

Ensayos germinativos en especies maderables con potencial para su micropropagación

Germination tests in woody species with potential for micropropagation

I. A. Yáñez-Islas ^a, D. M. Galván-Hernández ^{a,*}

^a Área Académica de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42001, Pachuca, Hidalgo, México.

Resumen

La deforestación es un factor antropogénico que altera los bosques. Para mitigar este fenómeno se han planteado diversas estrategias, siendo una de estas la propagación *in vitro*. En este trabajo se seleccionaron especies con potencial para el cultivo *in vitro*, mediante la aplicación de pruebas a lotes de semillas de diversas especies. La viabilidad se calculó mediante una prueba con tetrazolio y la germinación mediante siembra en algodón por 21 días. Para el cultivo *in vitro* se empleó medio WP. Se probaron dos protocolos de desinfección empleando NaClO, así como, cinco tratamientos pre-germinativos. Las semillas de *Pinus michoacana*, y *Retama sphaerocarpa* resultaron viables (61% y 100%), sin embargo, únicamente, *P. pseudostrobus* y *P. michoacana* mostraron 43.3% y 40% de germinación. El Protocolo 1 mostró contaminación del 100% de las muestras; el Protocolo 2 la redujo un 20-40%. De los tratamientos pre-germinativos, únicamente la estratificación mostró efectividad. Se concluye que *P. michoacana*, considerando tanto viabilidad como germinación, es una especie con potencial para el cultivo *in vitro*.

Palabras Clave: cultivo, desinfección, pinos, viabilidad, pruebas.

Abstract

Deforestation is an anthropogenic factor that alters the forests. To mitigate this phenomenon, various strategies have been proposed, one of these being *in vitro* propagation. In this work, species with potential for *in vitro* cultivation were selected by applying tests to seed lots of various species. Viability was calculated using a tetrazolium test and germination by sowing in cotton for 21 days. For *in vitro* culture, WP medium was used. Two disinfection protocols using NaClO were tested, as well as, five pre-germination treatments. The *Pinus michoacana* and *Retama sphaerocarpa* seeds were viable (61% and 100%), however, only *P. pseudostrobus* and *P. michoacana* showed 43.3% and 40% germination. The Protocol 1 show 100% of samples contamination, Protocol 2 reduced it to 20-40%. Of the pre-germination treatments, only the stratification showed effectiveness. It is concluded that *P. michoacana*, considering both viability and germination, is a species with potential for *in vitro* culture.

Keywords: culture, disinfection, pines, viability, tests.

1. Introducción

Los bosques templados comprenden el 20% de la cobertura forestal en México, de los cuales el 5% es ocupado por bosques de encinos, 14% de pino y pino-encino, y el 1% por otras coníferas (Galicia *et al.*, 2018). Los bosques de coníferas son ecosistemas importantes ya que se consideran centros de diversificación de varias especies, además de los servicios ecosistémicos que aportan como el flujo de materia y energía, estructura y paisaje, regulación del ciclo del agua, captación de CO₂ atmosférico, entre otros. Sin embargo, a lo largo de las últimas décadas, este ecosistema ha sufrido una gran variedad

de cambios, resultado de las actividades del ser humano entre los que destacan la deforestación y cambios de uso de suelo, así como el impacto de afectaciones naturales o provocadas como los incendios forestales (Romero-Sánchez, 2016).

En este sentido, es importante la implementación de estrategias que ayuden a mitigar estas problemáticas y permitan la recuperación del ecosistema, como, la propagación vegetativa o germinativa que puede ser *in situ* o *ex situ* (Vargas, 2008).

*Autor para la correspondencia: dulce_galvan11212@uaeh.edu.mx

Correo electrónico: ya353434@uaeh.edu.mx (Ivan Alonso Yáñez-Islas), dulce_galvan11212@uaeh.edu.mx (Dulce María Galván-Hernández).

