



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**FISIOLOGÍA VEGETAL**

## **GERMINACIÓN EN SEMILLA DE CHILE PIQUÍN** *(Capsicum annuum var. aviculare)*

**P R E S E N T A**

**ANAID CANO VÁZQUEZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2013**

La presente tesis titulada “Germinación en semillas de chile piquín (*Capsicum annuum* var. aviculare)”, realizada por la alumna Anaid Cano Vázquez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

---

Dr. Víctor A. González Hernández

ASESOR

---

Dra. Ma. Cristina Gpe. López Peralta

ASESOR

---

Dra. Hilda A. Zavaleta Mancera

ASESOR

---

Dr. Nicacio Cruz Huerta

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Octubre de 2013

## **GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE CHILE PIQUÍN (*Capsicum annuum* var. *aviculare*)**

Anaid Cano Vázquez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

El chile piquín es una planta silvestre que presenta ciertos mecanismos para asegurar la perpetuación de la especie. Dentro de estos mecanismos se encuentra la latencia de sus semillas. La germinación de las semillas de chile piquín presenta problemas para siembras intensivas comerciales. En este trabajo se planteó: 1) comparar diversas colectas en cuanto a su capacidad germinativa; 2) indagar si la baja germinación se debe a impermeabilidad en la semilla o a alguna característica estructural de la semilla; 3) encontrar un tratamiento de preacondicionamiento que mejore la germinación de la semilla y 4) probar la germinación *in vitro* como un método alternativo para obtener plántula en un corto tiempo. Para prevenir la interferencia de microorganismos durante la germinación, se definió un tratamiento de desinfección a base de Benlate® 0.4% + Microdyn® 0.05%. Con la prueba de tetrazolio se demostró que la baja germinación, en la mayoría de las colectas, no se debió a embriones dañados. Además la baja germinación no es causada por impermeabilidad al agua de la cubierta seminal o el endospermo, sino por la latencia del embrión. El ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) a 5 g L<sup>-1</sup> durante 24 horas mejoró la germinación de la semilla en la mayoría de las colectas, otros tratamientos no tuvieron efecto. No se encontró ninguna relación entre el tamaño de las estructuras seminales y el porcentaje de germinación. La forma promedio de las semillas de las colectas estudiadas fue redondeada, aplanada lateralmente y con un diámetro menor a 3 mm. La germinación *in vitro* tuvo mejores resultados aplicando 0.25 g L<sup>-1</sup> de ácido giberélico, pero con bajas tasas de germinación. Se requieren más ensayos *in vitro* para encontrar las condiciones de desinfección óptima que aumente la tasa y disminuya el tiempo de germinación.

Palabras clave: germinación, impermeabilidad, latencia, desinfección.

**CHILE PIQUIN (*Capsicum annum* var. *aviculare*) SEED GERMINATION**

Anaid Cano Vázquez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

Chile piquin is a wild plant and it has mechanisms to secure the species survival. Among these mechanisms, us the seed dormancy. Chile piquin seed germination imposes barriers for commercially intensive sowing. This research intended to 1) compare different samples on their germination capacity, 2) determine if low germination rates are affected by low seed permeability or by seed structural characteristic; 3) find a preconditioning treatment that improves seed germination; and 4) try *in vitro* germination as an alternative method, for quick seedling production. To prevent the microorganisms interference during germination, treatment with Benlate® 0.4 % and Microdyn® 0.05 % was implemented. The tetrazolium test demonstrated that low seed-germination for most samples, was not related to damaged embryos. In additionally low germination was not caused by water permeability restrictions at the seed coat or endosperm, but rather it was an effect of embryo dormancy. Gibberellic acid ( $GA_3$ ) at  $5 \text{ g L}^{-1}$  for 24 h improved seed germination in most chile piquin samples; other treatments had no effects. No relationship between seed structures and germination percentage was found. The average seed shape of the samples studied, was round and lateral flat with a diameter less than 3 mm. A disinfection protocol was established for *in vitro* sowing, and it worked for all tested chile piquin samples. *In vitro* germination tests improved by adding  $0.25 \text{ g L}^{-1}$  gibberellic acid, but more testing is required to determine optimal concentrations that increase germination the rates and decrease germination times.

Keywords: germination, permeability, dormancy, disinfection.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico a mí y a todas las personas que estuvieron presentes en esta parte de mi vida, porque todas ellas me ayudaron o me incentivaron a lograr esta meta.

A mi familia, amig@s y compañer@s, gracias por su cariño.

Y sin duda, a la Vida porque sin ella no estaríamos aquí.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento de mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados, por haberme dado la oportunidad de hacer mis estudios de maestría.

Al Patronato Czeslawa Prywer Lidzbarska, A.C., por la beca que me otorgó para concluir mis estudios y en especial al Dr. Héctor Lozoya Saldaña, Presidente del Patronato, por su apoyo para gestionar estos recursos.

A mi Consejo Particular, por su guía y por las facilidades otorgadas para la realización de los experimentos. Gracias por su apoyo en los momentos difíciles y por su paciencia.

Al Dr. Víctor Heber Aguilar Rincón, por proporcionarme semilla para las pruebas preliminares y conseguir las muestras de Tamaulipas a través del M.C. Moisés Ramírez Meraz en INIFAP.

Al Dr. Alfonso Gardea Béjar, por proporcionarme las muestras de Arizona.

Al Dr. Víctor A. González Hernández, por su apoyo e interés en que culminara mis estudios, además de su guía y ayuda. Gracias por su confianza en mí y su paciencia.

Al Dr. Nicacio Cruz Huerta, por proporcionarme las muestras de Tuxpan, además de su apoyo para el análisis de datos y revisión de esta tesis.

A la Dra. Hilda Zavaleta Mancera, por su guía durante la preparación de muestras para microscopía, toma de imágenes y por la revisión de este trabajo.

A la Dra. Cristina López Peralta, por su guía en los experimentos *in vitro* y por la revisión del presente escrito.

A. Iván Ramírez Ramírez, por su apoyo en el manejo de equipos del laboratorio de Fisiotecnia Vegetal y en el procesamiento de imágenes y gráficos.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Objetivos .....	2
1.2. Hipótesis .....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. La semilla.....	4
2.2. Desarrollo de la semilla .....	5
2.2.1. Cubierta seminal.....	6
2.2.2. Tejidos de almacenaje de nutrientes.....	7
2.2.3. El embrión .....	7
2.3. La germinación .....	8
2.3.1. Hidratación de la semilla .....	11
2.3.2. Síntesis de energía (ATP).....	11
2.3.3. Fitohormonas en la germinación .....	12
2.3.4. Factores que afectan la germinación .....	12
2.4. Latencia de las semillas .....	13
2.5. Morfología y anatomía de la semilla de chile.....	16
2.6. Cultivo <i>in vitro</i> .....	18
2.7. El cultivo de chile piquín en México .....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
3.1. Primera prueba de desinfección de la semilla.....	24
3.2. Segunda prueba de desinfección de la semilla.....	25
3.3. Prueba de viabilidad con tetrazolio.....	27
3.4. Cinética de imbibición.....	28
3.5. Evaluación de sustancias promotoras de germinación.....	30
3.6. Respuesta de las colectas a tratamientos promotores de la germinación.....	31
3.7. Metodologías para las observaciones anatómicas.....	32



3.7.1.	Cortes histológicos .....	32
3.7.2.	Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	33
3.7.3.	Tinción de polisacáridos insolubles (PAS).....	34
3.7.4.	Técnica de desgaste para la obtención del plano mediano de semillas secas.	34
3.7.5.	Medición de variables morfológicas.....	35
3.8.	Prueba de germinación <i>in vitro</i> .....	35
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
4.1.	Desinfección de la semilla .....	37
4.2.	Segunda prueba de desinfección.....	39
4.3.	Prueba de viabilidad con tetrazolio.....	40
4.4.	Cinética de imbibición y de distribución de biomasa .....	43
4.5.	Promotores de germinación .....	47
4.6.	Respuesta de las colectas a tratamientos promotores de la germinación.....	50
4.7.	Estructura de la semilla.....	59
4.7.1.	Cortes histológicos .....	60
4.7.2.	Fotografías con MEB (Microscopía electrónica de barrido).....	62
4.7.3.	Tinción de polisacáridos insolubles, APS. ....	62
4.8.	Germinación <i>in vitro</i> .....	67
5.	CONCLUSIONES .....	71
6.	APÉNDICE.....	73
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	74



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Relación de las colectas utilizadas para el estudio de germinación de chile piquín.	21
Cuadro 2. Tratamientos aplicados en la primera prueba de desinfección en semillas de chile piquín.	24
Cuadro 3. Tratamientos aplicados en la segunda prueba de desinfección en semillas de chile piquín.	26
Cuadro 4. Tratamientos promotores de germinación aplicados en semillas de chile piquín de la colecta Tuxpan.	31
Cuadro 5. Soluciones desinfectantes aplicadas a 15 colectas de chile piquín para su germinación <i>in vitro</i> .	36
Cuadro 6. Viabilidad de ocho colectas de chile piquín en función del porcentaje de tinción con tetrazolio en embriones de 30 semillas de cada procedencia.	41
Cuadro 7. Humedad (%) en la semilla de chile piquín de siete colectas durante 6 días de imbibición.	44
Cuadro 8. Peso seco (mg) de las estructuras de la semilla de chile piquín de siete colectas.	46
Cuadro 9. Análisis de varianza para germinación de semillas registrada en tres fechas (7, 14 y 21 días), de 16 colectas de chile Piquín.	51
Cuadro 10. Germinación en semillas de chile piquín de 16 colectas sin tratamiento (testigo).	53
Cuadro 11. Germinación en semillas de chile piquín de 16 colectas después de tratarlas con 5 g L <sup>-1</sup> de AG <sub>3</sub> .	54
Cuadro 12. Germinación en semillas de chile piquín de 16 colectas después de tratarlas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 3%.	56
Cuadro 13. Germinación en semillas de chile piquín de 16 colectas después de tratarlas con KNO <sub>3</sub> a -1.2 MPa por 24 h.	58
Cuadro 14. Dimensiones (áreas y perímetros) de las partes de la semilla en corte mediano. Las 10 colectas de chile Piquín se agruparon por capacidad de germinación.	64
Cuadro 15. Índices morfológicos y anatómicos de 10 colectas de chile piquín agrupadas por capacidad de germinación.	65
Cuadro 16. Curvatura del embrión y tres índices anatómicos de semilla de 10 colectas de chile piquín agrupadas por nivel de germinación.	66
Cuadro 17. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables anatómicas promedio de las 10 colectas de semillas de chile piquín evaluadas.	67
Cuadro 18. Germinación promedio en semillas de 15 colectas de chile piquín en cultivo <i>in vitro</i> .	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de los sitios de procedencia de las colectas de chile piquín empleadas en el presente estudio.....	22
Figura 2. Frutos de chile piquín provenientes de diferentes regiones de México.....	23
Figura 3. Embrión de la semilla de chile piquín completamente teñido (100 %) con tetrazolio.....	28
Figura 4. Estructuras de la semilla que se separaron por disección en el microscopio estereoscópico, para la cinética de imbibición.....	30
Figura 5. Reacción química de la tinción de Schiff (PAS).....	34
Figura 6. Contaminación en siete tratamientos de desinfección en semillas de chile piquín de la colecta Tuxpan.....	37
Figura 7. Germinación después de siete tratamientos de desinfección en semillas de chile piquín colecta Tuxpan.....	38
Figura 8. Contaminación registrada durante los primeros 5 días, después de aplicar cinco tratamientos de desinfección.....	39
Figura 9. Germinación de semillas de chile piquín después de recibir cinco tratamientos de desinfección de semilla.....	40
Figura 10. Patrones de tinción de los embriones con la prueba de tetrazolio.....	41
Figura 11. Semillas teñidas por 6 h con solución de tetrazolio a 0.1 %.....	42
Figura 12. Cinética de imbibición en semillas de chile piquín provenientes de Tuxpan, Ver. ....	43
Figura 13. Cambios en el peso seco de cada estructura de cuatro semillas de chile piquín procedente de Tuxpan.....	45
Figura 14. Cambios en el peso fresco de cada estructura de la semilla de chile piquín procedente de Tuxpan, Ver., durante la germinación.....	47
Figura 15. Cinética de germinación de semillas de chile piquín de la colecta Tuxpan después de ser sometida a cuatro tratamientos de promotores de germinación más un tratamiento testigo.....	48
Figura 16. Cinética de germinación de semillas de chile piquín provenientes de la colecta Tuxpan, Ver., en respuesta al polietilenglicol -1.2 MPa aplicado a tres tiempos de exposición.....	49
Figura 17. Cinética de germinación de semillas de chile piquín procedentes de Tuxpan, Ver., después de ser pre-acondicionadas osmóticamente con KNO <sub>3</sub> a diferentes niveles de concentración y tiempos de exposición.....	50
Figura 18. Porcentaje de germinación en semillas de chile piquín en respuesta a tratamientos promotores de germinación en promedio de 16 colectas.....	52
Figura 19. Germinación de semillas de chile piquín de 16 colectas, en promedio de los cuatro tratamientos promotores de germinación aplicados.....	52
Figura 20. Efecto del AG <sub>3</sub> en la germinación de semillas de chile piquín de 16 colectas..	55
Figura 21. Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la germinación de semillas de chile piquín de 16 colectas..	57

Figura 22. Efecto del $\text{KNO}_3$ en la germinación de semillas de chile piquín de 16 colectas. .....	59
Figura 23. <b>A</b> , Estructura de una semilla de chile piquín colecta Tuxpan sin tinción. Fotografía tomada con microscopio estereoscópico de laboratorio. <b>B</b> , Corte mediano de semilla de chile piquín colecta Tomatlán teñida con azul de metileno.. ..	60
Figura 24. Anatomía de la semilla de chile piquín de la colecta Tuxpan teñidas con safranina-verde fijo.....	61
Figura 25. <b>A</b> , Corte mediano de la semilla de chile piquín colecta Tuxpan. <b>B</b> , Corte mediano de la semilla de chile piquín colecta Tepic.....	62
Figura 26. Desgaste en el plano mediano de la semilla de chile piquín.....	63
Figura 27. Cultivo <i>in vitro</i> de semillas de chile piquín contaminadas por hongos. ....	68
Figura 28. Porcentaje de germinación por tratamiento. T1, testigo; T2, $0.25 \text{ g L}^{-1}$ ; T3, $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ; T4, $0.75 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{AG}_3$ .. ..	69
Figura 29. Semillas de chile piquín germinadas <i>in vitro</i> . .....	70

## 1. INTRODUCCIÓN

México cuenta con gran variedad de chiles (*Capsicum* spp.) y todos son empleados en la dieta diaria de la población, aunque sus grados de picor y sabor varían. La diversidad es tan amplia que se tienen chiles para cada tipo de platillo, desde el chile de árbol hasta el poblano para el consumo en fresco, y del piquín hasta el pasilla para consumo en seco (Rodríguez-del-Bosque, 2005).

Los chiles más consumidos generalmente son cultivados, aunque también hay algunas especies de amplio consumo que no han sido propiamente domesticadas y que se obtienen por medio de la recolección de plantas silvestres. Uno de estos casos es el chile piquín (*Capsicum annuum* var. *aviculare* L.), el cual se encuentra en casi todo el territorio nacional. El problema en esta forma de obtenerlo es que no hay control sobre las plantas colectadas y no se reponen esos genotipos naturales, lo que los pone en peligro de extinción (Bañuelos *et al.*, 2008).

En el norte del país hay algunas huertas que cultivan el chile piquín con fines comerciales, pero no se cuenta con información actualizada acerca de la producción y precios. Sólo se obtuvieron algunas cifras del año 2008, en las que la superficie sembrada se estimó en 685 ha y la producción total en 234 t (SIAP, 2013).

En cambio, en numerosos artículos científicos, congresos y notas científicas se han reportado estudios acerca de la dificultad para lograr la germinación de las semillas del chile piquín, dificultad atribuible a una condición de latencia o dormancia por tratarse de una especie silvestre, aunque también ha habido indicios de que la semilla tenga partes poco permeables al agua y aire, como la cubierta seminal y el endospermo, pues se ha reportado que mediante tratamientos de escarificación, hormonales u osmóticos se ha logrado incrementar sustancialmente el porcentaje de germinación (Araiza Lizarde *et al.*, 2011; Ramírez Meraz *et al.*, 2003).

Los tratamientos osmóticos regulan la hidratación de la semilla durante la imbibición, lo que favorece a algunos procesos metabólicos previos a la protrusión de la radícula y se logra rapidez, sincronización e incremento en la tasa de germinación. La magnitud de este efecto depende de la semilla, el soluto y su concentración (Marín Sánchez *et al.*, 2007).

En la diversidad reconocida del chile piquín están las variaciones morfológicas, como en el tamaño del fruto que es muy pequeño en los estados de Sonora y Tamaulipas, en comparación con los provenientes de los estados de Veracruz y Puebla. También se han reportado variaciones en características de planta y de semilla, que podrían influenciar la germinación (Hernández-Verdugo *et al.*, 2010).

Por los antecedentes mencionados, se decidió efectuar el presente estudio para identificar los factores fisiológicos y anatómicos que puedan afectar la germinación de la semilla de chile piquín derivada de colectas provenientes de diversas procedencias geográficas, con la intención de proponer tratamientos que promuevan dicho evento.

Los objetivos e hipótesis fueron los siguientes.

### **1.1. Objetivos**

- 1) Cuantificar la variación en germinación en semillas de diversas colectas de chile piquín.
- 2) Identificar si las bajas tasas germinativas son causadas por estructuras anatómicas que podrían dificultar el proceso de germinación en semilla de chile piquín, o por latencia de las semillas.
- 3) Definir la concentración de promotores de la germinación capaces de romper la latencia en la semilla de chile piquín como ácido giberélico ( $AG_3$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y nitrato de potasio ( $KNO_3$ ).
- 4) Comparar la respuesta germinativa de 15 colectas de chile piquín sometidas a promotores de la germinación.
- 5) Evaluar si el cultivo *in vitro* en medio semisólido mejora la germinación de la semilla de chile piquín, en comparación con la germinación tradicional.

## 1.2. Hipótesis

- 1) La cubierta seminal y el endospermo son una barrera que dificulta la germinación en la semilla de chile piquín, por ser de baja permeabilidad.
- 2) La germinación se favorece aplicando promotores como: ácido giberélico AG<sub>3</sub>, que promueve la liberación de enzimas para hidrolizar el almidón del endospermo; o soluciones con efecto osmótico, como el nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) y el polietilenglicol (PEG-8000).
- 3) Las características anatómicas de semillas de chile piquín varían entre colectas.
- 4) Por el control que permite, la germinación *in vitro* de las semillas favorece el porcentaje y la velocidad de germinación.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. La semilla

Una semilla se origina de la doble fecundación en las angiospermas, y se define como un óvulo maduro que consta principalmente de un embrión y reservas nutritivas, ambos protegidos por una cubierta seminal. Los nutrientes contenidos en la semilla proveen al embrión de los nutrientes necesarios para mantenerse vivo y durante la germinación, para reanudar el crecimiento hasta el momento en que sus primeras hojas puedan fotosintetizar (Esau, 1987).

Desde el punto de vista genético, una semilla consta de tres componentes: 1) un embrión proveniente de un cigoto, 2) un endospermo triploide formado por la fusión de dos núcleos polares con el segundo núcleo espermático, y 3) una cubierta seminal formada por los tegumentos provenientes del óvulo (Desai *et al.*, 1997).

La principal función de la semilla es la generación de un nuevo organismo para perpetuar la especie. Sus reservas nutritivas pueden encontrarse en el endospermo, perispermo o cotiledones, según la especie. Por estar las semillas en los frutos, los consumidores de frutos también funcionan como agentes dispersores de semillas. Por su parte, el hombre aprovecha los frutos y las diferentes estructuras seminales con fines económicos y alimenticios, además de obtener otros satisfactores como aceites, fibras y medicamentos (Desai *et al.*, 1997; Esau, 1987).

En especies dicotiledóneas, las reservas del endospermo ( $3n$ ) y perispermo ( $2n$ ) son consumidas por el eje embrionario y trasladadas a los cotiledones, cuando la semilla aún no se separa de la planta madre, de manera que tanto para mantenerse vivo como para la germinación, el embrión toma los nutrientes de sus cotiledones (Esau, 1987).

La mayor parte del volumen de la semilla es ocupado por el endospermo y el embrión, ya que la cubierta seminal suele ser pequeña en la mayoría de las especies. En la cubierta seminal, el micrópilo puede presentarse como un poro cerrado o bien puede estar obliterado; el hilio o *hiliium* es la cicatriz que deja el funículo cuando se separa del óvulo por abscisión (Esau, 1987).

La forma y el tamaño de las semillas presentan gran variación entre especies, desde las más pequeñas (tabaco, orquídeas) hasta las más grandes (nueces, cocos). Su forma puede ser redonda, ovalada, triangular, elíptica o irregular (Desai *et al.*, 1997).

Para caracterizar una semilla, en función de su apariencia externa, se deben observar las siguientes características: forma, tamaño, superficie de la cubierta seminal, ubicación del hilio, y presencia o ausencia de estructuras como arilo (excrecencia del funículo), carúncula (protuberancia tegumentaria cercana al micrópilo) o eliosoma (apéndice oleoso que es usado por las hormigas como alimento) (Esau, 1987).

