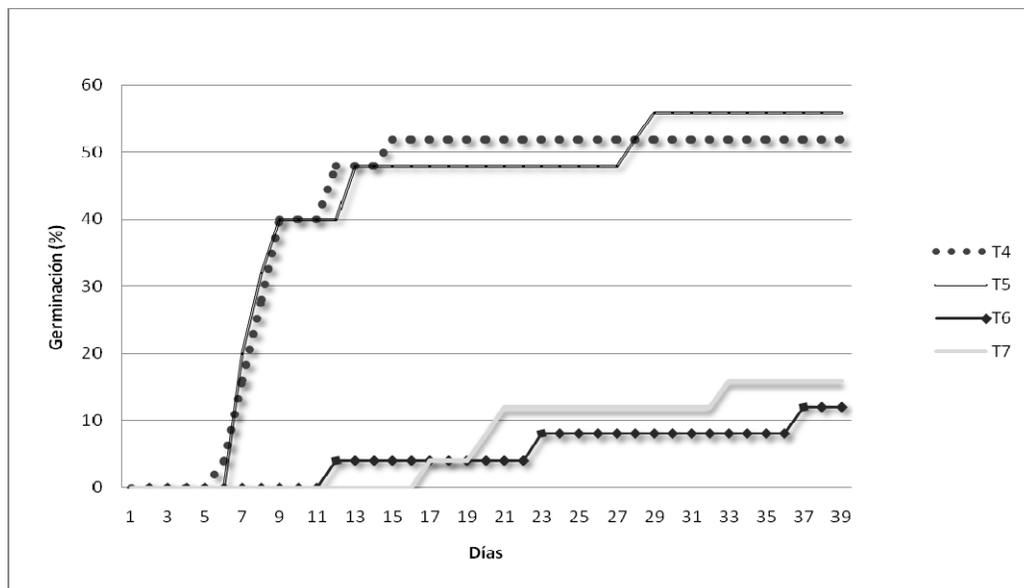
En promedio los tratamientos escarificados presentan porcentajes de germinación promedio más altos que el promedio de los tratamientos sin escarificación lo cual se asocia a la barrera física impuesta por la testa, que limita algunos procesos como la imbibición y disponibilidad de oxígeno para la respiración.

Gráfica 6. Curva de germinación en tratamientos escarificados de semillas de *Pinus cembroides*



T1= escarificado y estratificado por 720 horas; T2=escarificado y estratificado por 480 horas; T3= escarificado y estratificado por 240 horas; T7= escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas; T8= escarificación sin exposición al frío; T9= escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas con estratificación por 480 horas.

Gráfica 7. Curva de germinación en tratamientos no escarificados a diferente tiempo de estratificación en semilla de *Pinus cembroides*.