La propagación *in situ* es toda práctica que conlleva el manejo de los individuos en la zona perturbada, por otra parte, será *ex situ* cuando la germinación y desarrollo de nuevos individuos se lleve a cabo fuera del sitio a restaurar. La siembra en invernaderos y la propagación en laboratorios son los ejemplos más conspicuos de estos tipos de propagación (Bridg, 2000). Cuando se trabaja para regenerar y propagar plantas a partir de células simples, tejidos y órganos bajo condiciones estériles y condiciones ambientales controladas, se maneja una forma de propagación conocida como *in vitro* o micropropagación (Bridg, 2000).

Se han llevado a cabo estudios y trabajos relacionados con la propagación de especies maderables con fines de restauración ecológica. Para la micropropagación se han empleado diferentes fuentes de explantes como, por ejemplo, los embriones maduros y cotiledones, lo que hace necesaria la obtención de semillas para realizar el proceso. Otras formas para promover la regeneración *in vitro* de un material de plantas seleccionado, puede ser mediante cultivos de: i) plantas de semillero o plantas adultas; ii) embriones maduros o inmaduros; iii) órganos aislados de la planta; iv) tejidos o cultivo de callos a partir de tejidos originarios de explantes de órganos de la planta; v) células en suspensión a partir de cultivo de células aisladas o agregados muy pequeños dispersos en medio líquido; vi) protoplastos y anteras, entre otros posibles (Perea y Navarro, 1988).

Algunos trabajos de micropropagación de especies maderables se han realizado en: *Cupressus lusitanica* (Borchert, 1967), *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (Jenq et al., 1994), *Pinus ayacahuite* (Saborio et al., 1996), *Pinus caribaea* Morelet. (David et al., 1995), *Pinus strobus* L. (Klimaszewska et al., 2007) y *Pinus taeda* L. (Gupta et al., 1999). Un problema con la micropropagación es la clonalidad de los individuos resultantes, y una manera de conservar la variación genética de las especies es utilizando semillas como fuentes de explantes, pero en el caso de las especies maderables, se ha observado que estas entran en una fase de latencia lo que dificulta su propagación, por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la germinación de especies maderables para seleccionar genotipos potenciales para su propagación *in vitro*.

2. Materiales y métodos

2.1. Obtención del material

Se valoró un lote de semillas donadas del banco estatal de germoplasma forestal de la Semarnat, estas pertenecían a las especies *Cupressus lusitanica*, *Pinus montezumae*, *P. pseudostrobus* y *P. michoacana*, además, se evaluó una especie arbustiva (*Retama sphaerocarpa*) conocida por favorecer el establecimiento de especies de sucesión tardía como las coníferas.

2.2. Pruebas de viabilidad

Las semillas de cada especie se colocaron en una solución de cloruro de tetrazolio al 0.5% a una temperatura de 30°C durante 24 horas. Previamente se les realizó un ligero corte en

el tegumento para facilitar la penetración del cloruro de tetrazolio. Se realizaron cuatro repeticiones de 10 semillas cada una. Al finalizar el tiempo, se retiraron las semillas de la solución y se les eliminó el tegumento para analizar la tinción del embrión. Se calculó el porcentaje de viabilidad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = (\# \text{ semillas viables} / \# \text{ semillas totales}) \times 100$$

2.3. Evaluación de germinación

Para esta evaluación se hidrataron las semillas en agua a temperatura ambiente durante 24 horas, posteriormente se colocaron 10 semillas en frascos con algodón húmedo, se realizaron tres repeticiones por especie. Se registró el porcentaje y tiempo de germinación de cada especie. Se consideró a la semilla germinada cuando mostraba la radícula. El porcentaje de germinación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ germinación} = (\# \text{ semillas germinadas} / \# \text{ semillas totales}) \times 100$$