## 2.2. Desarrollo de la semilla

En el momento de la fecundación el óvulo consta de una o dos cubiertas protectoras (los tegumentos  $2n$ ) y un tejido central (la nucela  $2n$ ). De este tejido se diferencia la célula madre de la megaspora ( $2n$ ), la cual mediante divisiones meióticas y mitóticas forma el saco embrionario formado por siete células. Durante la doble fecundación el tubo polínico entra por el micrópilo y avanza hasta llegar al saco embrionario, donde libera dos núcleos espermáticos. Un núcleo espermático ( $n$ ) se une con los núcleos polares ( $2n$ ) de la célula central del saco embrionario para formar el endospermo ( $3n$ ); el otro núcleo espermático ( $n$ ) se une con el núcleo de la ovocélula ( $n$ ) para formar el cigoto ( $2n$ ) que formará el embrión. Un caso especial de tejido de reserva es el perispermo ( $2n$ ), el cual es un tejido materno proveniente del tejido nucelar esporofítico. Para que se desarrolle una semilla viable es necesario que se produzca satisfactoriamente tanto la fecundación de la célula huevo como la triple fusión con los núcleos polares (Willan y FAO, 1991).

En el desarrollo del óvulo fecundado hasta convertirse en la semilla madura intervienen varias transformaciones, que yendo del exterior hacia el interior, son las siguientes:

1. Los tegumentos del óvulo se convierten en la cubierta seminal madura. El tegumento externo da lugar a la cubierta seminal y el tegumento interno da lugar al tegmen en la semilla madura. Agronómicamente se usa indistintamente el término testa y cubierta seminal, sin que éstas sean botánicamente lo mismo por ser de diferente origen (Corner, 1976). En general, la cubierta seminal protege el



contenido de la semilla de la desecación, los daños mecánicos o los ataques de hongos, bacterias e insectos, hasta que se abre en la germinación.

2. En algunos géneros puede persistir la nucela como tejido de reserva en la madurez, en forma de una capa delgada (el endospermo) situada en la parte interna de la cubierta que suministra reservas nutritivas al embrión. En la mayoría de las angiospermas, en cambio, la nucela es consumida en las primeras etapas del desarrollo del embrión. El endospermo crece con rapidez después de la fecundación. Acumula reservas y en su máximo desarrollo es rico en carbohidratos, grasas, proteínas y hormonas del crecimiento (Kozłowski, 1971). En algunas especies el endospermo es evidente y continúa ocupando más espacio en la semilla que el embrión, aun en las semillas maduras. En otras especies, el embrión va absorbiendo las reservas nutritivas del endospermo durante sus últimas fases de desarrollo, hasta que éste desaparece cuando la semilla está madura (Bewley y Black, 1994).
3. En los embriones de algunas especies se pueden distinguir todas las partes de la planta rudimentaria como la radícula, que en la germinación dará lugar a la raíz primaria; las primeras hojas o cotiledones; la plúmula, de la que surgirá el tallo primario; y el hipocótilo, región entre el nudo cotiledonar y el cuello de la radícula. Cuando el embrión absorbe todas las reservas nutritivas del endospermo, los cotiledones gruesos y carnosos suelen convertirse en los principales órganos de almacenamiento de alimento y ocupar casi toda la semilla (Willan y FAO, 1991).

### **2.2.1. Cubierta seminal**

La cubierta seminal protege a la semilla de los factores ambientales adversos y a la vez está relacionada con algunos procesos biológicos como la germinación (Esau, 1987).

La cubierta seminal puede inhibir la germinación al impedir la entrada de agua y oxígeno en algunos géneros como *Fraxinus* y *Crataegus* porque presentan un alto grado de dureza en sus cubiertas seminales, causada por la presencia de capas cuticulares y compuestos fenólicos (Esau, 1987; Salisbury y Ross, 1994).

El balance entre los inhibidores y los promotores del crecimiento determinan el grado de latencia de una semilla y se pueden localizar en la pared del fruto o en la cubierta seminal,

de tal forma que si se eliminan estas estructuras se favorece la germinación. Las cubiertas seminales son de características variables de acuerdo con su hábitat para que favorezca su dispersión, ya sea por medio de apéndices que pueda mover el viento o que tengan cubiertas mucilaginosas para adherirse a animales o ser tragados y excretados en otro lugar (Esau, 1987; Salisbury y Ross, 1994).

### **2.2.2. Tejidos de almacenaje de nutrientes**

Los carbohidratos, lípidos, proteínas y otras sustancias nutritivas se almacenan en diferentes tejidos de la semilla, como cotiledones, endospermo o perispermo, y son vitales para la supervivencia del embrión (Hartmann *et al.*, 1990).

El endospermo no se considera esporofito ni gametofito; es un tejido triploide ( $3n$ ) que le da mayor capacidad de síntesis de proteínas (Esau, 1987).

Durante la germinación, los granos de almidón se consumen por hidrólisis mediante la actividad de las enzimas fosforilasa,  $\alpha$ -amilasa y maltasa. La energía para estos procesos es provista en forma de ATP por las mitocondrias. En algunas semillas, las reservas de carbohidratos aparecen como paredes engrosadas compuestas generalmente de hemicelulosas. Las proteínas almacenadas son de tipo globulinas y se sintetizan durante el desarrollo de la semilla junto con los carbohidratos o lípidos de reserva. Durante la germinación, las proteínas se disuelven *in situ* y los cuerpos proteicos son reemplazados por vacuolas que pueden fusionarse para dar lugar a una gran vacuola. Las proteínas de reserva son degradadas a aminoácidos por las enzimas proteinasas y peptidasas (Esau, 1987).

En el citoplasma de los cotiledones se encuentran los cuerpos lipídicos también llamados esferosomas. Los lípidos que se encuentran en las semillas son de tipo triglicéridos, que son degradados por las lipasas para dar como resultado glicerol y ácidos grasos. Los ácidos grasos son utilizados para la síntesis de fosfolípidos y glucolípidos, los cuales se requieren para el crecimiento de la plántula (Esau, 1987; Hartmann *et al.*, 1990).

### **2.2.3. El embrión**

En una semilla el embrión adquiere diferentes tamaños y orientaciones. Según la especie en cuestión, puede ser recto, inclinado o curvo. También varía el grado de desarrollo del

embrión, lo que resulta en embriones con hipocótilos largos o cortos, y cotiledones delgados o carnosos, dependiendo de su papel en el almacenamiento de nutrientes. El epicótilo puede presentarse como un meristemo o como las primeras hojas verdaderas y sus nudos. La raíz puede presentarse como meristemo apical o como radícula (Esau, 1987).

El procámbium del futuro sistema vascular aparece en el eje embrionario y es continuo entre el eje y los cotiledones. En algunas especies en el eje embrionario se distinguen las iniciales del xilema y del floema. La epidermis joven o protodermis constituye la capa superficial. El tejido fundamental se distingue del procámbium por sus células menos alargadas y más anchas, pero ambos tipos de células se encuentran llenas de productos de almacenamiento en el embrión maduro latente (Esau, 1987; Salisbury y Ross, 1994).

En la germinación comienza el desarrollo de las células conductoras del procámbium lo cual se relaciona con diversos procesos fisiológicos. En algunas especies, cuando se establece la conexión vascular entre el eje y los cotiledones, el embrión produce estímulos que activan el metabolismo en los cotiledones y ocurre la movilización de nutrientes para el crecimiento del eje y la protrusión de la radícula (Esau, 1987). En el caso del chile piquín las reservas se movilizan del endospermo hidrolizado hacia el embrión.

### **2.3. La germinación**

El proceso de la germinación marca el inicio de una nueva generación y puede ser definido como la serie de eventos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que permiten que la nueva planta se establezca y complete su ciclo de vida (Bernal, 1994).

La germinación se compone de diversos eventos por lo que puede tener varias definiciones en función del punto de vista que se use. Morfológicamente es la transformación de un embrión en una plántula, que inicia con la protrusión de la radícula; fisiológicamente es la reactivación del crecimiento de un embrión, el cual fue suspendido durante la desecación de la semilla; bioquímicamente es la diferenciación secuencial de las vías metabólicas tanto oxidativas como sintéticas (Bernal, 1994).

Los procesos fisiológicos de crecimiento exigen actividades metabólicas aceleradas, y en el caso de la germinación es el aumento de actividad respiratoria de la semilla. Por tal motivo,

el embrión requiere de nutrientes suficientes que obtiene por medio de la movilización de las reservas alimenticias contenidas en el endospermo, para atender el aumento en la actividad metabólica (Palacios Román, 2000).

La germinación inicia con la imbibición y finaliza con el inicio de la elongación del eje embrionario, principalmente la radícula. Se considera que una semilla ha germinado cuando la radícula protruye a través de la cubierta seminal. Por lo tanto, incluye numerosos eventos como hidratación de proteínas, cambios de estructuras subcelulares, respiración, síntesis de macromoléculas y alargamiento de células, ninguno de los cuales por sí solo determina la germinación. Pero sus efectos combinados transforman un embrión en reposo y deshidratado, con metabolismo apenas detectable, en uno que tiene un metabolismo vigoroso que culmina en el crecimiento (Bewley y Black, 1994).

Fisiológicamente la germinación comprende cuatro fases (Berrie, 1984):

- Imbibición de agua
- Elongación celular
- División celular
- Diferenciación de células y tejidos

Desde el punto de vista fisio-bioquímico se consideran las siguientes etapas (Berrie, 1984):

- Rehidratación
- Aumento de respiración
- Formación de enzimas
- Digestión enzimática de reservas
- Movilización y transporte de reservas
- Asimilación metabólica
- Crecimiento y diferenciación de tejidos

Para que la germinación ocurra se requiere lo siguiente (Berrie, 1984) :

- Semilla viable
- Agua, temperatura, oxígeno y luz adecuados
- Semilla sin latencia
- Ausencia de agentes patógenos en la semilla y el medio.

Es indispensable que las semillas almacenadas mantengan su porcentaje mínimo de humedad para conservarse vivas, ya que cualquier falta de humedad o exceso de temperatura puede resultar en la pérdida de vigor y viabilidad, debido a que se descomponen las macromoléculas, los organelos celulares se destruyen y se afecta la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Sin embargo, los sistemas enzimáticos relacionados con la síntesis de las macromoléculas se reactivan durante la germinación (Bernal, 1994).

La temperatura también tiene influencia sobre la germinación y se pueden identificar tres puntos críticos: 1) temperatura mínima, aquella por debajo de la cual la germinación no es visible por un tiempo razonable. 2) temperatura máxima, por encima de la cual no hay germinación. 3) temperatura óptima, aquella a la cual germina el mayor número de semillas en un período de tiempo mínimo. Los efectos de la temperatura sobre la germinación pueden ser muy influenciados por la condición fisiológica de la semilla (Berrie, 1984).

En Chile manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz&Pav.) se observó que el porcentaje de germinación es mayor cuando se incuban las semillas a temperaturas cercanas a 20 °C. Esto se sustenta teóricamente con el origen de esta especie que proviene de zonas frías, y por lo tanto es tolerante a bajas temperaturas. Lo cual también explica su alta sensibilidad a tratamientos de inmersión en agua caliente, ya que las semillas tratadas de esta forma presentaron un porcentaje de germinación disminuido en comparación con el testigo. De esta forma se infiere que es importante que las temperaturas de incubación y de tratamientos aplicados, sean reguladas para cada especie de acuerdo con las condiciones que prevalecen en su sitio de origen (Jiménez *et al.*, 1991).

Los reguladores de crecimiento en las plantas, como son auxinas, etileno, giberelinas, ácido abscísico, citocininas y brasinosteroides son sustancias que tienen efecto en los procesos

involucrados con el crecimiento y desarrollo de las plantas (Taiz y Zeiger, 2010). El balance hormonal de la semilla es complejo debido a que algunos de sus tejidos son de origen materno y otros tejidos provienen de los dos progenitores como el endospermo (3n) y el embrión (2n). Por lo tanto, sus genotipos son de origen materno o paterno, y cada uno controla la síntesis de diferentes hormonas en los tejidos seminales (Taiz y Zeiger, 2010).

### **2.3.1. Hidratación de la semilla**

En general, la cantidad total de agua tomada durante la imbibición no excede de dos a tres veces el peso seco de las semillas. La imbibición depende de varios factores, como el movimiento del agua hacia la semilla que depende principalmente del gradiente de potencial de agua y de la permeabilidad de la cubierta de la semilla. El principal componente que absorbe agua es la proteína, aunque también la celulosa y las sustancias pécticas son hidrofílicas (Murray, 1984).

Durante el proceso de la germinación, la hidratación de la semilla se realiza en tres fases: dos fases de rápida ganancia de agua separadas por una fase lenta o *lag*. La primera está asociada con la imbibición inicial y la segunda con el crecimiento de la radícula. La extensión de la fase *lag* depende de la especie de la semilla y de la temperatura a la cual se realiza la hidratación. Aun cuando la imbibición de agua puede ser despreciable durante esta fase, la semilla no es inactiva puesto que durante esta fase se reactivan los sistemas metabólicos existentes y da como resultado un aumento en el metabolismo basal (Bernal, 1994).

### **2.3.2. Síntesis de energía (ATP)**

La germinación es un proceso que requiere energía para el crecimiento y división celular. El embrión de una semilla contiene las enzimas, los sustratos y los cofactores para la síntesis *de novo* de ATP (Bernal, 1994).

Según Hartmann *et al.* (1990), la energía necesaria para la síntesis de enzimas proviene del ATP contenido en la mitocondria, el cual es reactivado cuando comienza la imbibición de la semilla, aun cuando la semilla presente latencia. A medida que la semilla se hidrata, las

mitocondrias maduran y aumentan su eficiencia en la fosforilación; este aumento, al menos en chícharo, es el resultado del transporte de proteínas preexistentes en el citoplasma hacia la membrana mitocondrial (Bernal, 1994).

### **2.3.3. Fitohormonas en la germinación**

El ácido abscísico (ABA) tiene un rol fundamental en la iniciación y mantenimiento de la latencia de semillas y yemas, así como en la respuesta al estrés principalmente hídrico, además de que el ABA es antagónico a hormonas promotoras del crecimiento como auxinas, giberelinas, etileno y brasinosteroides (Taiz y Zeiger, 2010).

Lambers *et al.* (2008) señalaron que durante el desarrollo del embrión en la planta madre se incrementa el contenido de ABA, como un factor que previene la germinación precoz. La inducción y liberación de latencia en la semilla implica cambios en la concentración de ABA, mientras que el ácido giberélico (AG) presenta un efecto contrario al ABA dado que éste disminuye el crecimiento potencial del embrión y el AG lo estimula, por lo que la relación ABA:AG regula la inducción y liberación de la latencia fisiológica; por ello la liberación de la latencia va acompañada por un incremento en la concentración de AG. Los mismos autores consideran que la cubierta seminal dura o el endospermo impenetrable de la semilla puede ser un factor mecánico que impida la germinación al actuar como barrera al paso del agua (Hartmann *et al.*, 1990; Lambers *et al.*, 2008).

### **2.3.4. Factores que afectan la germinación**

El primer requerimiento para que ocurra la germinación de la semilla viable y sin latencia, es la disponibilidad de agua para que los tejidos seminales se rehidraten y reactiven su metabolismo. Debido a que la respiración depende del nivel de hidratación, es importante que haya suficiente humedad disponible para que se pueda sostener el crecimiento del embrión (Berrie, 1984). La rehidratación o imbibición se debe a la difusión de agua que ocurre cuando las semillas la absorben, y se caracteriza por un aumento en el volumen de la semilla y liberación de calor (Palacios Román, 2000).

Los tejidos seminales absorben agua a diferentes velocidades; el tegumento absorbe a una velocidad menor que otras estructuras de la semilla y funciona como transportador intermedio de agua del exterior al interior de la semilla. El embrión absorbe agua más



rápidamente y de forma continua. La velocidad de hidratación varía según la especie, permeabilidad del tegumento, disponibilidad de agua, temperatura, presión hidrostática, área de contacto semilla-agua, fuerzas intermoleculares, composición química y condición fisiológica (Bewley y Black, 1994).

Una semilla madura tiene el porcentaje de humedad necesario para mantenerse viva con mínima actividad, pero una vez que se coloca a imbibición se reactiva su metabolismo y aumenta el consumo de oxígeno por respiración, y a partir de este momento se pueden distinguir las siguientes cuatro etapas en su respiración (Azcón-Bieto, 1996).

- 1) Abarca las primeras 12 h de imbibición en las cuales se presenta un rápido incremento en la respiración. En esta etapa se consume sacarosa como sustrato de la respiración.
- 2) Entre las 12 y 24 h de imbibición se estabiliza la respiración. Para favorecer la entrada de oxígeno se pueden eliminar las cubiertas seminales.
- 3) Al emerger la radícula se favorece la entrada de oxígeno y aumenta la respiración. Dicho incremento respiratorio también se relaciona con la actividad de las mitocondrias que se sintetizan en las células del embrión.
- 4) Los tejidos de reserva se desintegran por la movilización de nutrientes que éstos aportan y la respiración disminuye.

#### **2.4. Latencia de las semillas**

Se define latencia como un estado que no permite a la semilla germinar aun cuando tenga condiciones favorables para la germinación, porque está bloqueado el proceso. La latencia puede ser eliminada o interrumpida mediante la adición de factores específicos (hormonales, térmicos, osmóticos, etc.). El rompimiento de la latencia en condiciones naturales puede ocurrir de manera gradual en semanas, meses o años (Desai *et al.*, 1997); Lambers *et al.* (2008).

La latencia de la semilla es un factor importante en la adaptación de las plantas a ambientes desfavorables, donde el ABA juega un rol importante como inductor del estado latente. Se



reconocen dos tipos de latencia en la semilla: la causada por la cubierta seminal y la intrínseca. La latencia causada por la cubierta seminal incluye al endospermo, pericarpio u órganos extra florales, que retrasan la germinación, de modo que el embrión puede germinar hasta que los tejidos que rodean al embrión sean removidos o dañados y se favorezca el ingreso de agua y oxígeno (Taiz y Zeiger, 2010).

Se conocen cinco tipos de latencia por la cubierta (Hartmann *et al.*, 1990; Taiz y Zeiger, 2010):

1. Prevención del ingreso de agua.
2. Restricción mecánica, donde la cubierta seminal impide el paso de la radícula, y para que la semilla germine es necesaria la acción de enzimas que degraden la pared celular del endospermo.
3. Interferencia con el intercambio de gases. La cubierta seminal impide el ingreso de oxígeno al embrión.
4. Retención de inhibidores. La cubierta impide la salida de los inhibidores de la semilla.
5. Acumulación de inhibidores. Las cubiertas de la semilla y pericarpio pueden contener concentraciones relativamente altas de inhibidores, como ABA, los que pueden suprimir la germinación del embrión.

El segundo tipo de latencia es la intrínseca del embrión debido a la presencia de ABA o la ausencia de AG, por lo que la latencia se perderá si la relación de AG:ABA se incrementa. En la naturaleza hay semillas que al separarse de la planta madre ya presentan latencia, a la cual se le denomina latencia primaria; y también hay semillas que al separarse de la planta madre ya están listas para germinar pero al encontrar condiciones ambientales desfavorables entran a un estado de latencia, a la cual se le llama latencia secundaria (Hartmann *et al.*, 1990; Taiz y Zeiger, 2010).

Por su parte, Lambers *et al.* (2008) refieren que la latencia fisiológica se debe tanto a mecanismos fisiológicos dentro del embrión como a las estructuras que la rodean, como son el endospermo y la cubierta seminal que evitan la emergencia de la radícula. Así mismo



estos autores consideran que en las semillas con estructuras impermeables al agua, la absorción de ésta sólo puede ocurrir cuando la cubierta se deteriora o daña, y apuntan que en algunas especies de cubierta seminal dura las células en empalizada cierran de manera efectiva la abertura por donde entrará el agua, mientras que en las semillas de cubierta seminal blanda queda una abertura para el ingreso del agua. En especies de cubierta seminal dura que no tienen problema para germinar, ese tipo de cubierta seminal sólo tiene la función de proteger a la semilla, pero en algunas semillas que carecen de cubierta dura la barrera mecánica la pueden constituir las capas del endospermo (Desai *et al.*, 1997; Lambers *et al.*, 2008).

Taiz y Zeiger (2010) apuntan que el ABA inhibe la producción de AG necesario para promover la formación de enzimas hidrolíticas que debilitan las capas del endospermo y activan el crecimiento del embrión, por lo que el AG es utilizado para romper el estado de latencia de las semillas; los autores añaden que de manera natural existen tres factores que en muchos casos liberan a las semillas de la latencia: la acción de la luz, la deshidratación, y el enfriamiento.

Existen varias formas de inducir la ruptura de la latencia, las cuales dependen del tipo de latencia. Sin embargo, en general, incluyen por modificación del balance hormonal entre AG y ABA y el uso de soluciones osmóticas, y por escarificación mecánica o con corrosivos (Hartmann *et al.*, 1990).

Bonfil-Sanders *et al.* (2008) encontraron que la germinación de semillas de *Bursera* fue más sincronizada y rápida con aplicaciones de una solución de 150  $\mu\text{g g}^{-1}$  (ppm) de citocinina 6-benzyl-aminopurina que con la escarificación con ácido clorhídrico.

En Chile (*Capsicum annuum*), García Federico *et al.* (2004) hallaron que la mejor germinación ocurrió al tratar la semilla con una mezcla de AG<sub>3</sub> y ácidos húmicos (82 %), seguida de la semilla que se trató con AG<sub>3</sub> solamente (68 %), y por el tratamiento de inmersión en agua (33 %).

Una de las principales limitantes para la explotación comercial de algunos cultivares de Chile piquín es la dificultad para inducir la germinación de la semilla. Al respecto se sabe que hay tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas

eficientes para revigorizar semillas envejecidas, acelerar y uniformizar la germinación e incrementar los rendimientos de los cultivos bajo condiciones óptimas y adversas (Bradford, 1986; Burgass y Powell, 1984).

Las sustancias aplicadas en los tratamientos pregerminativos son soluciones osmóticas y agua. Se dividen en dos grupos: el primero formado por las soluciones compuestas por un polímero de alto peso molecular (de 100 a 20,000 Da) conocido como polietilenglicol (PEG) o Carbowax (Gray *et al.*, 1991), y el segundo formado por mezclas de fosfato tripotásico ( $K_3PO_4$ ) y  $KNO_3$  (Rehman *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1989). Por otro lado están las soluciones con hormonas como el  $AG_3$  y las auxinas (Araiza Lizarde *et al.*, 2011).