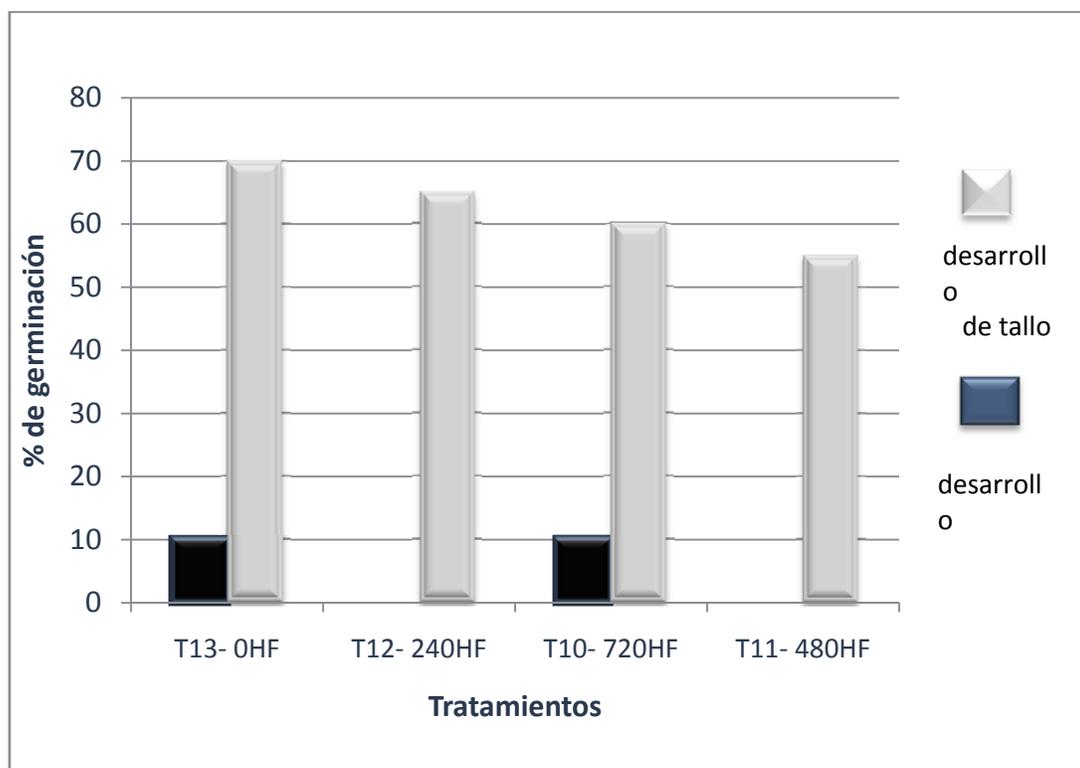


T4= Estratificado por 720 horas; T5= Estratificado por 480 horas; T6= Estratificado por 240 horas; T14=Testigo.

4.2.3. Longitud de radícula

Como se muestra en la grafica 8, el desarrollo del embrión se reflejó principalmente en el crecimiento del tallo, más que el de la raíz, es decir, los embriones de todos los tratamientos *in vitro* desarrollaron tallo, sólo los embriones expuestos a los tratamientos 10 (cultivo de embriones *in vitro* estratificados por 720 horas) y 13 (cultivo de embriones *in vitro* sin estratificación) mostraron crecimiento de raíz, en ambos casos sólo el 10% de los embriones que germinaron desarrollaron raíz, ésta con un promedio de crecimiento de 3 cm al mes de la siembra.

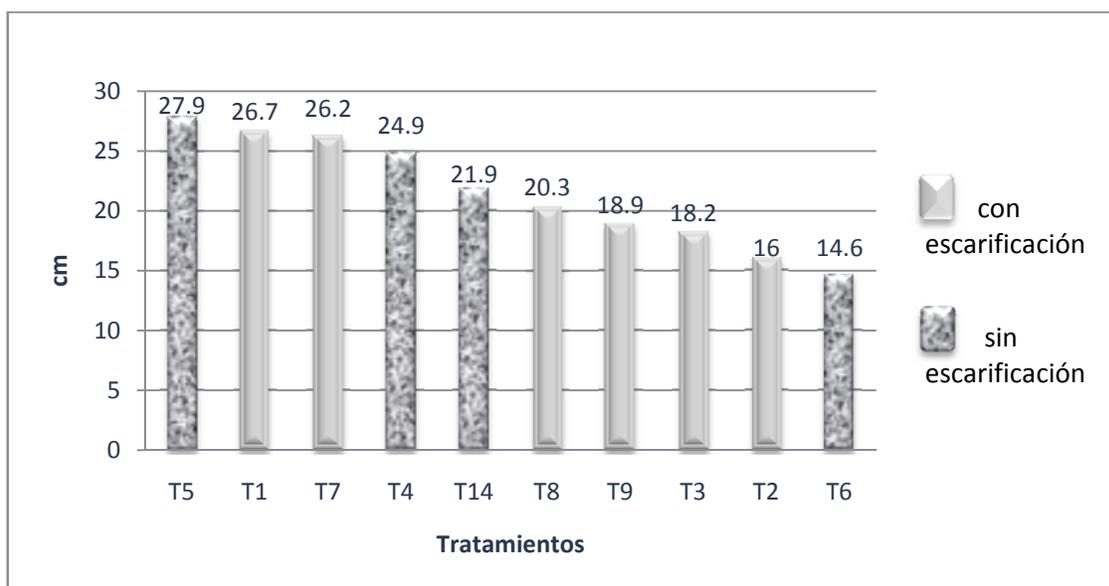
Gráfica 8. Porcentaje de desarrollo de tallo y raíz en embriones de *Pinus cembroides* germinados *in vitro* a diferentes tiempos de estratificación.