2.4. Preparación del medio de cultivo

Para el cultivo *in vitro* se empleó medio WP (Woody Plant), un medio considerado como de baja concentración en sales y empleado para el cultivo de plantas leñosas (Lloyd y McCown, 1981), añadiendo una concentración de sacarosa de 20 g/L, y 7 g/L de agar (el pH se ajustó a 5.7-5.8 previo a la adición de agar). Para reducir la oxidación de los explantes se agregó carbón activado a una concentración de 3 g/L adicionado con 1 g/L PVP (polivinilpirrolidona). Posteriormente, se colocaron 20 ml de medio de cultivo por frasco y se esterilizaron a 15 libras de presión por 15 minutos. Las condiciones de incubación fueron de 26°C ± 2°C, fotoperiodo de 12 hrs luz/ 8 hrs oscuridad.

2.5. Pruebas de desinfección

Se evaluaron dos protocolos de desinfección para la siembra de semillas en cultivo *in vitro*.

Protocolo 1: las semillas de las cinco especies evaluadas se colocaron en agua común con unas gotas de jabón líquido comercial durante 10 minutos para quitar impurezas. Posteriormente se pasaron a una solución de alcohol etílico al 70% durante 1 minuto. Se evaluaron siete tratamientos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl al 0.5, 1 y 2%), a diferentes tiempos (10 y 15 minutos) más un control negativo (sin agente desinfectante), cada uno con cinco repeticiones (con cuatro semillas por frasco). A los siete días a partir de la siembra, se contabilizó el número de semillas que mostraron contaminación por algún agente patógeno (hongo o bacteria), con estos datos se calculó el porcentaje de contaminación por unidad experimental. Finalmente se obtuvo el porcentaje de contaminación promedio por especie.

Protocolo 2: las semillas fueron lavadas con agua corriente tres veces, se colocaron y reposaron en una solución de fungicida (Captan) a una concentración de 2 g/L por 30

minutos. Pasado el tiempo, se retiró el fungicida, las semillas se enjuagaron con agua destilada por cinco minutos, posteriormente se dejaron reposar en etanol al 70% por 10 minutos, al finalizar este tiempo se procedió a colocar las semillas a diferentes tratamientos, uno consistió en transferir las semillas a una solución de Microdyn (plata coloidal) a una concentración de 2 gotas por cada 10 ml; un segundo tratamiento consistió en añadir NaClO al 30% a las semillas por 20 minutos, también se utilizaron semillas sin tratamiento desinfectante como control. Finalmente, en ambos tratamientos se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril dentro de la campana de flujo laminar. Posterior a los siete días a partir de la siembra, se contabilizó el número de semillas que mostraron contaminación por algún agente patógeno, con estos datos se calculó el porcentaje de contaminación por unidad experimental. Al final, se calculó el promedio de contaminación por especie.

2.6. Tratamientos pre-germinativos

Una vez elegida la especie maderable con respecto a su viabilidad y germinación, se procedió a evaluar diferentes tratamientos pre-germinativos para romper la latencia de las semillas, estos fueron: 1) peróxido de hidrógeno al 30% por 1 h, 2) HCl 1% por 10 min, 3) hidratación a temperatura ambiente por 24 h, 4) lijado de semillas, 5) estratificación en algodón húmedo, 6) control (sin tratamiento pre-germinativo). Para las pruebas del tratamiento uno al cuatro, se utilizó medio WP sin reguladores de crecimiento.

Para la estratificación, las semillas fueron desinfectadas con el protocolo 2 e hidratadas en agua corriente durante 24 horas para después colocarlas entre capas de algodón humedecido dentro de cajas en condiciones estériles. Se evaluó el porcentaje de germinación total 20 días después de la aplicación de los tratamientos.

2.7. Análisis estadísticos

Se probó la normalidad de los datos, dado que estos si presentaban distribución normal, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para examinar las diferencias entre las medias obtenidas por los tratamientos.