## 2.5. Morfología y anatomía de la semilla de chile

La semilla de chile (*Capsicum annuum*) tiene una estructura plana, con grosor de 1 mm y diámetro de 5.3 mm (Chen y Lott, 1992), y la cubierta tiene un grosor promedio de  $85 \mu m \pm 4$  (Beresniewicz *et al.*, 1995a). La cubierta de la semilla de chile es más gruesa que la de otras semillas de hortalizas, como las de cebolla, nabo (cubiertas muy delgadas), tomate y col (cubiertas de grosor intermedio) (Beresniewicz *et al.*, 1995a).

En el interior de la cubierta seminal, el endospermo rodea al embrión curvo que consiste de un eje hipocótilo radicular y dos cotiledones. Las células del tejido embrionario tienen una delgada pared celular primaria que tiñe con PAS (ácido peryódico de Schiff) para carbohidratos y con rojo Congo para  $\beta$ -glucano. La tinción con lugol es negativa, lo que indica ausencia de almidones en las células del embrión y endospermo. La tinción con sulfato azul Nilo, negro Sudan B y tinción fluorescente azul Nilo A, para lípidos son positivas. La tinción con azul brillante Coomasie y azul bromofenol-mercurio es positiva para proteínas. Las principales sustancias de reserva para el endospermo son proteínas y lípidos, al igual que en el embrión (Chen y Lott, 1992).

La permeabilidad de la cubierta seminal es un factor determinante para la germinación ya que el agua absorbida activa el metabolismo de la semilla. En el caso de la col, la cubierta seminal permite la absorción de cloruro de tetrazolio y la salida de aminoácidos. En tomate



y chile se presenta un alto grado de impermeabilidad al movimiento de solutos, mientras que el nabo y la cebolla presentan impermeabilidad intermedia (Beresniewicz *et al.*, 1995a).

Las tasas de hidratación también han sido estudiadas y se ha observado que en las primeras 4 h fueron similares para nabo, col, tomate y chile, pero no para cebolla en donde fue notablemente más baja (Beresniewicz *et al.*, 1995b).

La capa semipermeable está presente en cubiertas seminales de nabo y cebolla (Liliaceae) y en chile y tomate (Solanaceae). La capa semipermeable está ubicada en la capa más interna de la cubierta seminal, junto al endospermo. A nivel ultraestructural esta capa es similar para todas las especies, típicamente amorfa, altamente compacta, pero fácilmente distinguible entre la cubierta seminal y el endospermo. La capa semipermeable en tomate y chile evita la salida de aminoácidos, la absorción de tetrazolio y de lantano. El grosor de la cubierta seminal de chile y tomate le confieren mayor resistencia a daños mecánicos. El lantano no es detectado en la capa semipermeable de estas semillas, lo cual prueba que poseen una fuerte barrera al movimiento de solutos (Beresniewicz *et al.*, 1995a).

La naturaleza química de la capa semipermeable es la responsable de la impermeabilidad a diversos solutos. En cebolla (*Allium cepa*), nabo (*Allium ampeloprasum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y chile (*Capsicum annuum*) no se ha detectado la presencia de calosa, lignina ni celulosa, según análisis histoquímicos. La presencia de polisacáridos y pectinas en la capa semipermeable de nabo y cebolla y su ausencia en tomate y chile, podría indicar que existe una capa intermedia de suberina. Se ha observado que la capa semipermeable de nabo y cebolla está compuesta de cutina, mientras que la de tomate y chile está compuesta de suberina (Beresniewicz *et al.*, 1995b).

En el caso de la cebada (*Hordeum vulgare*) se ha observado que el grano está cubierto por una membrana fuertemente cuticularizada, excepto en la región calazal y micropilar. Esta membrana podría destruirse con una solución de potasio cáustico. En estudios con zacate Johnson (*Sorghum halepense*) se ha visto que el tegumento más interno está altamente suberizado e impregnado con grasas, especialmente en las paredes más internas; esto sugiere que suberina, lípidos y taninos incrementan la dureza pero disminuyen la

permeabilidad de la cubierta seminal. En cubiertas seminales de *Cucurbita pepo* la membrana más interna está cutinizada y funciona como una barrera para restringir el intercambio de gases y humedad. La barrera semipermeable en el caso de lechuga (*Lactuca sativa*) ha sido atribuida al endospermo y el compuesto responsable de su impermeabilidad es la celulosa (Beresniewicz *et al.*, 1995b).

El grado de impermeabilidad puede estar relacionado con la composición química de la capa semipermeable. De acuerdo con varios experimentos realizados puede concluirse que la suberina es una barrera más fuerte a la difusión de solutos y humedad que la cutina (Beresniewicz *et al.*, 1995a).

## **2.6. Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* ha permitido generar nuevos individuos a partir del explante que se define como una pequeña porción del tejido vegetal que funciona como generador de nuevas plantas en el cultivo *in vitro*; la fuente del explante es la planta u órgano. Ello es debido a la capacidad que tienen las células somáticas de diferenciarse en una planta nueva y completa bajo "ciertas condiciones experimentales" (totipotencialidad celular). Con esta técnica es posible controlar los factores ambientales externos (fotoperiodo, temperatura, humedad relativa) así como la asepsia, el medio de cultivo, los nutrientes disponibles, fitohormonas, etc. Es posible aplicar el cultivo *in vitro* de embriones maduros en medio de cultivo básico con sales inorgánicas y sacarosa, o con adición de fitohormonas para embriones inmaduros (Hartmann *et al.*, 1990).

El cultivo *in vitro* de embriones es útil para rescatar embriones que han sido abortados antes de que la semilla alcance la madurez. También es posible germinar semillas maduras en cultivo *in vitro* para probar diferentes condiciones de desinfección, con la finalidad de obtener la germinación de la semilla y en algunos casos a partir de ella obtener explantes libres de patógenos y asegurar la generación de plántulas sanas (Hartmann *et al.*, 1990).

## 2.7. El cultivo de chile piquín en México

El nombre común del chile piquín o chile del monte es propio de algunas regiones de México, en particular el noreste. Existen otros nombres para este tipo de chile silvestre de acuerdo con la zona del país, por ejemplo: chiltepín (Sonora), quipín, chiltecpin, chiltepiquín, chiltepe, chilpaya, tlichile, pico de pájaro, diente de perro, diente de tlacuache, mosquito, silvestre, pulga, enano, bird pepper, etc. (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004). El fruto de este chile es apreciado por la población y bien cotizado, gracias a su sabor y a que puede ser consumido sin irritar el sistema digestivo (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004).

Diversos taxónomos han denominado esta variedad con distintos nombres, como los siguientes: variedad *minus* (Figherhut), *baccatum* (Terpó), *minimum* (Heiser y Pickersgill), *aviculare* (D'Arcy y Eshbaugh) y *glabriusculum* (Heiser y Pickersgill) (Bañuelos *et al.*, 2008).

El chile piquín es un arbusto perenne que crece de forma silvestre y produce un fruto de tipo baya redonda de color verde con alto contenido de clorofila, de 3 a 6 mm de diámetro. Al madurar los frutos se tornan de color rojo intenso, debido a las licopersinas que atraen a las aves que los consumen (Bañuelos *et al.*, 2008).

Se desarrolla en suelos de tipo vertisol y rendzina, de texturas migajón-arcillosa, bien drenados, con alto contenido de materia orgánica y poca pendiente. En forma silvestre, las plantas se ubican en altitudes menores a 1,300 m, con precipitaciones anuales de más de 500 mm y temperatura media anual entre 21 y 24 °C. Los frutos de chile piquín tienen gran cantidad de semillas, por lo que de 1 kg de fruto fresco maduro (rojo) se pueden obtener hasta 120 g de semilla, y cada gramo contiene de 200 a 300 semillas (Medina-Martínez *et al.*, 2010).

El chile piquín se encuentra distribuido en todo México, desde las zonas áridas hasta las tropicales. Por su alto grado de adaptación puede crecer desde el sur de Estados Unidos de América hasta Perú, y en las zonas donde se colecta tiene un impacto económico que favorece los ingresos de las familias que lo venden en los mercados locales. Sin embargo, las familias colectoras frecuentemente arrancan toda la planta y no la sustituyen por una



nueva, lo cual genera deterioro de su hábitat (Medina-Martínez *et al.*, 2010; Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004)

En un estudio realizado en 2002 con diversas poblaciones del noreste de México, se encontró que el chile piquín es preferido por 37.3 % de las personas encuestadas, seguido del jalapeño (32.6 %), serrano (19.6 %) y habanero (10.5 %). Alcanza mayor preferencia en las zonas aledañas a los sitios de recolección del chile piquín que en las zonas más alejadas. Esto permite visualizar un mercado cautivo, que podría absorber la producción de piquín si se maneja como cultivo de interés económico. Sin embargo, los problemas de germinación y crecimiento lento representan una limitante para producción intensiva (García Federico *et al.*, 2010; Rodríguez-del-Bosque, 2005).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se utilizaron semillas de chile piquín de las 16 colectas enlistadas en el Cuadro 1, cuyas procedencias se señalan en el mapa de la Figura 1.

Cuadro 1. Relación de las colectas utilizadas para el estudio de germinación de chile piquín.

Lugar de colecta	Donante	Institución	Material
1. Tucson, Arizona, EUA (M1).	Dr. Alfonso Gardea	CIAD	Fruto seco
2. Tucson, Arizona, EUA (M2).	Dr. Alfonso Gardea	CIAD	Fruto seco
3. Huepac, Sonora.	Dr. Alfonso Gardea	CIAD	Fruto seco
4. La Montosa Moctezuma, Sonora.	Dr. Alfonso Gardea	CIAD	Fruto seco
5. Babiácora, Sonora.	Dr. Alfonso Gardea	CIAD	Fruto seco
6. Badiraguato, Sinaloa.	Dr. Víctor H. Aguilar	COLPOS	Semilla
7. Acaponeta, Nayarit.	Dr. Víctor H. Aguilar	COLPOS	Semilla
8. Tepic, Nayarit.	Dr. Víctor H. Aguilar	COLPOS	Semilla
9. Tomatlán, Jalisco.	Dr. Víctor H. Aguilar	COLPOS	Semilla
10. San Carlos, Tamaulipas.	M.C. Moisés Ramírez	INIFAP	Semilla
11. Soto La Marina, Tamaulipas.	M.C. Moisés Ramírez	INIFAP	Semilla
12. González, Tamaulipas.	M.C. Moisés Ramírez	INIFAP	Semilla
13. Tuxpan, Veracruz	Dr. Nicacio Cruz H.	COLPOS	Fruto seco
14. Xicotepec, Puebla.	Dr. Víctor A. González	COLPOS	Fruto seco
15. Cuetzalan, Puebla.	M.C. Edgardo Bautista	COLPOS	Fruto seco
16. Sierra Sonora, Sonora.	Dr. Víctor A. González	COLPOS	Fruto seco



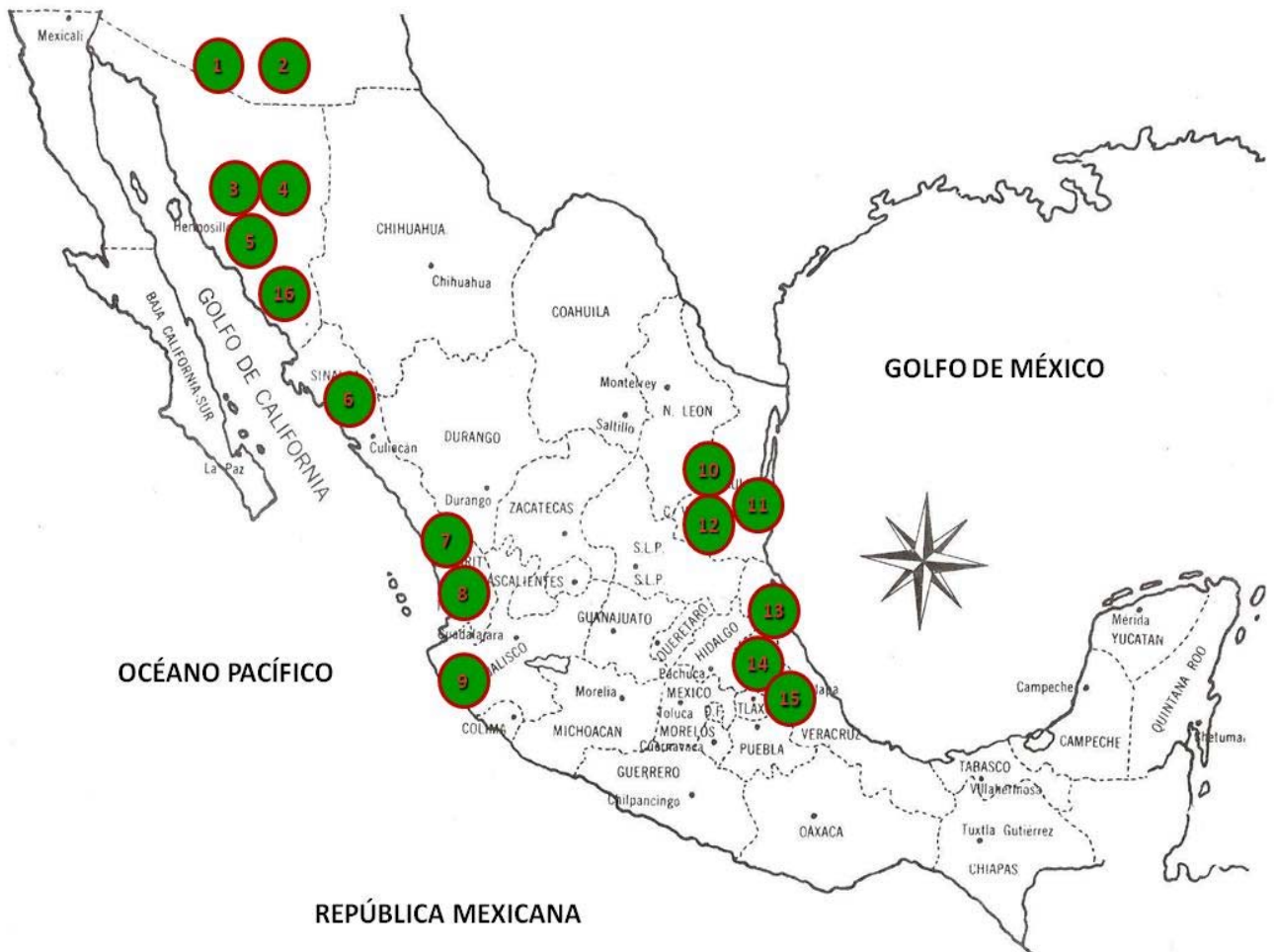


Figura 1. Ubicación de los sitios de procedencia de las colectas de chile piquín empleadas en el presente estudio.

El hecho de evaluar la germinación de semillas de chile piquín procedentes de diversas regiones del país involucra la evaluación de su diversidad genética en sus características morfológicas y fisiológicas. Además, como muchas colectas se recibieron como frutos fue necesario extraer las semillas y homogeneizarlas en tamaño y aspecto para las pruebas de germinación. En la Figura 2 se muestran las colectas que se recibieron en fruto.

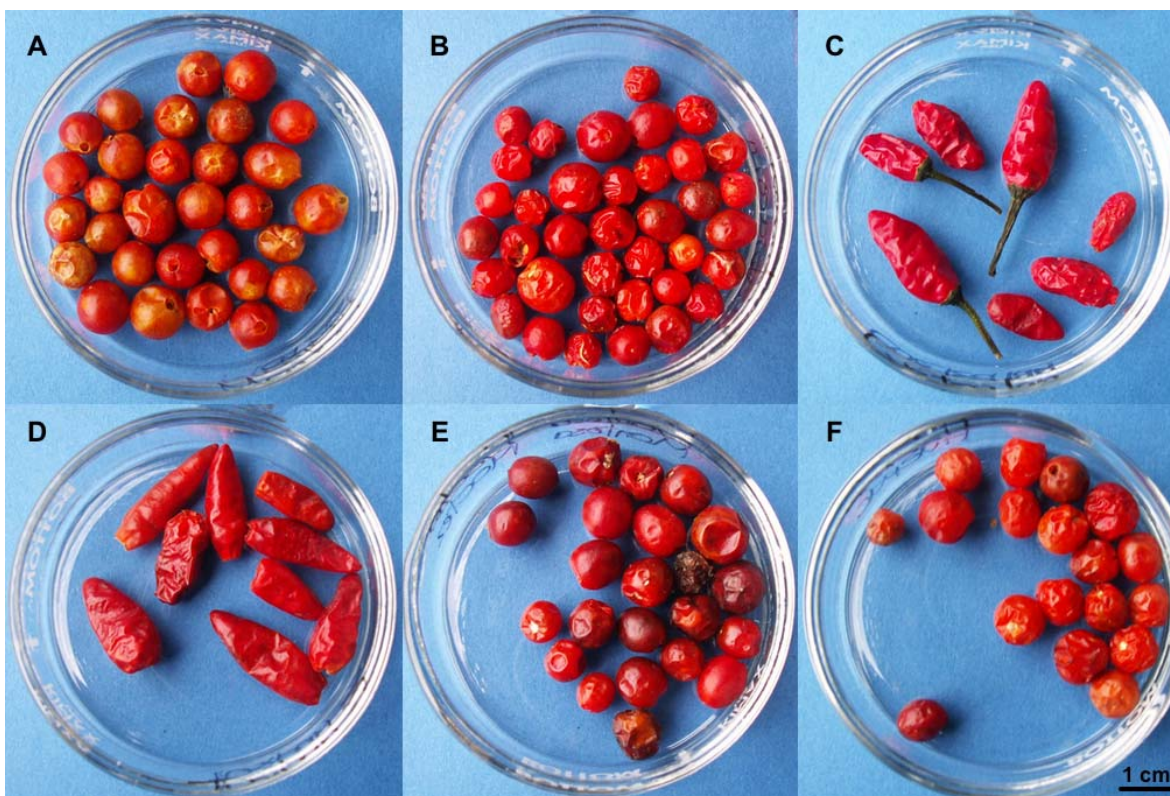


Figura 2. Frutos de chile piquín provenientes de diferentes regiones de México. **A**, Babiácora; **B**, La Montosa; **C**, Cuetzalan; **D**, Tuxpan; **E**, La Montosa Moctezuma; **F**, Huepac.

En los frutos de chile piquín se encontró una gran cantidad de semillas por fruto pero una parte de éstas son semillas vanas, por lo que fue necesario separar las semillas no vanas para efectuar los experimentos. Esta clasificación de semillas vanas se hizo con un diafanoscopio, el cual provee luz debajo de la semilla y permite observar si la semilla está vacía (vana) o no. Las semillas vanas se desecharon y las no vanas pasaron a la siguiente etapa de clasificación. No se registró la cantidad de semillas vanas por fruto.

También se detectó variación en el tamaño de la semilla extraída de cada fruto, por lo que se procedió a clasificarlas por su peso individual, y así se establecieron tres rangos de tamaño: de 1.5 a 2.5 mg, de 2.6 a 3.5 mg, y de 3.6 a 4.5 mg por semilla. El rango con mayor número de semillas fue el de 2.6 a 3.5 mg, por lo que éste se eligió para conformar

un lote homogéneo de semillas con el cual efectuar las pruebas experimentales que se describen a continuación.

### 3.1. Primera prueba de desinfección de la semilla

Para evitar la proliferación de hongos y bacterias sobre la cubierta seminal frecuentemente observada durante las pruebas preliminares (no mostradas en este trabajo), fue necesario probar tratamientos de desinfección de las semillas para elegir el mejor para Chile piquín. Los tratamientos evaluados en la primera prueba se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos aplicados en la primera prueba de desinfección en semillas de Chile piquín.

Producto desinfectante	Concentración (%)	Tiempo (min)
<i>Tratamiento 1</i> Testigo	---	---
<i>Tratamiento 2</i> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3	30
<i>Tratamiento 3</i> Hipoclorito de sodio NaClO comercial, Cloralex®	10	15
<i>Tratamiento 4</i> Hipoclorito de sodio NaClO comercial, Cloralex®	20	15
<i>Tratamiento 5</i> Benlate®, fungicida Plata coloidal estable, Microdyn® bactericida	1.2 0.05	15 30
<i>Tratamiento 6</i> Benlate® Plata coloidal estable, Microdyn®	0.4 0.05	15 30
<i>Tratamiento 7</i> Etanol Hipoclorito de sodio NaClO comercial, Cloralex®	70 50	1 10

Todas las concentraciones se basan en recomendaciones de cada producto comercial.

Los tratamientos se basaron en los estudios descritos por Cesty Borda-Yepey *et al.* (2007), Flores-Almaráz *et al.* (2008) y Robledo y Carrillo (2004).

Antes de ser desinfectadas, las semillas se lavaron con agua corriente y  $1 \text{ g L}^{-1}$  de detergente comercial en polvo, luego fueron agitadas durante 5 min y enjuagadas hasta eliminar el jabón. La unidad experimental consistió de cuatro repeticiones de 10 semillas de la colecta Tuxpan, por ser la que en pruebas preliminares (aquí no mostradas) había presentado un promedio de germinación más consistente.

Para evaluar el efecto de los tratamientos de desinfección en las semillas de chile piquín, éstas se germinaron sobre toallas de papel absorbente en cajas Petri, según la metodología de la ISTA (Ronnie, 2003), y las cajas se colocaron en la cámara de incubación Thelco® a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad. Tanto las cajas como las toallas de papel fueron previamente desinfectadas con solución de hipoclorito de sodio Cloralex® a 3 % de producto comercial por 15 min, y luego secadas por 24 h a temperatura ambiente y las toallas a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en la incubadora Thelco®.