T10= cultivo de embriones *in vitro* con estratificación por 720 horas; T11= cultivo de embriones *in vitro* con estratificación por 480 horas; T12= cultivo de embriones *in vitro* con estratificación por 240 horas); T13= cultivo de embriones *in vitro* sin estratificación.

Las plantas sometidas al T5 (estratificación por 480 horas) desarrollaron una raíz de 27.9 cm, alcanzando la mayor longitud de raíz del experimento y el mayor número de ramificaciones, lo que representa el doble de superficie para absorción de agua y nutrientes así como para mayor fijación al suelo en su posterior desarrollo. En comparación con el desarrollo de raíz de menor tamaño mostrado por las plantas del T6 (estratificación por 10 días), representa casi el 50% más de longitud desarrollada.

Gráfica 9. Longitud de raíz en semilla de *Pinus cembroides* 60 días de su siembra.



T1= escarificado y estratificado por 720 horas; T2=escarificado y estratificado por 480 horas; T3= escarificado y estratificado por 240 horas; T4= estratificado por 720horas; T5= estratificado por 480 horas; T6= estratificado por 240 horas; T7= escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas; T8= escarificación sin exposición al frío; T9= escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas con estratificación por 480horas. T14= Testigo.

Para el parámetro longitud de raíz no se observa diferencia de respuesta entre tratamientos escarificados y no escarificados, lo que indica que la escarificación y estratificación no tienen influencia en el crecimiento de raíz de la planta; esto es porque la embriogénesis solamente establece el plan básico del cuerpo vegetal y forma los meristemos que generan órganos adicionales en el adulto. Estos meristemos sólo llegan a ser activos tras la germinación (Taiz 2006) pero una vez concluida la germinación de la semilla emergiendo la radícula, ésta continúa un patrón natural de crecimiento.

5. CONCLUSIONES

1. La prueba de tinción con tetrazolio es un indicador de viabilidad potencial, sin embargo no determina el porcentaje de germinación que se obtendrá debido a que únicamente manifiesta que existe actividad metabólica en el embrión.
2. La escarificación parcial en la testa de una semilla no durmiente de piñón facilitó la germinación.
3. Los tratamientos *in vitro* a partir del aislamiento del embrión presentaron un porcentaje mayor de desarrollo del mismo.
4. Los tratamientos *in vivo* presentaron menor porcentaje de germinación, sin embargo, a lo largo del experimento mostraron mayor porcentaje de sobrevivencia que los tratamientos *in vitro*.
5. Los tratamientos en los que se cultivaron embriones *in vitro*, sin estratificación (No. 13) con estratificación por 240 horas (No. 12), por 480 horas (No. 11) y por 720 horas (T10) presentaron los valores germinativos (VG) más altos.
6. Los mejores resultados *in vivo* para valor germinativo y días a inicio de germinación lo presentaron las semillas del tratamiento número 7 (escarificado e inmerso en agua corriente por 24 horas) con un VG de 3.26 y un inicio de germinación al segundo día.
7. El frío es el factor más importante para superar la postmaduración y aumentar el porcentaje de germinación en la semilla de piñón (*Pinus cembroides*), debido a que a mayor tiempo de exposición de frío en semillas de piñón, el porcentaje de germinación se incrementa.

8. La escarificación es una buena práctica que anticipa la imbibición de la semilla y ayuda a iniciar la germinación, pues las semillas que se escarificaron parcialmente en la testa tuvieron un rápido inicio en la germinación que las que no se escarificaron.