3. Resultados y Discusión

3.1. Pruebas de viabilidad y evaluación de germinación

La especie con mayor porcentaje de viabilidad fue *R. sphaerocarpa* (100%), seguido de *P. michoacana* (61%), mientras que, *P. montezumae* se ubicó como la especie con menor viabilidad en sus semillas (37.5%).

Debido a que *Retama sphaerocarpa* no presentó variación en sus datos fue excluida del análisis de ANOVA, esta prueba indicó que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de viabilidad del resto de las cuatro especies maderables ($F= 2.148$; $df=3, 12$; $p=0.1474$).

En la Figura 1 se muestran los promedios de viabilidad, así como de germinación, de las semillas de las especies tratadas. En cuanto a viabilidad, todas muestran valores aceptables lo

cual indica que cualquiera de ellas puede ser utilizada, aunque, *Retama sphaerocarpa*, *P. michoacana*, *P. pseudostrabus* y *Cupressus lusitanica* presentaron los valores más altos.

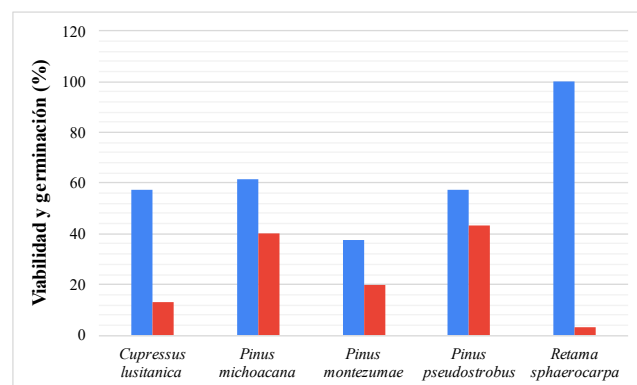


Figura 1: Viabilidad y germinación de las semillas.

En cuanto a germinación, de las cinco especies evaluadas, las semillas de *P. pseudostrabus* y *P. michoacana* mostraron mayores porcentajes (43.3% y 40%, respectivamente) en comparación con el resto de las especies. En cambio, *C. lusitanica* y *P. montezumae* mostraron porcentajes relativamente bajos, siendo estos del 13.3% y 20% de germinación.

R. sphaerocarpa tuvo el nivel de germinación más bajo (3.3%) a los 20 días de su colocación (Tabla 1). Sin embargo, el resultado del ANOVA indica que no existen diferencias significativas sobre el porcentaje de germinación entre las diferentes especies maderables (excluyendo los datos de *R. sphaerocarpa* debido a que la germinación fue baja) ($F=1.389$, $df=3,8$, $p=0.3149$).

En un estudio hecho por Arredondo y Espinoza (2021) se evaluó el porcentaje de viabilidad y de germinación en un lote de semillas de tres especies (*Pinus michoacana*, *P. montezumae* y *P. pseudostrabus*), con un tiempo de almacenamiento de 16 años. El estudio mostró diferencias entre los promedios de ambos porcentajes, siendo más altos en *P. michoacana* (74.34%) y más bajos en *P. montezumae* (64.66%); por otro lado, *P. pseudostrabus* se mantuvo con porcentajes cercanos a *P. michoacana* (73.81%). Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, considerando esto y debido a los altos porcentajes tanto de germinación como de viabilidad, las semillas de *P. michoacana* y de *P. pseudostrabus* tienen potencial para el cultivo *in vitro*.

3.2. Fase de desinfección

Con respecto al Protocolo 1, se obtuvo que todas las especies de pino presentaron contaminación por hongos (Tabla 1). Por otro lado, las semillas de *Cupressus lusitanica* y *Retama sphaerocarpa* mostraron poca contaminación a una concentración de hipoclorito de sodio al 1% por 15 minutos, predominando generalmente bacterias, y hongos en menor proporción. Lesney (1989), empleó la misma concentración de este desinfectante para esterilizar segmentos de 2 cm de tallo de individuos juveniles de *Pinus elliotii*, consiguiendo un

establecimiento aséptico, lo cual no fue posible en las semillas de este estudio.