Se registró diariamente el número de semillas germinadas y el número de semillas contaminadas, durante 21 días. El diseño experimental fue completamente al azar y los datos se analizaron en el programa Microsoft Office Excel 2007® (Microsoft, 2007) para calcular medias y desviaciones estándar.

### **3.2. Segunda prueba de desinfección de la semilla**

Al igual que en la primera prueba, en la segunda se usó la colecta Tuxpan. Las semillas se envolvieron en un trozo de tela, se amarraron teniendo la apariencia de un saco y se colocaron en un frasco con solución jabonosa donde se mantuvieron sumergidas; luego se agitó el frasco por 5 min y se enjuagó con agua corriente hasta eliminar el jabón.

Además, debido a que en la primera prueba se detectó que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 3 % tenía un efecto promotor en la germinación, este tratamiento se eliminó en la segunda prueba para evitar ese sesgo en los datos. En cambio, se agregó el fungicida Captán® por ser de amplio espectro, con acción de contacto y uno de los más usados para desinfección de semillas, y

así compararlo como alternativa del Benlate® que es de efecto sistémico. Los demás tratamientos fueron mezclas de productos para un total de cinco tratamientos, que incluyen al bactericida Microdyn®, como se describe en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Tratamientos aplicados en la segunda prueba de desinfección en semillas de chile piquín.

Producto desinfectante	Concentración	Tiempo (min)
<i>Tratamiento 1</i>		
Captán®, fungicida	5 g L <sup>-1</sup>	15
<i>Tratamiento 2</i>		
Captán®	10 g L <sup>-1</sup>	15
<i>Tratamiento 3</i>		
NaClO comercial, Cloralex®	10%	15
<i>Tratamiento 4</i>		
Benlate®, fungicida	0.4%	15
Plata coloidal estable, Microdyn®, bactericida	0.05%	30
<i>Tratamiento 5</i>		
Testigo	---	---

Todas las concentraciones se basan en recomendaciones de cada producto comercial.

Los tratamientos de desinfección se aplicaron como sigue: la solución de fungicida (Captán®) se roció sobre las toallas de papel donde se depositaron las semillas tratadas, hasta saturación; el NaClO se aplicó igual que en la primera prueba. Para el tratamiento que combina un fungicida con un agente antimicrobiano, las semillas envueltas en un saco de tela y amarradas, se sumergieron por 15 min en la solución de Benlate® sometida a agitación, y se enjuagaron con agua destilada; luego el saco de tela se transfirió a una solución de Microdyn® a 0.05 % por 30 min, con agitación constante; al terminar, las semillas se dejaron secar por 24 h a temperatura ambiente y después se sembraron. En el tratamiento testigo no se aplicó fungicida a la toalla de papel ni a las semillas, pero las

toallas y cajas empleadas en la siembra habían sido previamente desinfectadas con Cloralex® 3 %, al igual que en los demás tratamientos. Todos los tratamientos empleados se basaron en los aplicados por Flores-Almaráz *et al.* (2008), González (2003), Iracheta Donjuan *et al.* (2003) y Robledo y Carrillo (2004).

Después de ser tratadas, las semillas fueron sometidas a una prueba de germinación sobre papel, según la metodología recomendada por la ISTA (Ronnie, 2003), en cajas Petri. El trozo de toalla de papel y la caja Petri se desinfectaron como en el primer ensayo. Después de depositar 10 semillas por caja con tres repeticiones por tratamiento, las cajas Petri se cubrieron con sus tapas y se sellaron con película plástica auto-adherente (Kleenpack®).

A los 10 días después de la siembra se registró el número de semillas germinadas y el número de semillas contaminadas. El diseño experimental fue completamente al azar y los datos se analizaron en el programa Microsoft Office Excel 2007® para calcular medias y desviaciones estándar.

### **3.3. Prueba de viabilidad con tetrazolio**

En esta prueba se utilizó una solución incolora (0.1%) de la sal cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (núm. catálogo T8877, Sigma Chemical Co.), como indicador de la presencia de células vivas en el embrión. Cuando las semillas se colocan en la solución de tetrazolio, las células vivas continúan con su proceso respiratorio en el cual liberan hidrógeno y éste reacciona con la sal de tetrazolio en una reducción catalizada por enzimas deshidrogenasas. En este momento el tetrazolio se convierte en formazán y cambia su aspecto incoloro inicial hacia un color rojizo. Este cambio de color se observa solamente en los tejidos seminales vivos, de tal forma que se puede distinguir claramente el tejido vivo (rojizo) del tejido muerto (blanco). La intensidad de la coloración varía según la concentración que se aplique de la sal de tetrazolio que se recomienda de 0.1 a 1.0 % (AOSA, 2000; Gallo *et al.*, 2012).

De las colectas que preliminarmente habían presentado muy baja germinación, como Huepac, La Montosa, Babiácora, Arizona M1, Arizona M2, Xicotepec y La Montosa Moctezuma, se tomaron 30 semillas seleccionadas. Se colocaron en imbibición con agua



destilada por 18 h para reactivar su metabolismo, según la metodología indicada en el Manual para las Pruebas de Tetrazolio de la AOSA. Después se abrieron con bisturí en el plano mediano para dejar expuesto el embrión y el endospermo (AOSA, 2000).

Conforme al método descrito por la AOSA (2000) y Vankus (1997), los cortes se colocaron en una solución de cloruro de tetrazolio a 0.01 %, y se llevaron a oscuridad en la incubadora Thelco a 30 °C donde se dejaron por 6 h. Transcurrido el tiempo se decantó la solución de tetrazolio y se enjuagaron los cortes con agua destilada para proceder a la toma de datos, consistentes en clasificar las semillas como vivas o viables cuando se observó coloración en el 100, 80 o 50 % del embrión, o semillas no viables cuando no hubo tal coloración (Figura 3). El diseño experimental fue completamente al azar con 10 semillas como unidad experimental y con tres repeticiones. Los datos se analizaron en el programa Microsoft Office Excel 2007® para calcular medias y desviaciones estándar.



Figura 3. Embrión de la semilla de chile piquín completamente teñido (100 %) con tetrazolio.

### 3.4. Cinética de imbibición

Para comprobar si la cubierta seminal o el endospermo representaban una barrera física para la entrada de agua al embrión y que retrasara la germinación, se hizo una cinética de imbibición que consistió en registrar periódicamente los pesos frescos y secos de cada parte

de la semilla. Para ello se hicieron muestreos a las 0, 8, 16 y 24 h después de inicio de imbibición durante el primer día, y después cada 24 h por 21 días. En cada muestreo se registró el peso fresco y peso seco de la cubierta seminal, el endospermo y el embrión de cuatro semillas como unidad experimental.

Para la germinación, las semillas de la colecta Tuxpan se colocaron en caja Petri con fondo de toalla de papel humedecido con agua destilada y desinfectada previamente con una solución de NaClO comercial (Cloralex®) a 3 % del producto comercial para evitar la proliferación de microorganismos. Las semillas se desinfectaron con el tratamiento de Benlate® 0.4 % + plata coloidal estable (Microdyn® 0.05 %). Después de la siembra, las cajas Petri se sellaron con película plástica auto-adherente y se colocaron en oscuridad en la incubadora Thelco® a 30 °C.

En cada muestreo se cortaron las semillas en plano mediano con ayuda de un microscopio estereoscópico (Stereo Star AO570®) (Figura 4) y luego se separaron: la cubierta seminal, el endospermo y el embrión de cuatro semillas (por repetición), luego se pesaron en balanza analítica (Sartorius H51®) para registrar el peso fresco, luego se secaron a 65 °C por 48 h en una estufa de aire forzado (Riossa HCFD-82®), y al final se pesaron de nuevo para registrar el peso seco. Las variables evaluadas fueron peso seco y peso fresco por estructura de la semilla.

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones y los datos se analizaron en el programa Microsoft Office Excel 2007® para calcular medias y desviaciones estándar.



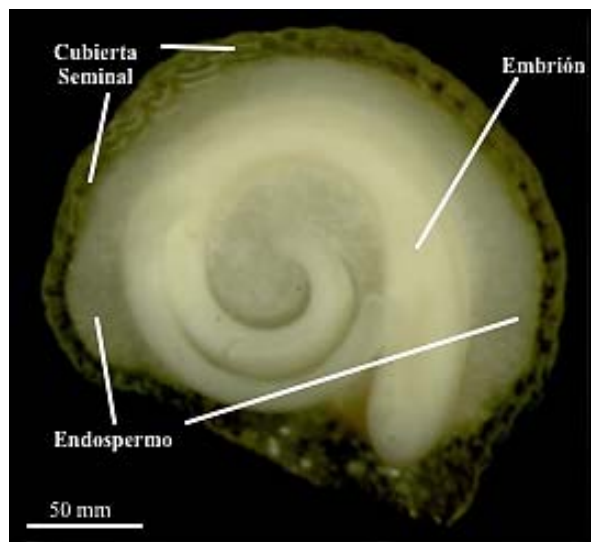


Figura 4. Estructuras de la semilla que se separaron por disección en el microscopio estereoscópico, para la cinética de imbibición (Fotografía propia).

### 3.5. Evaluación de sustancias promotoras de germinación

A fin de elevar la baja germinación de semillas de chile piquín en las colectas, según observaciones preliminares propias y diversos estudios anteriores (Araiza Lizarde *et al.*, 2011; García Federico *et al.*, 2010; Hernández-Verdugo *et al.*, 2010; Marín Sánchez *et al.*, 2007; Ramírez Meraz *et al.*, 2003), en este experimento se probaron varias sustancias promotoras de la germinación, para evaluar su efecto en la germinación de 16 colectas de semillas de chile piquín.

En este experimento inicial se probó la colecta Tuxpan, en donde la unidad experimental consistió de 10 semillas seleccionadas (no vanas) y desinfectadas, con tres repeticiones. Las semillas se sometieron a los tratamientos indicados en el Cuadro 4, por inmersión en los tiempos y las concentraciones indicadas, que dio un total de 14 tratamientos.

Cuadro 4. Tratamientos promotores de germinación aplicados en semillas de chile piquín de la colecta Tuxpan.

Promotores de germinación	Concentración (g L <sup>-1</sup> )	Tiempo de exposición (h)
AG <sub>3</sub> a 2500 y 5000 ppm	5 y 2.5	24
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300 mL·L <sup>-1</sup>	12, 24 y 48
PEG-8000 a -1.2 MPa	310.45	12, 24 y 48
KNO <sub>3</sub> a -0.6 y -1.2 MPa	24.6 y 49.2	24, 48 y 72

Después, las semillas se dejaron secar en las condiciones ambientales del laboratorio, por 72 h. Para evaluar sus efectos en la germinación, las semillas se sembraron en cajas Petri con fondo de toalla de papel humedecida con agua destilada y previamente desinfectadas. Para disminuir el riesgo de proliferación de microorganismos se agregó solución de Captán® 5 g L<sup>-1</sup> hasta saturar la toalla de papel, porque éste fue el tratamiento de desinfección más efectivo en la prueba previa. Después de sembradas, las cajas Petri se sellaron con película plástica auto-adherente y se colocaron en la incubadora Thelco® a 30 °C por 21 días, en oscuridad.

Diariamente se registró el número de semillas germinadas (protrusión de radícula), y con los datos se calculó el porcentaje de germinación. A los 21 días se registró el peso fresco y seco de las plántulas de cada muestra.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones y los datos se analizaron en el programa Microsoft Office Excel 2007® para calcular medias y desviaciones estándar.

### 3.6. Respuesta de las colectas a tratamientos promotores de la germinación

Debido a que en evaluaciones preliminares las colectas mostraron una amplia variabilidad, en este experimento se evaluó la capacidad germinativa de las 16 colectas de chile piquín enlistadas en el Cuadro 1. Se evaluaron los tres mejores tratamientos promotores de

germinación evaluados en el experimento previo (Cuadro 4) con el mejor tratamiento de desinfección (Benlate 0.4 % + Microdyn 0.05 %).

Para este experimento se usaron muestras de 10 semillas seleccionadas y desinfectadas de cada colecta, para conformar la unidad experimental. Dichas muestras se sometieron a cada promotor por inmersión durante 24 h. Los tratamientos promotores fueron AG<sub>3</sub> 5 g L<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %, KNO<sub>3</sub> 49.2 g L<sup>-1</sup> y el Testigo.

Posteriormente las semillas se dejaron secar en condiciones ambientales (22 °C) del laboratorio por 72 h. Para la siembra las semillas se colocaron en caja Petri con fondo de toalla de papel humedecida con agua destilada y previamente desinfectada. Para disminuir el riesgo de proliferación de microorganismos, a la toalla de papel en cada caja se le agregó solución de Captán® 5 g L<sup>-1</sup> hasta saturación. Después de la siembra las cajas Petri se sellaron con película plástica auto-adherente y se colocaron a oscuridad en la incubadora Thelco a 30 °C por 21 días.

En las semillas se registró la protrusión de la radícula como indicador de la germinación. A los 21 días se extrajeron las plántulas de cada muestra para obtener su peso fresco y seco. Para obtener el peso seco, las plántulas se secaron en una estufa de aire forzado marca Riossa HCFD-82® a 65 °C por 48 h.

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones y los datos se analizaron en el programa Microsoft Office Excel 2007® para calcular medias y desviaciones estándar.

### **3.7. Metodologías para las observaciones anatómicas**

#### **3.7.1. Cortes histológicos**

Cinco semillas seleccionadas de las colectas Tuxpan y Tomatlán fueron fijadas en FAA (formaldehído 10 %, ácido acético 5 %, etanol 50 %) y después se sometieron a deshidratación en un cambiador de tejidos (Tissuetec Maratón®) con cambios cada 4 h, en las siguientes soluciones: etanol 30 %, 40 %, 50 %, 70 %, 85 %, 100 %, 100 %, etanol-xileno 50 %-50 %, xileno 100 %, xileno 100 % y xileno 100 %, según adaptación del Dr. E.

M. Engleman, citado por García Villanueva (1992). Después se incluyeron en parafina y se formaron los bloques. Se obtuvieron cortes de 10  $\mu\text{m}$  de grosor con un microtomo rotatorio (American Optical USA ®). Los cortes se adhirieron a portaobjetos con adhesivo de cromo, y se colocaron en una platina a 60 °C durante 12 h para asegurar la adherencia al portaobjetos. Los cortes se desparafinaron en una serie de xilenos (100 %) y se rehidrataron en una serie de etanoles graduales (100 %, 96 %, 70 % y 50 %), con 3 min en cada cambio según Jensen (1962). Los cortes se tiñeron en Safranina O en solución salina (0.1 % safranina en solución acuosa salina) y verde fijo FCF (0.12 % en propanol), según la modificación de Zavaleta y Engleman (1991). Finalmente los cortes se montaron con resina acrílica sintética (Hycel®, núm.catálogo 7987), y luego los cortes se observaron y fotografiaron en un microscopio compuesto Axioskop 2 plus® (Carl Zeiss, Alemania) y se fotografiaron con una cámara digital AxioCam 5 ® (Carl Zeiss, Alemania).

### **3.7.2. Microscopia electrónica de barrido (MEB)**

Se usó una técnica desarrollada en la Unidad de Microscopia Electrónica del Colegio de Postgraduados (UME, COLPOS). En semillas seleccionadas de la colecta Tuxpan, previamente humedecidas, se cortaron a mano en el plano mediano. Se dejaron secar en condiciones ambientales (22 °C - 24 °C) del laboratorio por 48 h. Con un estereomicroscopio se seleccionaron tres cortes medianos y se montaron sobre portamuestras de cobre para MEB con una cinta de carbón doble adhesiva, y luego se cubrieron con oro-paladio (80/20) con una ionizadora de capa fina de metales Fine Coat Ion Sputter JFC-1100® (Jeol, Japan) durante 15 min. Primero se sometieron a vacío (10 mA) por 10 min y después se activó el paso de voltaje a 1.2 kV por 5 min; con esto se logra que el cilindro interno del aparato funcione como cátodo y la energía se vierta hacia el centro de la cámara donde está la placa de oro-paladio, de tal forma que se desprendan partículas de oro y recubran el material de la muestra (Bozzola y Russell, 1992).

La muestra recubierta y ya conductiva se retiró con ayuda de pinzas para no alterar el recubrimiento proporcionado y se llevó al microscopio electrónico de barrido JSM-

6390LV® (Jeol, Japan) para la observación de la muestra. Las imágenes se capturaron digitalmente y se guardaron en formato TIF a una resolución de 1280 x 960 píxeles.

### 3.7.3. Tinción de polisacáridos insolubles (PAS)

En esta tinción la reacción depende de la oxidación de los enlaces 1,2-glicólicos dentro de la molécula de azúcar, con ácido periódico de forma que dos grupos aldehído quedan libres para ser teñidos con el reactivo de Schiff (Figura 5). Este método se emplea para identificar la presencia de diferentes tipos de compuestos como glucógeno, mucinas, mucoproteínas, ácido hialurónico y quitina. Se considera un resultado positivo cuando el tejido teñido presenta coloración rojiza, y negativa si no hay cambio de color (Gahan, 1984). En el presente trabajo se hizo la tinción de PAS con el objetivo de obtener una tinción diferencial del embrión y endospermo que facilitaran las mediciones anatómicas.

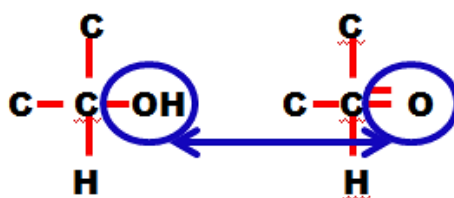


Figura 5. Reacción química de la tinción de Schiff (PAS).

### 3.7.4. Técnica de desgaste para la obtención del plano mediano de semillas secas

Doce semillas de cada colecta se adhirieron a un portaobjetos con cianocrilato (Kola Loka®) con la cara aplanada hacia abajo. Una vez seco el pegamento, la semilla se raspó con una lija de agua número 400 hasta obtener un plano mediano del embrión y el endospermo expuestos de acuerdo al procedimiento de Guerrero *et al.* (2006).

La superficie lijada de la semilla se tiñó para polisacáridos insolubles. Se agregó una gota de ácido periódico por 15 min; después se enjuagó tres veces con agua destilada y se agregó una gota de reactivo de Schiff por 10 min (Ruzin, 1999) y finalmente se enjuagó el corte con agua destilada para detener la reacción. Las partes de las semillas se observaron en un microscopio estereoscópico y se obtuvieron fotografías con una Moticam 2.0 usando el programa Motic Images Plus 2.0® (Motic, 2007).

### 3.7.5. Medición de variables morfológicas

En las fotografías obtenidas se midieron las siguientes variables con ayuda de MotiC Images Plus 2.0®:

Área de la semilla ( $\text{mm}^2$ ), perímetro de la semilla (mm), longitud del eje mayor (mm), longitud del eje menor (mm), grosor de cubierta seminal (mm).

Área del embrión ( $\text{mm}^2$ ), perímetro del embrión (mm), ángulo ( $^\circ$ ) de curvatura de los cotiledones con respecto al eje del embrión, longitud del eje hipocótilo-radicular (mm), área semilla/área embrión, área embrión/área semilla, diámetro Ferret, índice de redondez e índice de alargamiento, según los métodos y fórmulas propuestos por López-Santiago *et al.* (2008), Núñez-Colín *et al.* (2011) y Guerrero *et al.* (2006). El diseño experimental fue completamente al azar y los datos se analizaron en el programa Microsoft Office Excel 2007® (Microsoft, 2007) para calcular medias y desviaciones estándar.

### 3.8. Prueba de germinación *in vitro*

Para confirmar los resultados de germinación obtenidos en toallas de papel, se realizó una prueba de germinación en condiciones controladas *in vitro*. La prueba se efectuó en muestras de 10 semillas previamente seleccionadas y desinfectadas previamente de cada colecta, con tres repeticiones. El medio de cultivo utilizado fue el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) con la concentraciones de sales a 25%, adicionado con tiamina ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) mio-inositol ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), agar (Merck®) (semisólido:  $7.5 \text{ g L}^{-1}$ ) (apéndice Cuadro 1). Al medio de cultivo básico se le adicionaron cuatro tratamientos que consistieron en diferentes dosis de  $\text{AG}_3$  (T1 sin hormona, T2  $0.25 \text{ g L}^{-1}$ , T3  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  y T4  $0.75 \text{ g L}^{-1}$ ). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH y HCl 1N en un potenciómetro (Thermo Scientific® Modelo Orion 3 Star) antes de adicionar el agar.

En cada frasco de alimento infantil se sirvieron 25 mL de medio de cultivo y se esterilizaron en autoclave AESA® 300 a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $15 \text{ kg cm}^{-2}$  de presión durante 20 min

En este caso el método de desinfección de las semillas se adaptó mediante pruebas preliminares para minimizar la proliferación de hongos y bacterias durante el cultivo. Las

semillas se envolvieron en un trozo de tela y amarradas (saco), se lavaron bajo el chorro de agua corriente por 2 min; después se adicionó detergente en polvo y se regresaron al chorro de agua por 15 min más para que se lavaran y enjuagaran. Al terminar se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril y se aplicaron las soluciones desinfectantes (Cuadro 5), bajo condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar horizontal (Veco GHFL-A12®), y se hicieron cinco enjuagues de agua destilada estéril entre cada cambio de solución desinfectante. Al finalizar el último enjuague, se colocaron las semillas sobre papel secante para proceder a la siembra.

Cuadro 5. Soluciones desinfectantes aplicadas a 15 colectas de chile piquín para su germinación *in vitro*.

Solución	Agente desinfectante	Concentración	Tiempo (h)
I	Captán®	8.0 g L <sup>-1</sup>	0.5
	Benlate®	8.0 g L <sup>-1</sup>	
II	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2 %	20
III	NaClO comercial,	50%	0.5
	Cloralex®		
	Plata coloidal estable,	5%	
	Microdyn®		
	Tween 20®†	10 gotas/100 mL	

†Agente surfactante.