9. Realizar estratificación y escarificación en la semilla no influye en el desarrollo de la longitud de raíz.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Álvarez M, Rodríguez de la O, García R. 2008. Desinfección y selección inóculo *in vitro* de *Abies religiosa* Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente. 14(001):11-14.
- ❖ Amarjit S. Basra 2006. Handbook of seed science and technology Food Products Press. New York 795p.
- ❖ Barceló, C. J. B., Rodrigo, G. N., & Garcia, B. S. 2007. Fisiología vegetal. España: Piramide. 556p.
- ❖ Bariogilio, C. 2006. Diccionario de las Ciencias Agropecuarias, Argentina, Encuentro Grupo Editor 496 p.
- ❖ Batis M, y Alcocer M. 1999, Árboles y Arbustos Nativos Potencialmente Valiosos para la Restauración Ecológica y la Reforestación. Instituto de Ecología, UNAM – CONABIO, México, D.F. 311p
- ❖ Benech, R. 2004. Handbook of seed physiology: applications to agriculture. (R. A. Roberto L. Benech-Arnold, Ed.) New York. 480 p
- ❖ Bohm W. 1979. Methods of studying root systems (Ecological studies; vol 33). Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, Alemania. 188 pp
- ❖ Bradbeer J. 1992. Seed Dormancy and germination, Chapman and Hall, 146p.
- ❖ Camacho M. F. 1994. Dormición de Semillas Causas y tratamientos. Editorial Trillas. México. 125p.

- ❖ Cantero B., 1996, Germinación y crecimiento inicial de *Pinus cembroides subsp orizabensis Bailey*. Tesis profesional, Chapingo, 69p.

- ❖ Cetina A. 1984. Estudios sobre germinación de *Pinus cembroides Zucc.* En condiciones naturales, Tesis profesional Chapingo, 72p.

- ❖ Cockerell, B. 2000. Fruticultura general. San Jose Costa Rica: EUNED, 164p.

- ❖ CONAFOR – SIRE. Ficha Técnica *Pinus cembroides* [en línea] [consulta: 10 junio 2010].
<<http://www.conafor.gob.mx/portal/docs/secciones/reforestacion/Fichas%20Tecnicas/Pinus%20cembroides.pdf>>

- ❖ CONAFOR- SNIF, Ficha Técnica *Pinus cembroides*. [en línea] [consulta: 10 junio 2010].
<http://148.223.105.188:2222/gif/snif_portal/secciones/ usos/UsosPDF>

- ❖ Cruz-Pizarro, F. 2000. Niveles de sacarosa y relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ en el cultivo in vitro de vid (*Vitis vinifera*) “Málaga Roja”, Tesis Maestría en ciencias, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 78p.

- ❖ Czabator, F. 1962. Germination Value: an index combining speed and completeness of pine seed germination. *Forest Science*, 8:386-396.

- ❖ De la Rosa, A. 1995. Evaluación de dos fuentes nitrogenadas en embriones de pino piñonero (*Pinus cembroides Zucc*) *in vitro*. Tesis profesional, FESC-Cuautitlán, UNAM. México.125p

- ❖ Duke A. J., 2001. Handbook of nuts. CRC Press USA 343p.

- ❖ Eguiluz T., 1982. Clima y distribución del género *Pinus* en México. Revista Ciencia Forestal, 38 (7): 30-44.

- ❖ FAO, 1992. Producción Forestal, Editorial Trillas, México 134 p.

- ❖ García V.A. 1987. Citogenética de pinos piñoneros. Memoria del Segundo Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros. pág19-31.

- ❖ Hartmann H. T and Kester E. D., 1990. Plant propagation. Principles and practices. Prentice Hall, New Jersey. 647 p.

- ❖ Herrera, J.y Alizaga, R., 2006, Germinación y crecimiento de la Planta, Editorial Universidad de Costa Rica, Villalobos Enrique Rodríguez (edt.). pp 18-41.

- ❖ Khan A. 1997, Quantification of seed Dormancy: physiological and Molecular considerations. Hort Science 34 (4):609-614.

- ❖ Lang G, Early J, Martin G. and Darnell R. 1987, Endo, Para, and Ecodormancy Physiological terminology and Classification for Dormancy Research. Hort Science 22(3): 371-377.

- ❖ Mápula M, López J., Vargas J, Hernandez A, 2008. Germinación y vigor de semillas de *Pseudotsuga menziesii* de México. 4(1):119-134.

- ❖ Martínez M. 1945. Los pinos Mexicanos. Tercera edición, Ediciones Botas, México 311p.

- ❖ Martínez R. S., Flores A. J. y Cibrián T. D. 1987. Memoria del Simposio Nacional sobre Pinos piñoneros. pp 215- 222.