Tabla 1: Resultados de los tratamientos de desinfección para el Protocolo 1

NaClO	Tiempo (min)	Porcentaje de contaminación				
		C.	P.		R.	
		<i>lusitanica</i>	<i>michoacana</i>	<i>montezumae</i>	<i>pseudostrobis</i>	<i>sphaerocarpa</i>
0.5%	10	30	100	100	100	40
	15	20	100	100	100	40
1%	10	20	100	100	100	30
	15	10	100	100	100	20
2%	10	20	100	100	100	20
	15	10	100	100	100	20
Control	N/A	30	100	100	100	50

En brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *caribaea* (De Feria *et al.*, 2008), el uso de una concentración de NaClO al 2% durante 20 minutos, generó daños en el tejido, aún cuando se utilizó ácido cítrico a una concentración de 500 mg/L para disminuir la fenolización.

Las semillas de pinos durante su almacenamiento pueden presentar hongos que deterioran su calidad, así lo demuestran Vázquez-López *et al.* (2021) en un estudio realizado con semillas de *Pinus montezumae* y *P. greggii*, donde concluyen que el almacenamiento de semillas con alta humedad relativa aumenta la incidencia de contaminantes fúngicos.

Los microorganismos pueden escapar de los agentes desinfectantes utilizados en cultivo *in vitro* ya que estos se aplican de forma superficial; la contaminación recurrente se presenta cuando esta infección está dentro del embrión o del tejido, existen microorganismos que no se llegan a presentar en las primeras fases del cultivo debido a la alta presión osmótica generada en el tren de desinfección, cambios de pH y el uso de algunas hormonas en el medio que pueden llegar a inhibir su crecimiento, más no eliminarlos completamente, es por esto que algunos microorganismos presentan un tiempo de adaptación a las nuevas condiciones de cultivo antes de manifestar su presencia (Hernández y González, 2010).

El hipoclorito de sodio es un agente químico comúnmente utilizado para la desinfección de diversos materiales en el ámbito doméstico, industrial y científico. Su utilidad recae en su letalidad para varios microorganismos, virus y bacterias vegetativas, sin embargo, se ha visto que es menos efectivo contra esporas, hongos y protozoarios. En algunos estudios se ha aplicado fungicida junto con el hipoclorito para frenar la contaminación por hongos (Hernández, 2018).

Debido a la contaminación fúngica presente en los pinos, las semillas se sometieron al Protocolo 2 (Tabla 2), donde se elevó la concentración de hipoclorito a la empleada por Hernández (2018).

Se logró disminuir la contaminación por hongos, no obstante, la presencia de bacterias fue persistente. De las tres especies de pino evaluadas con este protocolo, *Pinus michoacana* obtuvo un 20% de contaminación de tipo bacteriana, seguido de *P. pseudostrobis* (30%) y *P. montezumae* (40%). Por lo tanto, para las siguientes

evaluaciones se utilizaron semillas de *P. michoacana* aplicando el Protocolo 2 y empleando solución de plata coloidal.

Tabla 2: Resultados de los tratamientos de desinfección para el Protocolo 2

NaClO Microdyn	Porcentaje de contaminación		
	<i>P. michoacana</i>	<i>P. montezumae</i>	<i>P. pseudostrobis</i>
-	100	100	100
30% 2 gotas por 10ml	20	40	30
Control	100	80	100

En México, la plata coloidal (Pc) se usa como bactericida a partir de un brote de cólera ocurrido en 1993. Existen varias presentaciones comerciales de Pc (Biopur, Microdyn, Silverdin y Cromin) y se emplean principalmente como desinfectantes de agua, frutas y verduras (Coutiño-Rodríguez, 2015). Su aplicación a las semillas, en acción conjunta con el hipoclorito de sodio, permitió el mantenimiento de los cultivos con una reducción significativa de contaminación.