La siembra de semillas se hizo bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar horizontal (Veco GHFL-A12®) sumergiéndolas en el medio de cultivo. Al finalizar los frascos sembrados se mantuvieron en oscuridad y a 20 °C por 21 días. Las variables cuantificadas fueron: número de semillas germinadas y número de semillas contaminadas. El diseño experimental fue completamente al azar y los datos se analizaron en el programa Microsoft Office Excel 2007® (Microsoft, 2007) para calcular medias y desviaciones estándar.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Desinfección de la semilla

Un buen método de desinfección de semillas debe evitar la contaminación por microorganismos, sin afectar su germinación. En el ensayo de desinfección el tratamiento más efectivo fue el Benlate a 1.2 % (T5) con menos de 5 % de semillas infectadas a los 15 días (Figura 6), en contraste con el tratamiento Testigo sin desinfección (T1) el cual en promedio tuvo 90 % de infección en la misma fecha. Otros tratamientos que también mostraron bajas tasas de contaminación fueron: etanol + cloro (T7), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % (T2) y etanol 70 % por 1 min + hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) 50 % (T7), con niveles de infestación de 1, 11 y 13 %, respectivamente. El tratamiento de desinfección que menos afectó la germinación fue el de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 65 % de germinación al igual que el Benlate® 0.4 % + plata coloidal estable (Microdyn®) 0.05 % (Figura 7).

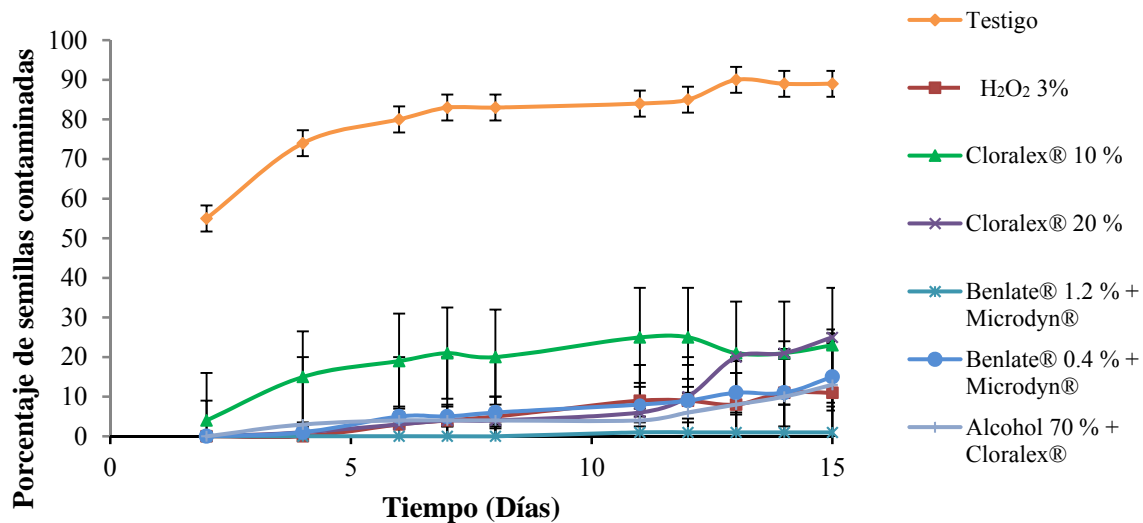


Figura 6. Contaminación en siete tratamientos de desinfección en semillas de chile piquín de la colecta Tuxpan. n=3, barras verticales indican la desviación estándar.



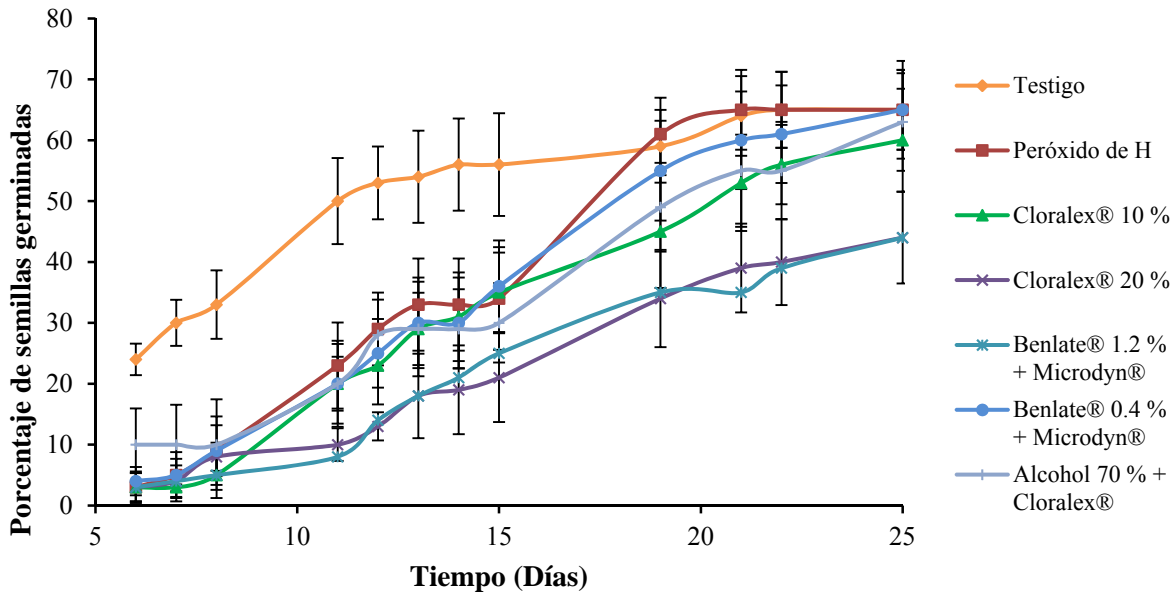


Figura 7. Germinación después de siete tratamientos de desinfección en semillas de chile piquín colecta Tuxpan. n=3, barras verticales indican la desviación estándar.

Con base en estos resultados, el mejor tratamiento de desinfección de semillas de chile piquín fue Benlate 0.4 % + Microdyn® 0.05 %, por haber evitado la contaminación de microorganismos sin reducir la germinación. Estos resultados coinciden con el de Robledo y Carrillo (2004) y González (2003).

El uso de etanol 70 % por 1 min + hipoclorito de sodio (Cloralex®) 50 % por 10 min resultó en 10 % de semillas contaminadas. Sin embargo, en *Pothomorphe umbellata* no hubo contaminación con este tratamiento (Cesty Borda-Yepez *et al.* (2007). Por otro lado, la germinación fue mejor en chile porque se alcanzó 63 % mientras que en *P. umbellata* Miq. fue de 45 %.

El uso de soluciones de hipoclorito de sodio comercial funcionaron bien para plántulas de ciclamen (*Cyclamen persicum* Mill.) según Flores-Almaráz *et al.* (2008), y para *P. umbellata* Miq. según Cesty Borda-Yepez *et al.* (2007). Pero en chile piquín, este tratamiento afectó su germinación y sin lograr el mejor nivel de desinfección.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no alcanzó el mejor resultado en desinfección como lo habían reportado Flores García *et al.* (2008) y Álvarez-Moctezuma *et al.* (2008), pero ambos coinciden en la

observación de que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene un efecto promotor de la germinación además de ser desinfectante. Para evitar efectos cruzados en los resultados de esta investigación, el uso del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se descartó como agente desinfectante en las siguientes evaluaciones.

#### 4.2. Segunda prueba de desinfección

En la segunda prueba de desinfección se evaluaron cinco tratamientos cuyo efecto también se midió con el porcentaje de semillas germinadas y de semillas contaminadas. Como se ilustra en la Figura 8, aquí los mejores tratamientos desinfectantes fueron: Captán a 5 y 10 g L<sup>-1</sup>, y Benlate 0.4 % + Microdyn 0.05 %, porque las semillas así tratadas permanecieron sin crecimiento microbiano durante los primeros 5 días de germinación, periodo crítico en el que con mayor frecuencia se detecta contaminación microbiana cuando la hay.

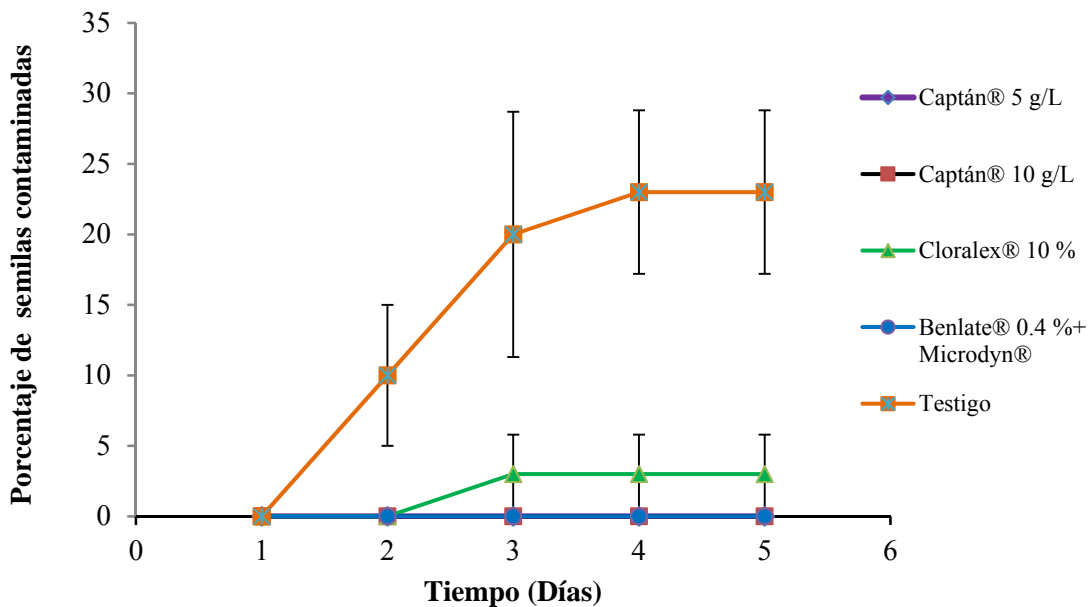


Figura 8. Contaminación registrada durante los primeros 5 días, después de aplicar cinco tratamientos de desinfección. n=3, barras verticales indican la desviación estándar.

En cuanto al efecto de estos tratamientos en la germinación (protrusión de la radícula) entre los 5 y 7 días, se encontró que los de Benlate 0.4 % + Microdyn 0.05 % y Captán 5 g L<sup>-1</sup>

dieron igual tasa de germinación que el Testigo, lo que evidencia que no la afectaron en este proceso (Figura 9). Los demás desinfectantes redujeron la tasa de germinación temprana. Por ello se confirmó a la desinfección con Benlate 0.4 % + Microdyn 0.05 % como el mejor tratamiento de desinfección, porque logra la desinfección de la semilla sin reducir su germinación.

Un resultado similar fue el obtenido por González (2003) en *P. vulgaris* donde logró un buen resultado antifúngico con Captán®.

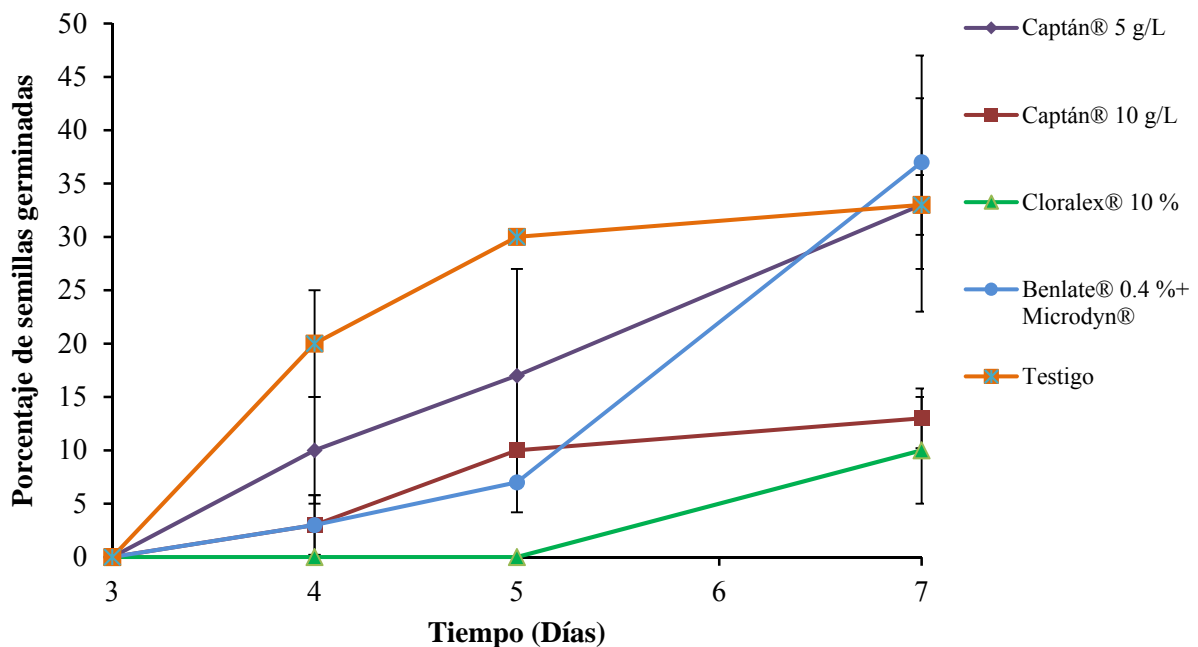


Figura 9. Germinación de semillas de chile piquín después de recibir cinco tratamientos de desinfección de semilla. n=3, barras verticales indican la desviación estándar.

#### 4.3. Prueba de viabilidad con tetrazolio

Para saber si las fallas germinativas observadas en semillas de chile piquín se debían a muerte de los embriones, se aplicó la prueba de tetrazolio a las colectas que habían mostrado los menores porcentajes de germinación en agua que fueron: Huepac 0 %, La Montosa 0 %, Babiácora 0 %, Arizona M1 13 %, Arizona M2 20 %, Xicotepec 6 %, La

Montosa Moctezuma 0 % y Tuxpan 66 %, como testigo. Para la evaluación se establecieron cuatro niveles de tinción (Figura 10). Los resultados se resumen en el Cuadro 6 y la Figura 11.

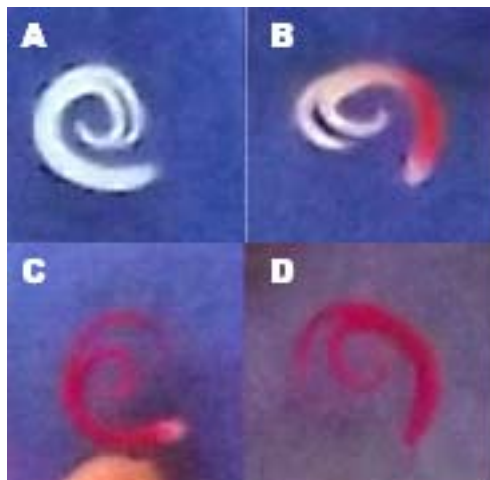


Figura 10. Patrones de tinción de los embriones con la prueba de tetrazolio. **A**, embrión con 0 % de tinción; **B**, embrión con 50 % de tinción; **C**, embrión con 80 % de tinción; **D**, embrión con 100 % de tinción.

Cuadro 6. Viabilidad de ocho colectas de chile piquín en función del porcentaje de tinción con tetrazolio en embriones de 30 semillas de cada procedencia.

Colecta	Embriones viables (%)			
	Tinción	Tinción	Tinción	Tinción
	100 %	80%	50%	0 %
Huepac	47	33	20	0
La Montosa	70	30	0	0
Babiácora	83	17	0	0
Tuxpan	67	0	23	10
Arizona M1	73	17	7	3
Arizona M2	57	33	7	3
Xicotepec	10	67	10	13
La Mont Moctezuma	10	3	53	33

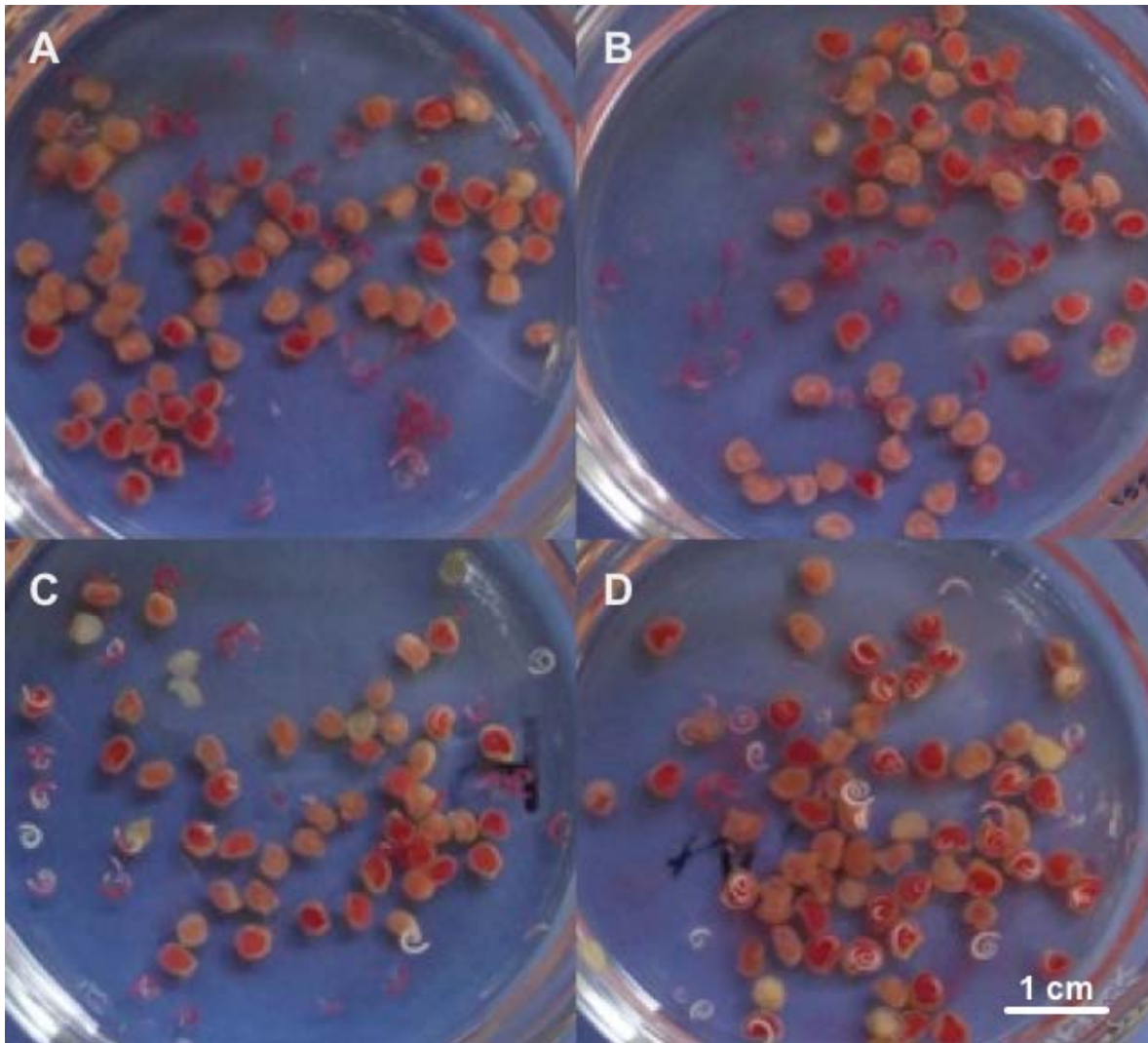


Figura 11. Semillas teñidas por 6 h con solución de tetrazolio a 0.1 %. **A**, Arizona M1; **B**, Arizona M2; **C**, Xicotepec y **D**, La Montosa Moctezuma. Fotografía propia.

Con la aplicación de la prueba de tetrazolio se determinó que la mayor parte de las muestras tienen un nivel de viabilidad aceptable con tinción en 100 % del embrión, excepto Xicotepec y Montosa Moctezuma. Con esto se descarta que la baja germinación de semillas de chile piquín se deba a muerte del embrión en todas las colectas (ISTA, 1985; Vankus, 1997).

#### 4.4. Cinética de imbibición y de distribución de biomasa

Durante esta prueba se observó que las semillas de piquín absorben la humedad del sustrato desde las primeras horas de la siembra. La semilla seca cuenta con un porcentaje de humedad mínimo que requiere para mantenerse viva, que alcanza un promedio de 5.6 % en la cubierta seminal, 6.6 % en el endospermo y 15.6 % en el embrión (Figura 12). Durante las primeras 8 h de imbibición el contenido de humedad se elevó hasta 70 % en la cubierta seminal, 60 % en el endospermo y 76 % en el embrión.

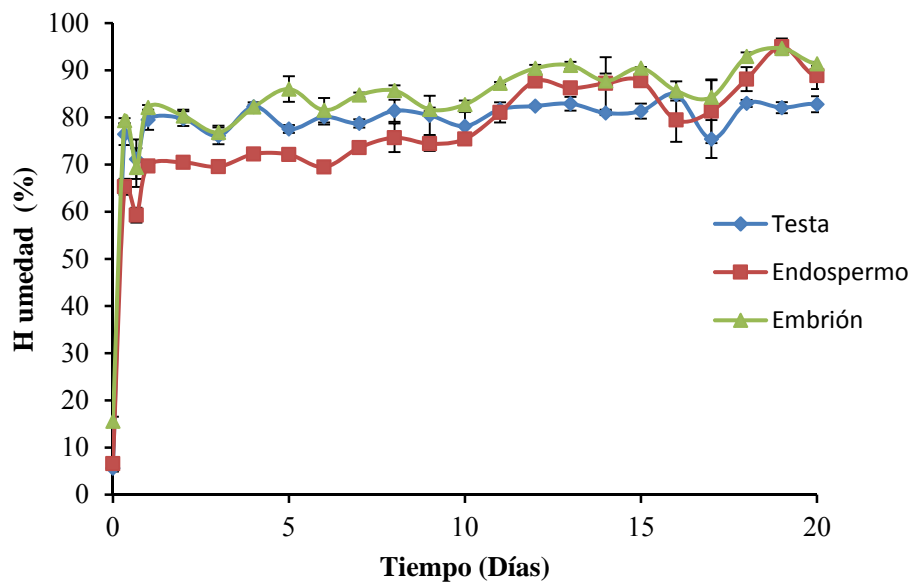


Figura 12. Cinética de imbibición en semillas de chile piquín provenientes de Tuxpan, Ver. n=3, barras verticales indican la desviación estándar.