- ❖ Mondragón M. y Olayo A. 1987. El manejo del pino piñonero en México. Memoria del Simposio Nacional sobre pinos piñoneros, pp 211 -2114.

- ❖ Moreno A., 2001. Estudio de nuevos métodos de determinación de la viabilidad de las semillas forestales: test de electroconductividad e índigo carmín. Comparación con el test del tetrazolio y su aplicación a *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis*, Actas del III Congreso Forestal Español. Granada Mesa 3: 653-658.

- ❖ Moreno F, Plaza G, Magnitskiy S, 2006. Efecto de la testa sobre germinación de semillas de caucho (*Hevea brasiliensis Muell*). Agronomía Colombiana 24(2): 290-295.

- ❖ Moreno M., 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercera edición, México. 393 p.

- ❖ Niembro A., 1986. Mecanismos de reproducción sexual en pinos, Limusa, México, 130p.

- ❖ Peña J. A. y Sánchez G. J. L, 2005. Aprovechamiento sustentable de los recursos forestales. Un reto en el ambiente internacional. UNAM, FESC. 265p

- ❖ Perry J, 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Inc Portland, OR. USA. 231p.

- ❖ PieriK, R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores, Mundi Prensa. Madrid. 236p.

- ❖ Roca W y Mroginski L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 969p.

- ❖ Ruano C. 1998, Rendimiento de semillas de cuatro especies de coníferas y requerimientos de mano de obra en su procesamiento en Guatemala, Tesis profesional. Facultad de agronomía, Instituto de investigaciones agronómicas Universidad de San Carlos Guatemala.65 p.

- ❖ Ruiz E., 2004. Las semillas: Biología, Vigor y Relevancia en la Producción Agrícola, CIBNOR, S.C. 71p.

- ❖ Rzedowski J. 1983 Vegetación de México. Editorial Limusa México. 432 p.

- ❖ Salazar, R. 2001. Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina Vol. II. Costa Rica: CATIE. 155p

- ❖ Sánchez M, Rios D. Pedraza M. 2004. Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* ((*Poepp. et Endl.*) *Oerst.*) a partir de embriones aislados. *Bosque* 25(1): 123-128.

- ❖ Sánchez M, Zapata J. 2008. Competencia morfogénica de embriones maduros de *Pinus radiata* cultivados *in vitro* y su relación con la posición del cono en el árbol. *Bosque* 29(3): 212-216.

- ❖ Sánchez T y Nieto P., 2005, Producción de semillas de *Pinus cembroides Subsp. orizabensis* D.K. Bailey de Alzayanca, Tlaxcala México. *Foresta Veracruzana* 7(1): pág15-20.

- ❖ Sharry S, Abedini W. Comparación entre diferentes sistemas de propagación vegetativa de *Melia azedarach L.* Centro experimental de Propagación Vegetativa,

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires Argentina. 2001 [en línea] [consulta: 15 junio 2010]
<http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/011-18/20012.PDF>

- ❖ Shuler G, Baquero O Vega G. 2005. Propagación *in vitro* de material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC (Ococobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz&Pav) Oken (Nogal Cafetero) Revista Colombiana de Biotecnología 7(001): 39-50.
- ❖ Taiz L y Zeiger E., 2006. Fisiología Vegetal, Volumen II, Publicacions de la Universitat Jaume I. 1907p.
- ❖ Viéumont J, Crabblé J 2000. Dormancy in plants, CABI Publishing, 385p.
- ❖ Zavala C, 1987. Estudio de la primera etapa del desarrollo de conos femeninos de *Pinus cembroides* Zucc. Tesis profesional Chapingo 113p.
- ❖ Zavala C. y García. M. 1990, Iniciación de conos femeninos en *Pinus cembroides* Zucc., Acta Botánica Mexicana. 10:31-44

Anexo 1. ANOVA para la variable número de semillas totales germinadas.

FV	GL	SC	CM	F-Valor	Significancia
TRATAMIENTO	13	70.7000000	5.4384615	5.25	S
ERROR	56	58.0000000	1.0357143		
TOTAL	69	128.7000000			