No siempre se ha optado por emplear NaClO como agente desinfectante. Lainé *et al.* (1988), en un estudio realizado con semillas de *Pinus oocarpa* y *Pinus patula*, ocuparon peróxido de hidrógeno al 30% para la desinfección de las semillas. Vázquez-Collazo (1996) realizó varios experimentos donde se aplicaron peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio en tres especies de pino (*Pinus michoacana*, *P. pseudostrobis* y *P. douglasiana*). Aunque el peróxido no es un buen desinfectante de la semilla de pino, a tiempos de exposición de 40 y 60 minutos, puede reducir la presencia de microorganismos epibióticos entre 8% y 15%.

El peróxido de hidrógeno es empleado en la agricultura para la desinfección de cultivos y también para acelerar el proceso de germinación de semillas, el oxígeno liberado por la descomposición del peróxido de hidrógeno en la agricultura queda disponible para la respiración mitocondrial de la planta, esa oxidación, además favorece que aparezcan grietas en las semillas duras (Khan *et al.*, 2018).

Se sugiere realizar estudios a profundidad sobre el efecto de estos dos últimos agentes desinfectantes en explantes de especies maderables para determinar si ocurre la oxidación de los tejidos y si existe una aceleración en el ritmo de germinación de semillas cultivadas *in vitro* y así poder establecerlos como agentes viables de desinfección para la micropropagación de especies leñosas.

3.3. Tratamientos pre-germinativos

Los tratamientos pre-germinativos no fueron adecuados para romper la latencia en semillas de *P. michoacana*, excepto al tratamiento 1 (peróxido al 30% por 1 hrs) con 5% de germinación. De acuerdo con Vázquez-Collazo (1996), las semillas de *P. michoacana* no presentan latencia, sin embargo, han sido descritas como semillas ortodoxas (Hong *et al.*, 1996), es decir, que aguantan grandes periodos de sequía y temperaturas bajas.

Se infiere que puede existir algún tipo de latencia fisiológica en las semillas de *P. michoacana*, ya que se observó germinación de las semillas, siendo del 15% a los 15 días con el tratamiento cinco de estratificación.

La latencia es un fenómeno biológico descrito como la incapacidad de una semilla viable para germinar, aún cuando las condiciones son favorables y adecuadas para la germinación. Se cree que este mecanismo es una forma de defensa para preservar al individuo ante condiciones no adecuadas para el desarrollo de la plántula (Varela y Arana, 2010). No obstante, para fines de producción de plántulas en vivero, la latencia representa un problema, puesto que en este escenario se requiere asegurar la germinación de las semillas.

La intensidad de la latencia está influenciada por varios factores ambientales como, por ejemplo, la temperatura, la humedad y el ambiente gaseoso; a medida que el grado de latencia disminuye, se amplía el rango de condiciones ambientales que permiten la germinación. Además de su dinamismo, la latencia puede ser agrupada en al menos cuatro categorías:

A) *Latencia por la cubierta de las semillas o exógena*. Puede ser química, física o mecánica. Se refiere a cuestiones de impermeabilidad, grosor de la testa o presencia de sustancias inhibitoras de germinación en la cubierta. B) *Latencia morfológica o endógena*. Abarca a aquellas causas que involucran la falta de maduración de embriones. C) *Latencia interna o fisiológica*. Ocurre cuando la latencia es controlada internamente, en el interior de los tejidos, por mecanismos fisiológicos. D) *Latencia combinada*. Diversas combinaciones de latencia (Varela y Arana, 2010).