Según Taiz y Zeiger (2010), el proceso de germinación se activa una vez que se hidratan los tejidos de la semilla, lo que genera una cadena de eventos irreversibles. La imbibición inicia la degradación de azúcares en el endospermo y la importación de azúcares hacia el embrión para promover el crecimiento de éste; así mismo se activan genes de cadenas metabólicas que desencadenan en la germinación.

Los altos porcentajes de humedad alcanzados en pocas horas por las semillas de chile piquín permiten inferir que la penetración de agua hacia el interior de la semilla no fue el factor limitante de la germinación (Figura 12), y que la hidratación ocurre en las primeras

horas de la imbibición en coincidencia con lo descrito por Dell’Aquila (2004) en semillas de chile y tomate (*Lycopersicon esculentum* L.).

Para confirmar que no existe barrera física para la absorción de humedad en todas las colectas empleadas (Tuxpan, La Montosa, La Montosa Moctezuma, Huepac, Tepic y Babiácora), se repitió la cinética con semillas de cada colecta pero se limitó a tres muestreos: 2, 4, y 6 días. Los resultados obtenidos corroboraron que la cubierta seminal y el endospermo no son una barrera para el paso del agua en dichas colectas, como se resume en el Cuadro 7. Aunque en esta cinética se hicieron menos muestreos, se observa que estas colectas manifiestan la misma tendencia de absorción de humedad, que la mostrada por la colecta Tuxpan evaluada durante 21 días en la cinética anterior.

Cuadro 7. Humedad (%) en la semilla de chile piquín de siete colectas durante 6 días de imbibición.

Colecta	Humedad (%)								
	Cubierta seminal			Endospermo			Embrión		
	Día 2	4	6	Día 2	4	6	Día 2	4	6
Babiácora	69.7	65.2	69.7	62.71	57.4	60.5	68.2	63.7	60.6
Huepac	64.8	64.7	68.0	61.60	61.4	61.3	68.4	64.0	74.2
La Montosa	67.7	65.8	66.3	58.06	61.2	62.0	73.4	76.6	68.5
La Mont Moctezuma	69.3	68.3	64.8	65.15	53.7	62.2	79.1	59.2	68.2
Tepic	66.1	63.5	61.8	59.72	56.7	60.2	69.4	77.8	80.6
Tuxpan	63.9	61.6	68.3	56.11	63.7	63.6	68.3	75.3	73.0

Al constatar que la humedad es absorbida por la cubierta seminal, el embrión y el endospermo de las semillas en menos de 24 h, se descarta el supuesto de que la germinación del chile piquín está limitada por la barrera física que representan dichas estructuras.

Por otro lado, a los 21 días se notó una redistribución de biomasa entre el endospermo y el embrión. Esto se hizo evidente con la disección de las estructuras que permitió observar al endospermo como una capa adelgazada en comparación con su tamaño inicial (día 0), en

tanto que el embrión ya se había transformado en hipocótilo y presentaba un tamaño mayor. Esta redistribución de biomasa también es evidente en el peso seco de las estructuras de la semilla (Figura 13).

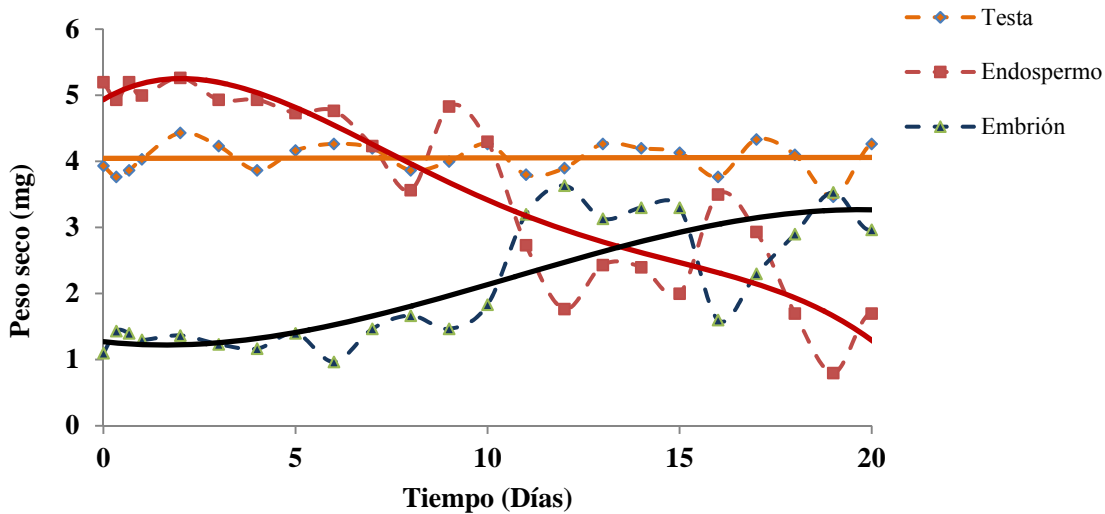


Figura 13. Cambios en el peso seco de cada estructura de cuatro semillas de chile piquín procedente de Tuxpan, Ver., durante la germinación. Los puntos unidos por líneas discontinuas corresponden a los datos observados, y las líneas continuas corresponden a las tendencias. n=12.

Durante la germinación la cubierta seminal permanece con un peso constante ya que no aporta ni recibe biomasa durante la imbibición y germinación. En cambio, el endospermo que comenzó con un peso promedio de  $1.3 \text{ mg} \pm 0.2$ , finalizó los 21 días de germinación en condiciones de oscuridad con un peso menor a  $0.18 \text{ mg} \pm 0.2$ . Al mismo tiempo, el embrión comenzó con un peso seco de  $0.3 \text{ mg} \pm 0.2$  en promedio, a los 21 días su biomasa había aumentado a  $1 \text{ mg} \pm 0.5$ . Estos cambios de peso seco indican que la disminución del peso del endospermo se debe a que aporta la biomasa que requiere el embrión para crecer y lograr la germinación, y que el embrión usa alrededor de  $0.7 \text{ mg}$  de biomasa para su crecimiento (protrusión de la radícula) y  $0.4 \text{ mg}$  para mantener su metabolismo activo.

El comportamiento observado en el endospermo coincide con el reportado por Anese *et al.* (2011) en semillas de *Solanum lycocarpum*, quienes relacionaron el desgaste del endospermo con la actividad de la enzima endo- $\beta$ -mananasa en condiciones de imbibición.



Las diferencias entre los datos observados y los predichos con la línea de tendencia (Figura 13), se atribuyen a que cada muestreo se hizo en semillas diferentes por ser una prueba destructiva, lo cual implica un cierto nivel de variabilidad en la velocidad y porcentaje de germinación. Por ejemplo, al día 16 no todas las semillas de las repeticiones habían germinado y por tanto el peso seco del endospermo fue mucho mayor que la medición del día 15 hecha con semillas germinadas, caso opuesto a lo que ocurrió con el peso promedio del embrión.

En el resto de las colectas evaluadas permanece la tendencia de incremento de biomasa en el embrión, disminución por hidrólisis del endospermo y peso estable en la cubierta seminal (Cuadro 8).

Cuadro 8. Peso seco (mg) de las estructuras de la semilla de chile piquín de siete colectas. Datos promedio de cuatro semillas. n= 12

Estructura	Día	Peso seco (mg)					
		Babiácora	Huepac	La Montosa	La Mont Moctezuma	Tepic	Tuxpan
Cubierta seminal	2	6.53 ± 0.2	7.47 ± 0.5	5.73 ± 0.5	6.23 ± 0.3	3.93 ± 0.4	4.73 ± 0.9
	4	6.57 ± 1.2	7.00 ± 0.7	5.30 ± 0.4	6.40 ± 0.1	3.73 ± 0.05	4.00 ± 0.1
	6	6.83 ± 0.7	7.77 ± 0.4	5.63 ± 0.5	6.70 ± 0.7	3.97 ± 0.2	4.73 ± 0.5
Endospermo	2	6.40 ± 0.1	7.43 ± 0.8	6.27 ± 0.1	7.13 ± 0.6	4.10 ± 0.2	5.73 ± 0.7
	4	6.77 ± 0.8	7.37 ± 0.4	5.77 ± 0.3	6.70 ± 0.4	3.93 ± 0.2	4.37 ± 0.1
	6	7.17 ± 0.4	7.77 ± 0.6	5.33 ± 0.1	6.80 ± 0.3	3.73 ± 0.1	4.90 ± 0.7
Embrión	2	1.77 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.70 ± 0.1	1.73 ± 0.4	1.00 ± 0.1	1.53 ± 0.3
	4	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.2	1.23 ± 0.1	1.8 ± 0.2	0.73 ± 0.2	1.17 ± 0.2
	6	2.03 ± 0.6	2.2 ± 0.1	1.53 ± 0.6	2 ± 0.1	0.87 ± 0.2	1.37 ± 0.3

En relación con el peso fresco (Figura 14), los datos obtenidos coinciden con los de semillas de *Ischaemum rugosum* o falsa caminadora, en las que se observó ganancia de peso por absorción de agua desde los primeros 15 min de imbibición y luego se estabilizó a las 6 h (Jarma *et al.*, 2007). En piquín se comprobó que las semillas absorben agua desde las primeras horas de imbibición. La absorción de agua por el embrión es la típica descrita

por Bewley (1997), quien señaló tres fases de la germinación: fase I (reinicio del metabolismo) en el primer día de imbibición, fase II (procesos metabólicos y reparativos) del día 2 al 10, y fase III (elongación celular) del día 10 al 21.

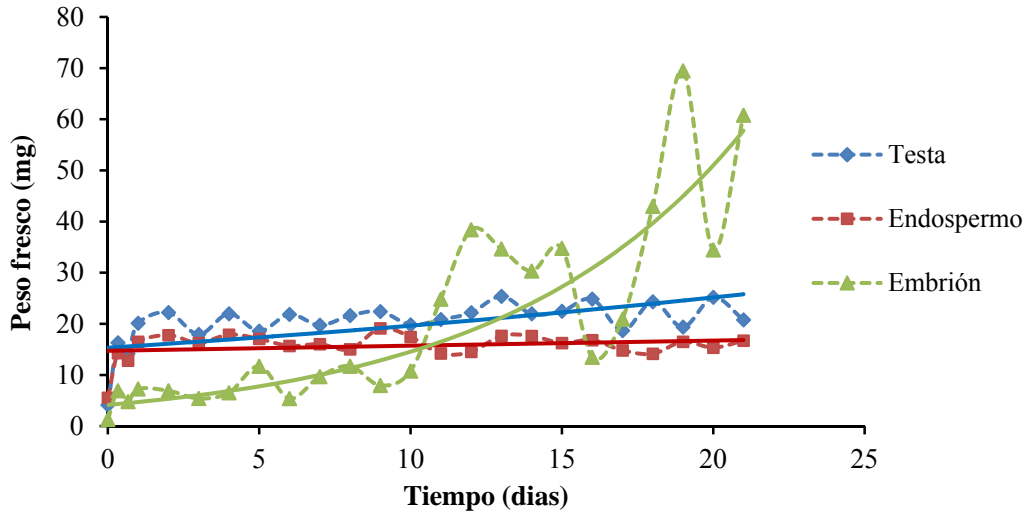


Figura 14. Cambios en el peso fresco de cada estructura de la semilla de chile piquín procedente de Tuxpan, Ver., durante la germinación. Datos de un grupo de cuatro semillas. n= 3.

#### 4.5. Promotores de germinación

En este ensayo se probaron varios tratamientos en una colecta (Tuxpan, por ser de germinación más rápida) para seleccionar los que mejor respuesta generaran y luego probarlos en todas las colectas. Los cinco tratamientos seleccionados fueron: AG<sub>3</sub> 2500 ppm (T1), AG<sub>3</sub> 5000 ppm (T2), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % 12 h (T3), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % 24 h (T4) y Testigo (T5).

De estos tratamientos se seleccionó al AG<sub>3</sub> 5000 ppm (T2) y al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % 24 h (T4) como los que mostraron mejor respuesta germinativa con respecto al testigo (Figura 15).

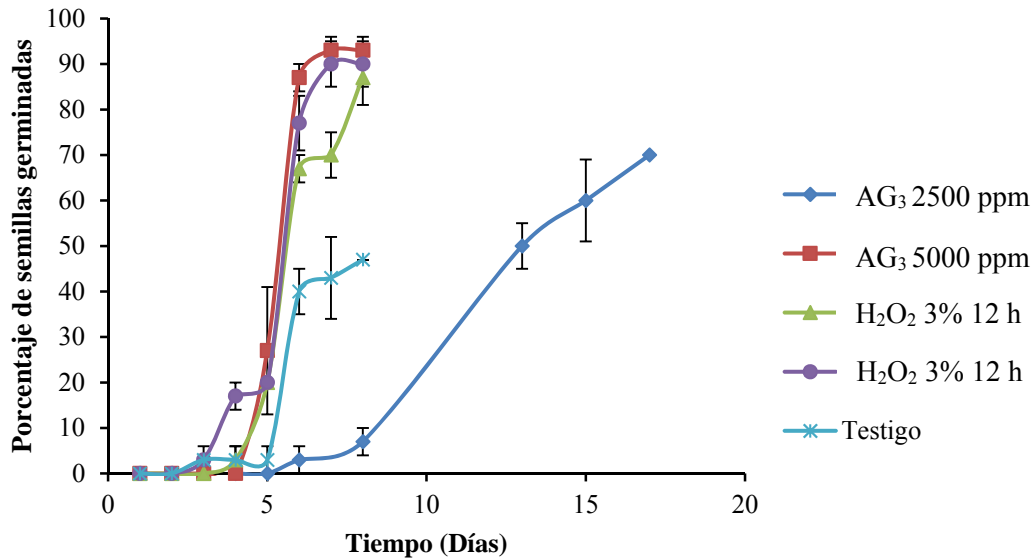


Figura 15. Cinética de germinación de semillas de chile piquín de la colecta Tuxpan después de ser sometida a cuatro tratamientos de promotores de germinación más un tratamiento testigo. n= 3, barras verticales indican la desviación estándar.

La semilla de la colecta Tuxpan no tuvo buena respuesta a los tratamientos de osmo-acondicionamiento con polietilenglicol (PEG-8000) a -1.2 MPa y distintos tiempos de exposición, ya que no hubo diferencia en el tiempo de inicio de germinación entre la semilla tratada y el testigo. Sin embargo, mejoró la germinación en 30 % (Figura 16).

No obstante, la semilla tratada con AG<sub>3</sub> dio mejores resultados que el PEG-8000. Por ello, para la siguiente etapa de las pruebas con promotores de germinación en las 16 colectas de chile piquín, se descartó el uso del PEG-8000.

Según Marín Sánchez *et al.* (2007) el tratamiento con PEG-8000 no aumentó la germinación en semillas de cebolla (*Allium cepa*) pero contribuyó a mantener el vigor por mayor tiempo durante el almacenamiento, en comparación con el testigo. En el caso de chile ancho se encontró que el PEG-8000 aumenta la germinación de 93 a 99 % y además estimula el crecimiento del sistema radicular (Ruiz *et al.*, 2004).

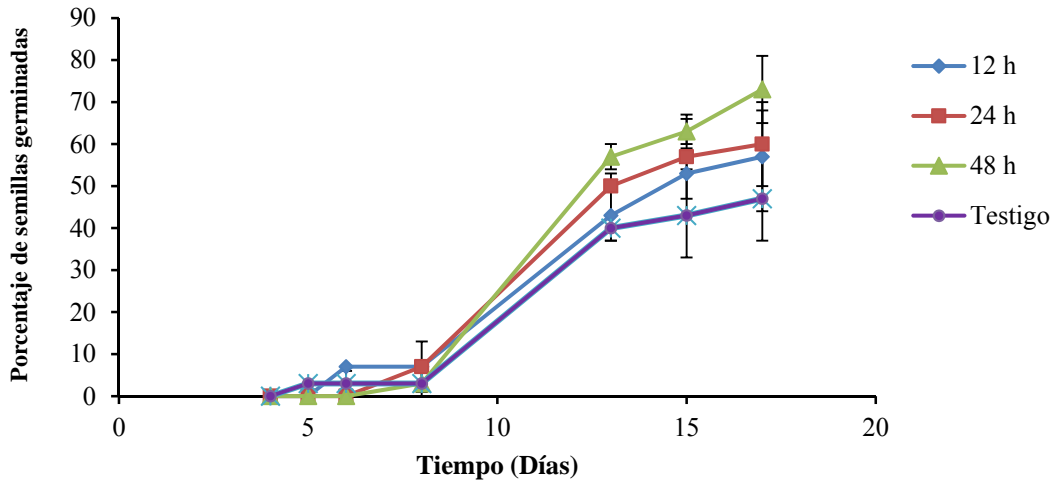


Figura 16. Cinética de germinación de semillas de chile piquín provenientes de la colecta Tuxpan, Ver., en respuesta al polietilenglicol -1.2 MPa aplicado a tres tiempos de exposición. n= 3, barras verticales indican la desviación estándar.

También se hizo una prueba de osmo-acondicionamiento con el  $\text{KNO}_3$  cuyos resultados se muestran en la Figura 17. En este ensayo se eligió los de -1.2 MPa por aumentar el número de semillas germinadas, principalmente el tratamiento de 24 h de exposición con el que se obtuvo el mejor resultado.

De los resultados de germinación de las pruebas anteriores, se eligieron los tratamientos de  $\text{AG}_3$  5000 ppm,  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% y  $\text{KNO}_3$  -1.2 MPa 24 h, porque promovieron la mayor germinación en las 16 colectas de chile piquín.

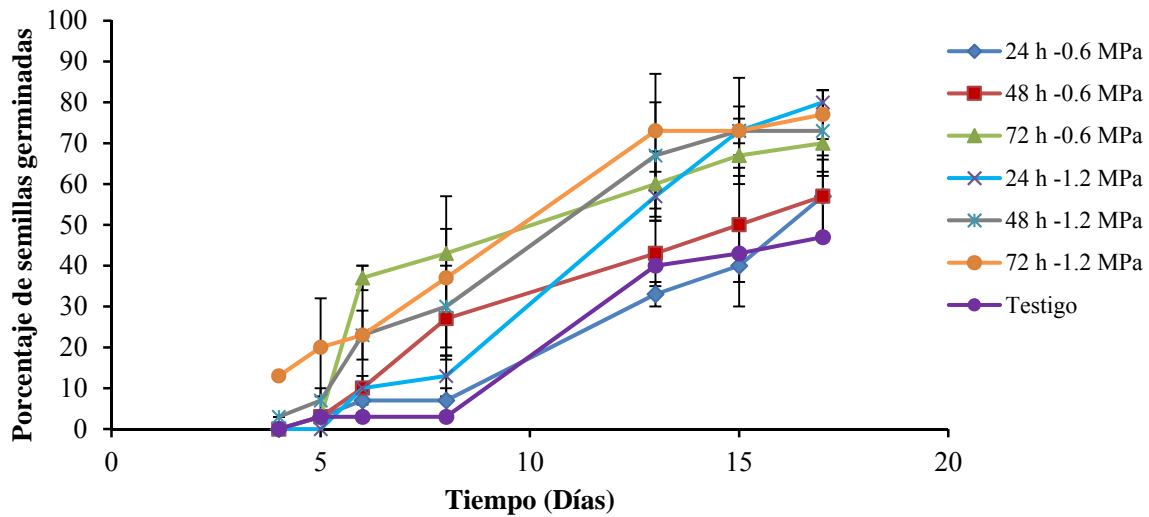


Figura 17. Cinética de germinación de semillas de chile piquín procedentes de Tuxpan, Ver., después de ser pre-acondicionadas osmóticamente con  $\text{KNO}_3$  a diferentes niveles de concentración y tiempos de exposición.  $n= 3$ , barras verticales indican la desviación estándar.

#### 4.6. Respuesta de las colectas a tratamientos promotores de la germinación

En este experimento se evaluó el efecto de dos factores, colectas y promotores de germinación, así como su interacción. Los datos de germinación registrados a los 7, 14 y 21 días, en las 16 colectas de piquín pre-tratadas con promotores de la germinación (Cuadro 9), evidenciaron que en las tres fechas de medición hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.0001$ ) entre colectas y entre promotores, así como de la interacción promotores x colectas, efectos que representaron las siguientes proporciones de la variación total debida a tratamientos: 55 %, 28 % y 17 %, respectivamente, lo cual indica que la principal fuente de variación fue el factor colectas, seguido de los tratamientos con promotores, y al final la interacción.

En promedio de las 16 colectas, el mejor tratamiento promotor de la germinación fue el  $\text{AG}_3$  (Figura 18), mientras que el  $\text{KNO}_3$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  produjeron un comportamiento



germinativo similar al testigo. Este resultado coincide con el obtenido en semillas de papayo (*Carica papaya* L.) por Andrade-Rodríguez *et al.* (2008).

El comportamiento de cada colecta en promedio de todos los tratamientos, se muestra en la Figura 19 en la que se hace evidente la amplia variación entre colectas en cuanto a su capacidad germinativa.

Cuadro 9. Análisis de varianza para germinación de semillas registrada en tres fechas (7, 14 y 21 días), de 16 colectas de Chile Piquín.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
<b>7 días</b>					
Modelo	63	4.62	0.07	18.5	0.0001
Promotores (P)	3	0.14	0.05	12.1	0.0001
Colectas (C)	15	3.37	0.22	56.8	0.0001
C x P	45	1.10	0.02	6.2	0.0001
<b>14 días</b>					
Modelo	63	13.94	0.22	13.8	
Promotores (P)	3	2.10	0.70	43.8	0.0001
Colectas (C)	15	9.77	0.65	40.7	0.0001
C x P	45	2.06	0.05	2.9	0.0001
<b>21 días</b>					
Modelo	63	18.42	0.29	17.3	0.0001
Promotores (P)	3	5.02	1.67	99.1	0.0001
Colectas (C)	15	10.45	0.70	41.3	0.0001
C x P	45	2.95	0.06	3.9	0.0001

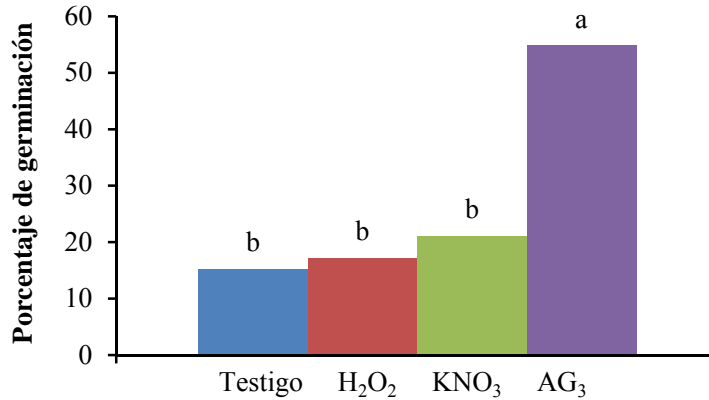


Figura 18. Porcentaje de germinación en semillas de chile piquín en respuesta a tratamientos promotores de germinación en promedio de 16 colectas. n=48.

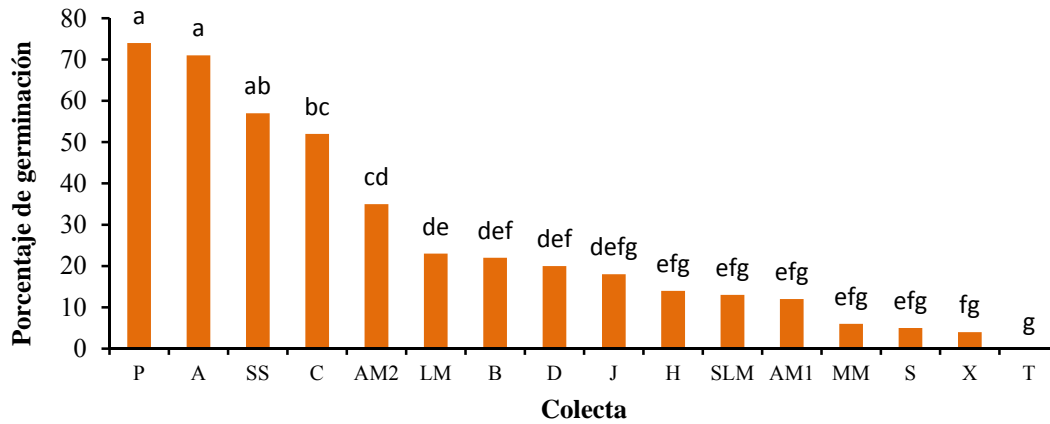


Figura 19. Germinación de semillas de chile piquín de 16 colectas, en promedio de los cuatro tratamientos promotores de germinación aplicados. A, Acaponeta; M1, Arizona M1; M2, Arizona M2; B, Babiácora; C, Cuetzalan; D, Badiraguato; SS, Sierra Sonora; H, Huepac; J, Tomatlán; LM, La Montosa; MM, La Montosa Moctezuma; P, Tuxpan; SLM, Soto La Marina; S, Sonora; T, Tepic y X, Xicotepac. Letras distintas indican diferencia significativa entre colectas. n=12.

Las semillas sin tratamiento obtuvieron tasas de germinación muy bajas, con excepción de las colectas de Acaponeta y Tuxpan que presentaron 66% de germinación (Cuadro 10).

El Cuadro 10 muestra el bajo porcentaje de germinación natural de las semillas empleadas en este estudio, razón por la cual se evaluaron los diferentes tratamientos aplicados. Hay algunas especies que no requieren de tratamientos adicionales para mejorar su germinación, pero al establecerse como cultivos comerciales siempre se busca alcanzar la máxima germinación para tener la mayor productividad. Como el ejemplo de papayo cuya semilla de forma natural tiene una germinación de 80 % (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2008) y la cebolla de 82 % (Marín Sánchez *et al.*, 2007).

Cuadro 10. Germinación en semillas de chile piquín de 16 colectas sin tratamiento (testigo). n=3.

Colecta	Dia										
	3	6	7	8	10	12	13	14	15	17	21
	Germinación (%)										
Acaponeta	0	63	66	66	66	66	66	66	66	66	66
Arizona M1	0	0	0	0	0	3	3	10	10	10	13
Arizona M2	0	0	0	0	6	10	10	16	16	16	20
Babiácora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cuetzalan	0	0	0	3	6	6	6	6	13	20	20
Badiraguato	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3
Huepac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tomatlán	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3
Xicoteppec	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	6
La Montosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Montosa Moctezuma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tuxpan	0	3	20	20	33	46	46	56	56	66	66
Soto La Marina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Sierra Sonora	0	3	6	13	23	23	33	33	40	40	40
Sonora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tepic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



La aplicación del AG<sub>3</sub> tuvo buena respuesta en 10 de las 16 colectas tratadas (Cuadro 11). Esto se ha encontrado en trabajos previos con chile piquín y otras especies. En chile piquín, Araiza Lizarde *et al.* (2011) y García Federico *et al.* (2010) aplicaron AG<sub>3</sub> a 400 ppm y lograron aumentar la germinación de 20 a 66 % y de 33 a 86 %, respectivamente. En semillas de papayo la germinación también se incrementó de 80 a 100 % con la aplicación de dicha fitohormona (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2008). En *Ischaemum rugosum* se alcanzó 66 % de germinación contra 20 % del testigo (Jarma *et al.*, 2007) pero en semillas de *Vaccinium meridionale* (Magnitskiy y Ligarreto, 2007) y de *Nicotiana benthamiana* (Wünschová *et al.*, 2009) no hubo diferencia significativa entre la aplicación de AG<sub>3</sub> y el testigo.

Cuadro 11. Germinación en semillas de chile piquín de 16 colectas después de tratarlas con 5 g L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>. n=3.

Colecta	Germinación (%)										
	Día 3	6	7	8	10	12	13	14	15	17	21
Acaponeta	0	0	0	0	0	6	6	20	20	20	26
Arizona M1	0	0	3	3	13	16	16	40	40	43	63
Arizona M2	0	10	20	23	43	43	53	86	86	90	90
Babiácora	0	6	26	33	53	53	66	66	76	76	76
Cuetzalan	0	3	6	16	36	36	63	63	70	76	83
Badiraguato	0	6	26	33	53	53	66	66	76	76	76
Huepac	0	3	10	13	23	23	36	36	46	53	56
Tomatlán	0	0	0	0	10	10	40	40	63	63	66
Xicotepec	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Montosa	3	6	6	16	26	26	33	36	43	43	53
La Montosa Moctezuma	0	0	0	3	6	6	16	16	20	26	26
Tuxpan	0	0	26	26	70	93	93	93	93	93	93
Soto La Marina	0	0	0	0	0	0	6	6	26	36	50
Sierra Sonora	0	20	26	36	46	46	63	63	66	76	76
Sonora	0	0	10	10	13	13	18	20	23	23	23
Tepic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Como se muestra en la Figura 20, el tratamiento de AG<sub>3</sub> tuvo un efecto promotor de la germinación en todas las colectas de chile piquín, con excepción de las colectas Tepic y

Xicotepec las cuales no presentaron germinación. Según la prueba de tetrazolio, la colecta de Xicotepec sólo tenía 10 % de sus semillas viables, pero no lograron germinar ni siquiera con la aplicación del tratamiento promotor.

Con la aplicación de AG<sub>3</sub> las semillas de Babiácora incrementaron su germinación de cero a 90 % y las Badiraguato de 3 a 76 %. Este resultado indica que tratamientos de AG<sub>3</sub> a altas concentraciones pueden promover la germinación sin ser tóxicos. Dicho efecto coincide con el encontrado por Ramírez-Meraz (2002) en colectas de Tamaulipas, donde logró incrementar el porcentaje de germinación de 1 a 75% con 5000 ppm de AG<sub>3</sub>. También García Federico *et al.* (2004) logró incrementar de 33 a 82% la germinación en colectas de chile piquín de tres localidades de Querétaro, con el mismo tratamiento.

Además se confirmó que la semilla del chile piquín no tiene barreras físicas contra la permeabilidad, ya que el tratamiento se aplicó sólo por 24 h y fue suficiente para que se absorbiera el AG<sub>3</sub> y lograra causar efecto en la semilla.

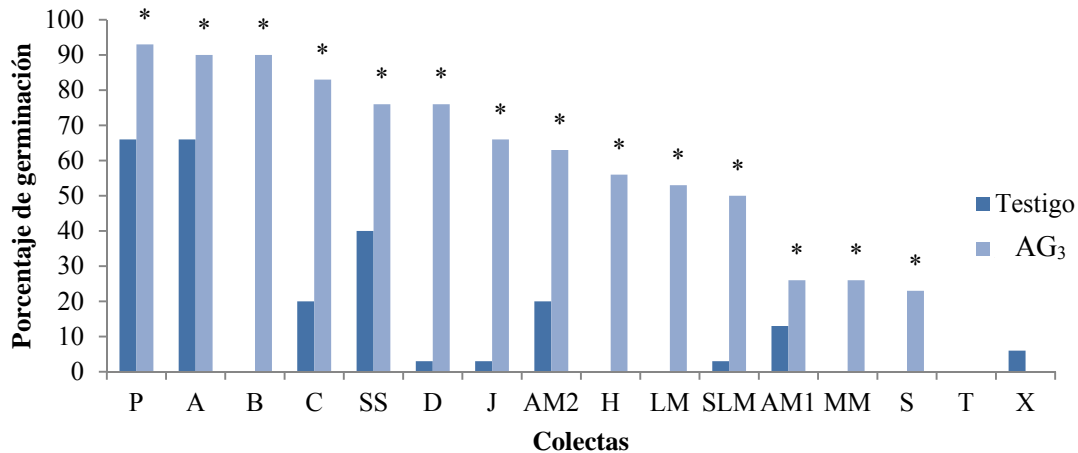


Figura 20. Efecto del AG<sub>3</sub> en la germinación de semillas de chile piquín de 16 colectas. A, Acajoneta; M1, Arizona M1; M2, Arizona M2; B, Babiácora; C, Cuetzalan; D, Badiraguato; SS, Sierra Sonora; H, Huepac; J, Tomatlán; LM, La Montosa; MM, La Montosa Moctezuma; P, Tuxpan; SLM, Soto La Marina; S, Sonora; T, Tepic y X, Xicotepec. (\*) Indica diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento; n=3.

En todas las colectas, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentó un efecto similar al testigo, mientras que en la colecta Babiácora promovió en 80 % la germinación (Cuadro 12). Este resultado coincide

con el obtenido por Patade *et al.* (2011) en semillas de *Capsicum annuum* var. California Wonder quien observó además de un aumento en la germinación, plántulas de mayor tamaño y mayor índice de supervivencia al trasplante, comparado con el testigo. Pero difiere con el resultado observado en *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl., que recibió el mismo tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % por 24 h y funcionó muy bien como desinfectante pero su efecto en la germinación no fue significativo (Flores García *et al.*, 2008).

Cuadro 12. Germinación en semillas de chile piquín de 16 colectas después de tratarlas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%. n=3.

Colecta	Germinación (%)											
	Día 3	6	7	8	10	12	13	14	15	17	21	
Acaponeta	0	43	56	56	56	63	63	70	70	73	73	
Arizona M1	0	0	0	0	3	6	6	10	10	10	10	
Arizona M2	0	0	0	0	13	13	13	13	13	13	16	
Babiácora	0	0	0	0	0	0	0	0	43	65	83	
Cuetzalan	0	36	36	36	46	53	53	53	53	56	56	
Badiraguato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Huepac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tomatlán	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	
Xicotepec	0	0	0	0	3	3	3	6	6	6	6	
La Montosa	0	3	6	6	6	10	10	10	10	10	10	
La Montosa Moctezuma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tuxpan	0	10	23	23	33	43	43	46	46	53	53	
Soto La Marina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sierra Sonora	0	3	10	10	13	26	26	40	40	43	46	
Sonora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tepic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

En la Figura 21 se puede apreciar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparado con el testigo, y que sólo dos colectas tuvieron una diferencia significativa al ser tratadas con dicho promotor.

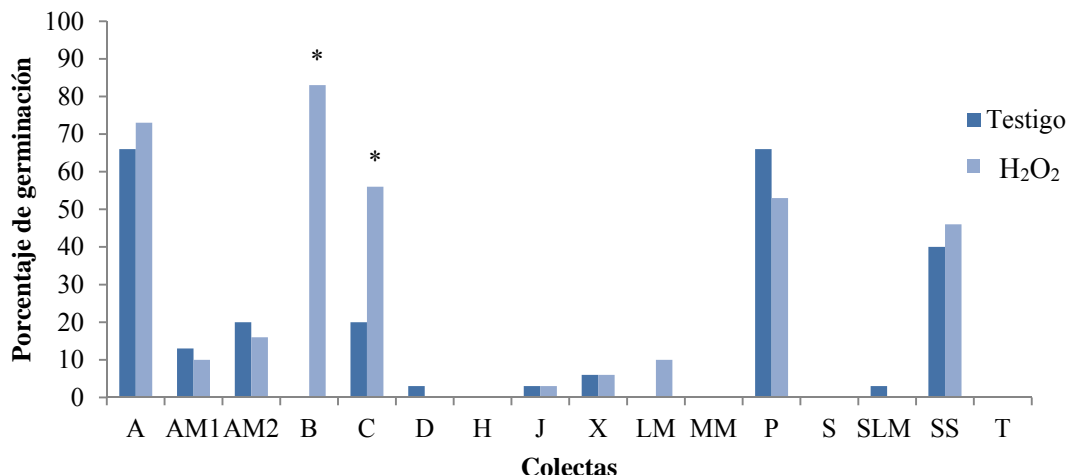


Figura 21. Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la germinación de semillas de chile piquín de 16 colectas. A, Acajoneta; M1, Arizona M1; M2, Arizona M2; B, Babiácora; C, Cuetzalan; D, Badiraguato; SS, Sierra Sonora; H, Huepac; J, Tomatlán; LM, La Montosa; MM, La Montosa Moctezuma; P, Tuxpan; SLM, Soto La Marina; S, Sonora; T, Tepic y X, Xicotepec. (\*) Indica diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento; n=3.

El KNO<sub>3</sub> tuvo un efecto promotor de la germinación muy variable entre las colectas de chile piquín (Cuadro 13). Al final de la prueba de germinación, únicamente en tres colectas logró aumentar la germinación en porcentajes variables respecto al testigo: Arizona M2: 43 %, Cuetzalan 50 %, Sierra Sonora 60 % y La Montosa 30 % (Figura 22).

En semillas de *I. rugosum* el KNO<sub>3</sub> mejoró la germinación de 20 % hasta 96 % (Jarma *et al.*, 2007). En el caso de *Pinus bungeana* el porcentaje de germinación aumentó de 13.3 a 43.3 % con respecto al testigo.

En el caso de *V. meridionale* el KNO<sub>3</sub> no tuvo diferencia contra el testigo sino hasta los 35 días después de siembra, cuando alcanzó 50 % de germinación contra 38 % del testigo. En este momento, el tratamiento de KNO<sub>3</sub> tuvo el mismo resultado que el AG<sub>3</sub>, para esta especie (Magnitskiy y Ligarreto, 2007). Cuando se aplicó KNO<sub>3</sub> a semillas de papayo no hubo diferencia significativa entre éste y el testigo, con respecto a la germinación (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2008).

Por otro lado, el  $KNO_3$  también puede inhibir la germinación, como en el caso de cebolla *A. cepa* cv. Early Supreme, en la que este tratamiento redujo la germinación de 82 a 73 % y no presentó ninguna ventaja en uniformidad de emergencia (Guo Su-Juan, 2012; Marín Sánchez *et al.*, 2007).

Cuadro 13. Germinación en semillas de chile piquín de 16 colectas después de tratarlas con  $KNO_3$  a -1.2 MPa por 24 h. n=3.

Colecta	Germinación (%)										
	Día 3	6	7	8	10	12	13	14	15	17	21
Acaponeta	0	13	13	13	40	46	46	53	53	53	56
Arizona M1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arizona M2	0	0	0	3	6	13	13	40	40	43	43
Babiácora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cuetzalan	0	23	26	26	26	33	33	40	40	40	50
Badiraguato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Huepac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tomatlán	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Xicotepec	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
La Montosa	0	3	3	3	10	13	13	26	26	30	30
La Montosa Moctezuma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tuxpan	0	7	20	20	40	60	60	80	80	83	83
Soto La Marina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sierra Sonora	0	16	20	20	33	43	43	60	60	66	66
Sonora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tepic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En la Figura 22 se muestran las diferencias en germinación de semillas de chile piquín con aplicación de  $KNO_3$  y el testigo.

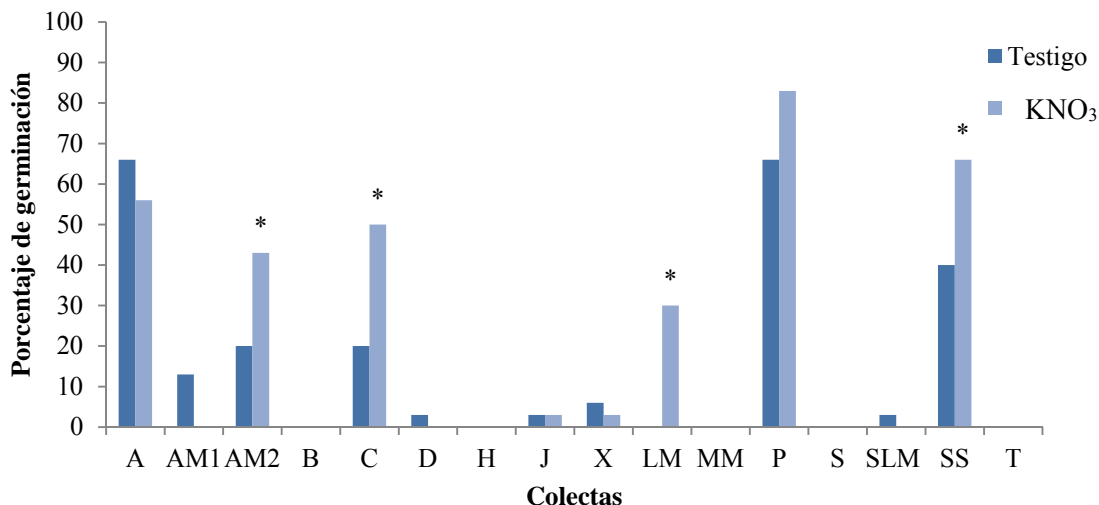


Figura 22. Efecto del KNO<sub>3</sub> en la germinación de semillas de chile piquín de 16 colectas. A, Acaponeta; M1, Arizona M1; M2, Arizona M2; B, Babiácora; C, Cuetzalan; D, Badiraguato; SS, Sierra Sonora; H, Huepac; J, Tomatlán; LM, La Montosa; MM, La Montosa Moctezuma; P, Tuxpan; SLM, Soto La Marina; S, Sonora; T, Tepic y X, Xicotepec (\*)Indica diferencia significativa entre el Testigo y el tratamiento; n= 3.

#### 4.7. Estructura de la semilla

La semilla de chile piquín es de forma redondeada, tamaño pequeño (perímetro 5.8 a 8.2 mm), de embrión curvo, con eje hipocótilo-radicular prominente, endospermo presente, cubierta seminal de superficie rugosa, el hilio o cicatriz es un poro. Esta semilla carece de estructuras accesorias como arilo, carúncula y elaiosoma (Figura 23).