La mayoría de los tratamientos aplicados en este estudio son tratamientos descritos para romper la latencia de tipo exógena (excepto el 5). En cambio, la estratificación es una manera de romper la latencia fisiológica de las semillas debido a que disminuye en los tejidos los niveles de ácido abscísico (ABA) y de otras sustancias inhibitoras de la germinación (Varela y Arana, 2010), los estratos que comúnmente utilizan arena, algodón, aserrín, turba o vermiculita, conservan la humedad, también se puede emplear en condiciones de frío o calor (Hartmann y Kester, 1977). Basil *et al.*, (2001) realizaron un estudio sobre ensayos de germinación empleando como tratamiento pre-germinativo la estratificación de semillas de *Pinus jeffrey*, *Pinus ponderosa* y *Pseudotsuga menziesii* a temperaturas bajas (3 a 5°C) durante 21, 40 y 60 días. Dentro de sus resultados destaca una variación importante en el promedio de germinación entre las semillas estratificadas y las no estratificadas, siendo las primeras las que presentaron mayor porcentaje de germinación a partir de los 21 días.

El cultivo y manejo de especies forestales presenta dos dificultades muy marcadas: la germinación escalonada y los porcentajes bajos de germinación ocasionados en muchos casos por mecanismos de latencia. Por ello, los tratamientos pre-germinativos ofrecen una buena opción y solución para el manejo de semilla, se recomienda la realización de estudios a profundidad para determinar protocolos específicos para tratar la latencia de las especies maderables.

4. Conclusión

Retama sphaerocarpa y *Pinus michoacana* fueron las especies que presentaron mayor viabilidad (100 y 61%, respectivamente), sin embargo, *P. pseudostrabus* y *P. michoacana* tuvieron mayor germinación (43.3 y 40%, respectivamente).

Para la desinfección de semillas, el protocolo 1 es efectivo únicamente para *Cupressus lusitanica* y *R. sphaerocarpa* reduciendo la presencia de patógenos hasta un 10 y 20%, respectivamente utilizando NaClO al 2% por 15 minutos. Para las semillas de *Pinus*, es importante incrementar la concentración de NaClO al 30% más el uso de plata coloidal para disminuir la presencia de agentes fúngicos al 20% en *P. michoacana*, 30% en *P. pseudostrabus* y 40% en *P. montezumae*.

Pinus michoacana es una especie con potencial para su propagación *in vitro*, sin embargo, se requiere romper la latencia de las semillas para lograr su germinación y posterior establecimiento. Se recomienda realizar estudios y ensayos para optimizar las fases de desinfección, germinación y establecimiento de especies maderables *in vitro*.

5. Referencias

- Arredondo, J. J. & Espinosa, U. (2021). Pruebas de germinación y viabilidad de tres coníferas a través del tiempo de almacén en el Banco de Germoplasma de la Comisión Forestal del Estado de Michoacán. E-CUCBA, (17), 124-130.
- Basil, G.; Leanza, M. & Honorato, M. (2001). Ensayo de germinación de semillas de pino con diferentes estratificaciones en frío. Patagonia Forestal. CIEFAP, Vol. 7(4):13-15.
- Borchert, R. (1967). The Cultivation of Tissues of *Cupressus lusitanica* *in vitro*. Physiologia Plantarum, 20: 608-616.
- Bridg, H. (2000). Micropropagation and determination of the *in vitro* stability of *Annona cherimolla* and *Annona muricata*. Humboldt. University of Berlin. 1-100.
- Coutiño-Rodríguez, E. M. (2015). Plata Coloidal: Xenobiótico, Antígeno y Disruptor Hormonal. REB. Revista de educación bioquímica, 34(1), 10-25.
- David, A., Laine, E. & David, E. (1995). Somatic embryogenesis in woody plants. Journal of Soil and Water Conservation 41(5): 317-320.
- de Feria, M., Chávez, M., Barbón, R., La O, M., Pérez, M., Jiménez-Terry, F., Quiala, E. & Agramonte, D. (2008). Establecimiento *in vitro* de brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *caribaea*. Biotecnología Vegetal, 8(1): 15-20.
- Galicia, L., Chávez-Vergara, B. M., Kolb, M., Jasso-Flores, R. I., Rodríguez-Bustos, L. A., Solís, L. E., Guerra de la Cruz, V., Pérez-Campuzano, E. & Villanueva, A. (2018). Perspectivas del enfoque socioecológico en la conservación, el aprovechamiento y pago de servicios ambientales de los bosques templados de México. Madera y bosques, 24(2), <https://doi.org/10.21829/myb.2018.2421443>
- Gupta, P. K., Timmis, R. T., Timmis, K., Grob, J., Karlson, W. & Welty, E. (1999). Advance in conifers technique improvement through somatic embryogenesis. En: Kazno, R. & Komamine, A. (eds.). Capítulo 29. Proceedings of the 12th Toyota Conference Challenge of Plant and agriculture Science to the crisis of biosphere on the earth in the 21th Century. pp: 33-39.
- Hartmann, H. & Kester, D. (1977). Propagación de plantas. Principios y Prácticas. Continental. México. 810 p.
- Hernández, H. M. (2018). Aislamiento y rescate de embriones de *Pinus patula*. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.
- Hernández, Y. & González, C. M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos Tropicales, 32(4), 00.
- Hong, T. D., S. Linington & R. H. Ellis. 1996. Seed Storage Behaviour: a Compendium. Handbook for Genebanks. Roma, (4).

- Jenq, Y., Jeng, C., Zenn C., Yang, J. C., Chung, J. D. & Cheng, Z. Z. (1994). Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and root cuttings. *Plant Cell Report* 15: 170-173.
- Khan, T. A., Yusuf, M., & Fariduddin, Q. (2018). Peróxido de hidrógeno en la regulación del metabolismo vegetal: Señalización y su efecto bajo estrés abiótico. *Photosynthetica*. 56: 1-12.
- Klimaszewska, K., Trontin, J. F., Becwar, M. R., Devillard, C., Park, Y. S. & Lelu, M. A. (2007). Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 1: 11-25.
- Lainé, E., David, H. & David, A. (1988). Callus formation from cotyledon protoplasts of *Pinus oocarpa* and *Pinus patula*. *Plant Physiology*. 72: 374-378.
- Lesney, M.S. (1989). Growth responses and lignin production in cell suspensions of *Pinus elliottii* elicited by chitosan or mycelium of *Cronartium quercuum* f. sp. fusiforme. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 23-31.
- Lloyd, G. & McCown, B. (1981). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators Society* 30:421-427.
- Perea, M. & Navarro, W. (1988). Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. Universidad Nacional, CONICIT. Bogotá, Colombia.
- Romero-Sánchez, M. E. (2016). Escenarios de Cambio Climático en el sector forestal. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 7(37), 4-6.
- Saborio, F., Dvorak, W. S., Donahue, J. K. & Thorpe, T. A. (1996). *In vitro* regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite*. *Tree Physiology*, (17): 787-796.
- Varela, S. A. & Arana, V. (2010). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. "Sistemas Forestales Integrados" Área Forestal - INTA EEA Bariloche, (3) 1-10.
- Vargas, O. (2008). Estrategias para la restauración ecológica del bosque altoandino: El caso de la Reserva Forestal Municipal de Cogua, Cundinamarca. Universidad Nacional de Colombia.
- Vázquez-Collazo I. (1996). Microorganismos asociados a la semilla de tres especies de pino y técnicas de desinfección. *Revista Ciencia Forestal en México*, 21 (79).
- Vázquez-López, M. S., Vázquez-Badillo, M. E., Antonio-Bautista, A. & Mancera-Rico, A. (2021). Hongos en semillas de *Pinus montezumae* Lamb. y *Pinus greggii* Engelm. Ex Parl. almacenadas bajo dos humedades relativas. *Revista Mexicana De Ciencias Forestales* 12 (66). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v12i66.689>