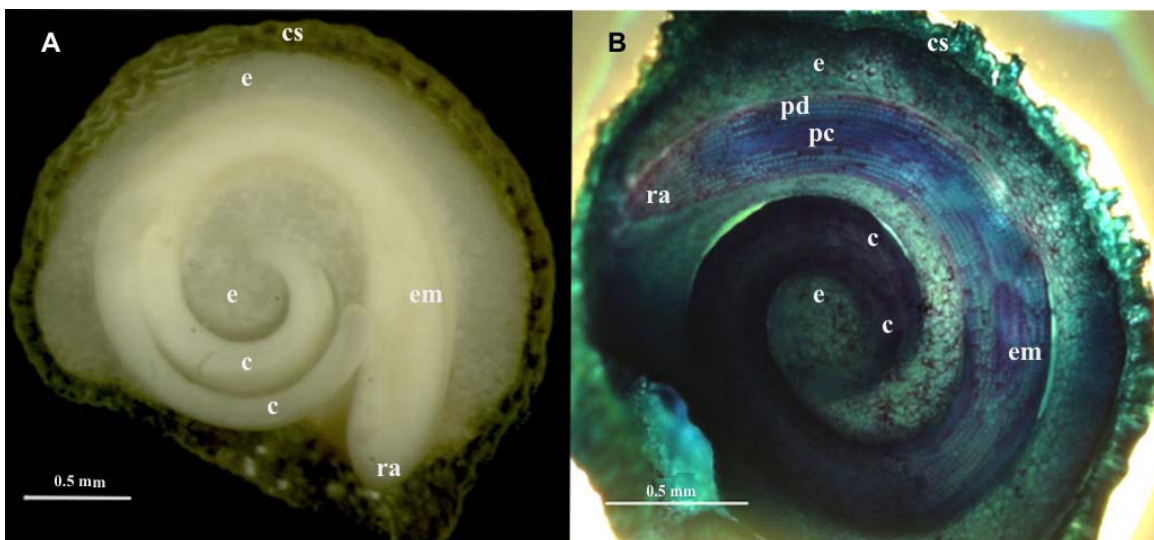


Figura 23. **A**, Estructura de una semilla de chile piquín colecta Tuxpan sin tinción. Fotografía tomada con microscopio estereoscópico de laboratorio. **B**, Corte mediano de semilla de chile piquín colecta Tomatlán teñida con azul de metileno. Fotografía obtenida de luz transmitida en un microscopio óptico compuesto Axioskop 2 plus (Zeiss, Alemania) del laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. **c**, cotiledones; **cs**, cubierta seminal; **e**, endospermo; **em**, embrión; **pc**, procámbium; **pd**, protodermis; **ra**, radícula.

#### 4.7.1. Cortes histológicos

Durante la preparación de los cortes en semillas de chile piquín se presentaron diversos problemas para el manejo de los tejidos, ya que hubo desprendimiento de cotiledones y ejes embrionarios durante la deshidratación, desparafinado y tinción, de tal modo que se perdió una cantidad importante de muestras y sólo se pudieron obtener las siguientes fotografías (Figura 24).



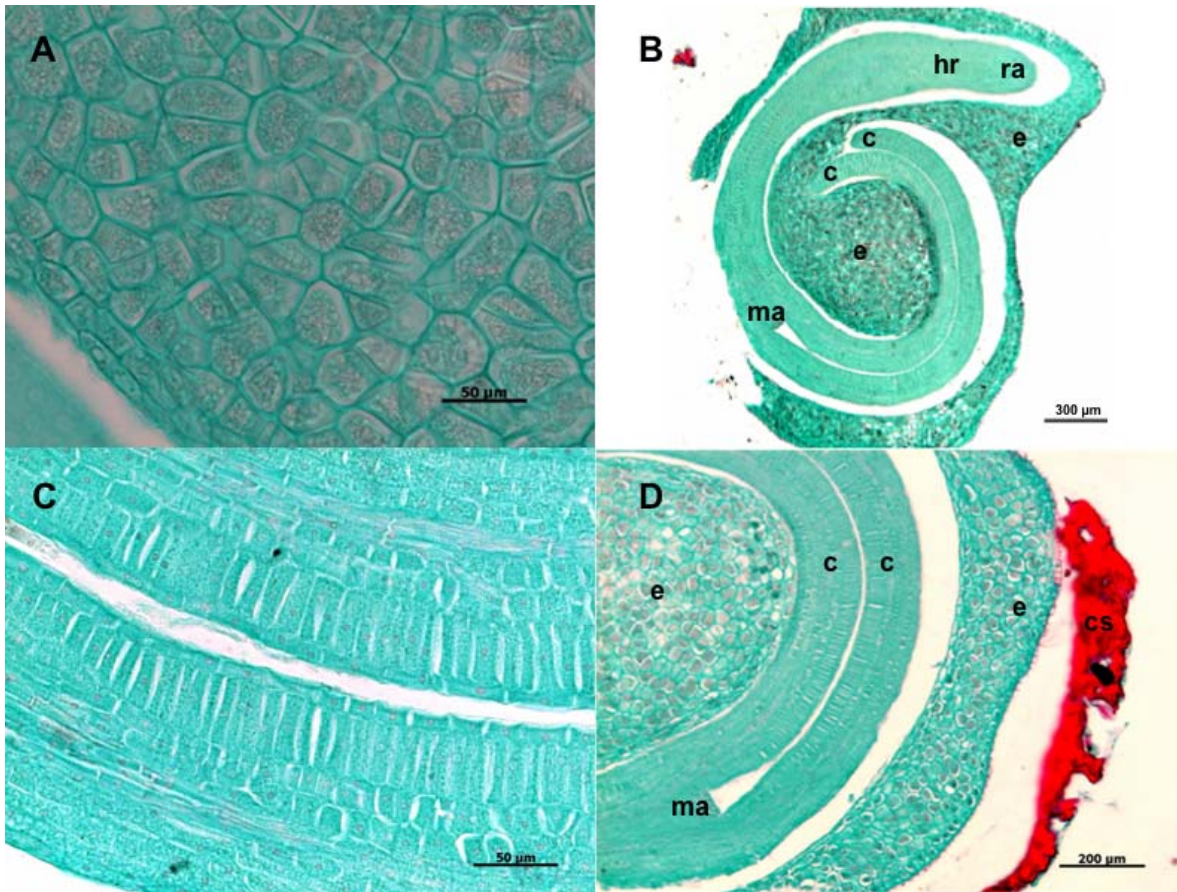


Figura 24. Anatomía de la semilla de chile piquín de la colecta Tuxpan teñidas con safranina-verde fijo. **A**, células del endospermo; **B** corte mediano de la semilla; **C**, células en empalizada de los cotiledones; **D**, corte de la semilla de chile piquín misma colecta. **c**, cotiledones; **cs** cubierta seminal; **e**, endospermo; **hr**, eje hipocótilo-radicular; **ma**, meristemo apical del vástago; **ra**, radícula.



#### 4.7.2. Fotografías con MEB (Microscopía electrónica de barrido)

Al ser esta técnica de alto costo se realizaron sólo algunas fotografías para ilustrar la anatomía de las semillas de chile piquín y se obtuvieron las imágenes siguientes (Figura 25).

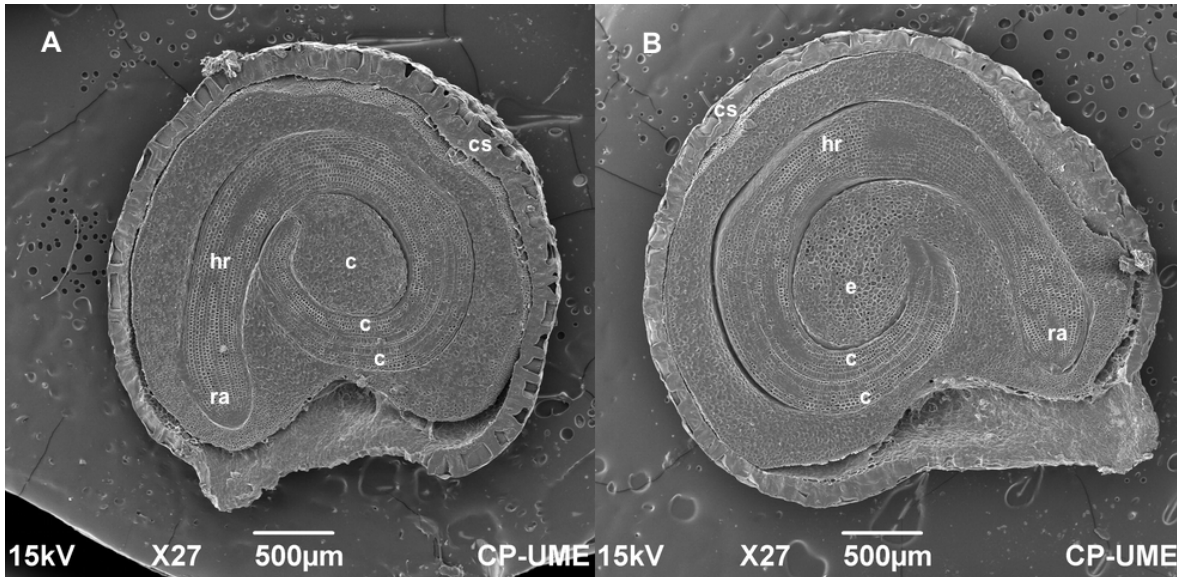


Figura 25. **A**, Corte mediano de la semilla de chile piquín colecta Tuxpan. **B**, Corte mediano de la semilla de chile piquín colecta Tepic. Fotografía propia tomada con Microscopio Electrónico de Barrido JSM-6390LV® (Jeol, Japan). **c**, cotiledones; **cs**, cubierta seminal; **e**, endospermo; **hr**, eje hipocótilo-radicular; **ra**, radícula.

#### 4.7.3. Tinción de polisacáridos insolubles, APS

Con la tinción de Schiff se pudo diferenciar el embrión de la semilla con el objetivo de medir las variables morfológicas de la semilla. Un ejemplo de las fotografías que se obtuvieron, son las siguientes imágenes (Figura 26).

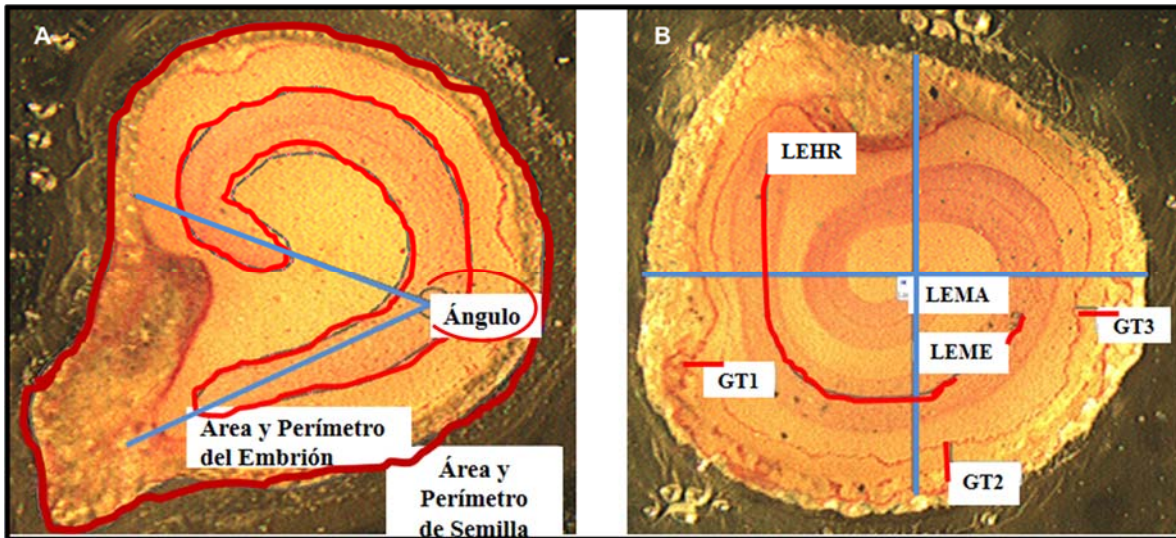


Figura 26. Desgaste en el plano mediano de la semilla de chile piquín. **A**, Semilla de colecta Acaponeta con la medida del área y perímetro del embrión, área y perímetro del corte completo y el ángulo de curvatura del embrión. **B**, Semilla de la colecta Tomatlán con la medida de la longitud del eje hipocótilo radicular (LEHR), grosor en tres puntos de la cubierta seminal (GT1, 2, 3), longitud del eje mayor (LEMA) y longitud del eje menor (LEME).

Los datos anatómicos obtenidos de las fotografías evidenciaron que existe una relación directa entre el tamaño de la semilla y el tamaño del embrión (Cuadro 14), ya que a mayor área de semilla el área del embrión también es mayor. En cambio, los perímetros de la semilla y del embrión tienen valores similares, esto se explica porque el embrión se acomoda a lo largo de casi todo el endospermo. En cuanto al tamaño de la semilla no hubo diferencias entre colectas, con excepción de la colecta Tepic cuya semilla es más pequeña que las demás.

Cuadro 14. Dimensiones (áreas y perímetros) de las partes de la semilla en corte mediano. Las 10 colectas de chile Piquín se agruparon por capacidad de germinación.

Colectas y nivel de germinación	Perímetro de semilla (mm)	Área de semilla (mm <sup>2</sup> )	Perímetro del embrión (mm)	Área del embrión (mm <sup>2</sup> )
<b><i>Germinación alta</i></b>				
Acaponeta, Nay.	7.8 ± 0.6 ab	4.0 ± 0.7 c	7.1 ± 1.1 ef	0.97 ± 0.21 cd
Tuxpan, Ver.	8.2 ± 0.4 a	4.8 ± 0.5 a	9.1 ± 1.2 bc	1.35 ± 0.25 a
<b><i>Germinación media</i></b>				
Arizona M2, EE.UU.	6.4 ± 0.3 c	3.0 ± 0.3 de	6.9 ± 0.5 ef	0.72 ± 0.08 e
Cuetzalan, Pue.	8.1 ± 0.7 a	4.6 ± 0.7 ab	8.6 ± 0.9 cd	1.19 ± 0.13 ab
<b><i>Germinación baja</i></b>				
Babiácora, Son.	8.2 ± 0.4 a	4.8 ± 0.5 a	10.6 ± 1.2 a	1.34 ± 0.19 a
Badiraguato, Sin.	6.3 ± 0.2 cd	2.9 ± 0.3 e	7.7 ± 0.9 de	0.81 ± 0.09 de
Tomatlán, Jal.	8.1 ± 0.2 a	4.7 ± 0.2 a	10 ± 1.2 ab	1.24 ± 0.15 a
La Montosa Moctezuma, Son.	6.6 ± 0.4 c	3.1 ± 0.3 d	7.7 ± 0.8 de	0.79 ± 0.10 de
Soto La Marina, Tam.	7.5 ± 0.3 b	4.1 ± 0.2 bc	8.5 ± 0.7 cd	1.03 ± 0.08 bc
Tepic, Nay.	5.8 ± 0.4 d	2.5 ± 0.3 e	6.3 ± 0.5 f	0.66 ± 0.08 e

Los datos son promedios ± DE (n= 12).

No se observa una relación entre el tamaño de las semillas y el origen de las colectas.

En cuanto a los cocientes entre variables anatómicas, las colectas mostraron resultados similares (Cuadro 15). El grosor de la cubierta seminal es muy similar en todas las colectas, con excepción de las de Tepic y Badiraguato que fueron las más delgadas (0.12 mm). La colecta Babiácora sobresale de otras colectas en la longitud del eje hipocótilo-radícula, aunque esto no le confiere ventajas en la germinación, como se mostró anteriormente. La razón entre las áreas del embrión/área de semilla en corte mediano también resultó similar en todas las colectas, lo que indica que el embrión ocupa en promedio 26 % de la semilla.

Cuadro 15. Índices morfológicos y anatómicos de 10 colectas de chile piquín agrupadas por capacidad de germinación.

Colecta y nivel de germinación	GT (mm)	LEHR (mm)	AE / AS	AS / AE
<b><i>Germinación alta</i></b>				
Acaponeta, Nay.	0.14 ± 0.02abcd	2.43 ± 0.27bc	0.24 ± 0.05a	4.26 ± 0.82a
Tuxpan, Ver.	0.15 ± 0.02abc	2.58 ± 0.42 b	0.28 ± 0.04a	3.66 ± 0.53a
<b><i>Germinación media</i></b>				
Arizona M2, EE.UU.	0.14 ± 0.05abcd	2.07 ± 0.36cd	0.24 ± 0.02a	4.13 ± 0.36a
Cuetzalan, Pue.	0.14 ± 0.01abcd	2.47 ± 0.38bc	0.26 ± 0.05a	3.93 ± 0.74a
<b><i>Germinación baja</i></b>				
Babiácora, Son.	0.15 ± 0.03ab	3.03 ± 0.21a	0.28 ± 0.03a	3.60 ± 0.44a
Badiraguato, Sin.	0.12 ± 0.01cd	2.25 ± 0.25bc	0.28 ± 0.02a	3.58 ± 0.30a
Tomatlán, Jal.	0.16 ± 0.02a	2.66 ± 0.37ab	0.26 ± 0.03a	3.87 ± 0.43a
La Montosa	0.13 ± 0.01bcd	2.33 ± 0.31bc	0.25 ± 0.03a	4.00 ± 0.59a
Moctezuma, Son.				
Soto La Marina, Tam.	0.15 ± 0.02abc	2.43 ± 0.25bc	0.25 ± 0.02a	3.99 ± 0.32a
Tepic, Nay.	0.12 ± 0.01d	1.79 ± 0.22d	0.27 ± 0.02a	3.72 ± 0.35a

GT, grosor de la cubierta seminal; LEHR, longitud del eje hipocótilo radicular; AS, área de la semilla; y AE, área del embrión. Los valores son promedios ± desviación estándar de medidas (n = 12).

Los embriones con mayor curvatura (curvatura  $428^{\circ} \pm 61.64^{\circ}$ ) fueron observados en una colecta con bajo nivel de germinación, la colecta Tomatlán, Jal. y los embriones con menor curvatura ( $265 \pm 65.48$ ) fueron observados en la colecta Acaponeta, Nayari, de alto nivel de germinación. Una tendencia general fue que las semillas con baja germinación tendieron a presentar las mayores curvaturas  $> 380 \pm 68.6$ . (Cuadro 16). En todas las colectas el embrión se enrolla y los cotiledones siguen el mismo acomodo. La curvatura del embrión es muy similar al encontrado en semillas de *Opuntia* spp. (Guerrero *et al.*, 2006). Estos índices anatómicos muestran que las semillas de estas colectas de chile piquín están muy cerca de llegar a la redondez total, ya que su valor de alargamiento es muy bajo. El índice de redondez de estas semillas es muy similar a los evaluados en frutos de durazno, y

aunque el tamaño es muy diferente el nivel de redondez es similar (García M., 2006). El diámetro Ferret indica que las semillas tienen alto nivel de compactación. Los datos obtenidos no muestran una diferencia anatómica clara que permita distinguir una semilla con alta germinación de una de baja germinación (Cuadro 16).

Cuadro 16. Curvatura del embrión y tres índices anatómicos de semilla de 10 colectas de chile piquín agrupadas por nivel de germinación.

Colecta y nivel de germinación	CE (°)	DF	IR	IA
<b><i>Germinación alta</i></b>				
Acaponeta, Nay.	265 ± 65.48e	2.26 ± 0.18c	0.82 ± 0.06b	1.13 ± 0.09b
Tuxpan, Ver.	322 ± 22.4de	2.48 ± 0.12a	0.90 ± 0.01a	1.16 ± 0.11ab
<b><i>Germinación media</i></b>				
Arizona M2, EE.UU.	309 ± 56.16cde	1.94 ± 0.08d	0.90 ± 0.03a	1.22 ± 0.14ab
Cuetzalan, Pue.	305 ± 26.87bcde	2.42 ± 0.18a	0.89 ± 0.04a	1.14 ± 0.09ab
<b><i>Germinación baja</i></b>				
Babiácora, Son.	380 ± 68.64abc	2.46 ± 0.12a	0.90 ± 0.03a	1.20 ± 0.08ab
Badiraguato, Sin.	392 ± 61.00ab	1.91 ± 0.09de	0.91 ± 0.04a	1.20 ± 0.10ab
Tomatlán, Jal.	428 ± 61.64a	2.45 ± 0.05a	0.90 ± 0.02a	1.13 ± 0.06ab
La Montosa, Son.	382 ± 77.62ab	1.99 ± 0.10d	0.89 ± 0.02a	1.27 ± 0.13a
Soto La Marina, Tam.	352 ± 56.46bcd	2.28 ± 0.06bc	0.92 ± 0.03a	1.15 ± 0.10ab
Tepic, Nay.	303 ± 13.91de	1.76 ± 0.11e	0.91 ± 0.04a	1.21 ± 0.13ab

CE, curvatura del embrión; DF, diámetro Ferret; IR, índice de redondez; IA, índice de alargamiento. Los datos son promedios ± desviación estándar (n= 12).

Se hizo un análisis de correlación de Pearson con todas las variables anatómicas evaluadas para saber qué tanto dependían unas de otras y el resultado se presenta en el Cuadro 17. El área de la semilla y el perímetro del embrión tienen una correlación alta, es decir, que a mayor tamaño de semilla, mayor tamaño de embrión. Esto implica que el esfuerzo biológico está equilibrado entre la semilla y el embrión.

Cuadro 17. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables anatómicas promedio de las 10 colectas de semillas de chile piquín evaluadas.

	AS	PE	AE	GT	LEHR	CE	AE / AS
PE	0.71 **						
AE	0.87 **	0.87 **					
GT	0.47 **	0.32 **	0.38 **				
LEHR	0.66 **	0.74 **	0.70 **	0.40 **			
CE	0.07 ns	0.51 **	0.23 **	0.16 ns	0.30 **		
AE / AS	-0.55 ns	0.45 **	0.44 **	-0.11 ns	0.21 *	0.34 **	
AS / AE	0.08 ns	-0.44 **	-0.41 **	0.09 ns	-0.19 *	-0.39 **	-0.98 **

PE, perímetro del embrión; AE, área del embrión; AS, área de semilla; GT, grosor de cubierta seminal; LEHR, longitud del eje hipocótilo-radicular; CE, curvatura del embrión. n= 120, \* = significancia 0.01 a 0.05, \*\* = significancia menor o igual a 0.01 y ns = no significativo.

#### 4.8. Germinación *in vitro*

En esta prueba se logró un control de microorganismos muy efectivo, ya que sólo se presentaron dos casos de contaminación por hongos (Figura 27). Por lo que se recomienda el uso del método de desinfección aquí descrito para el cultivo *in vitro* de semillas de chile piquín. En otros trabajos reportados por Robledo y Carrillo (2004), Rodríguez-de-la-O y García-Ruíz (2008), González (2003), Flores García *et al.* (2008); se usaron tratamientos desinfectantes menos intensivos para explantes pero en este caso, se requirió un tratamiento más fuerte.



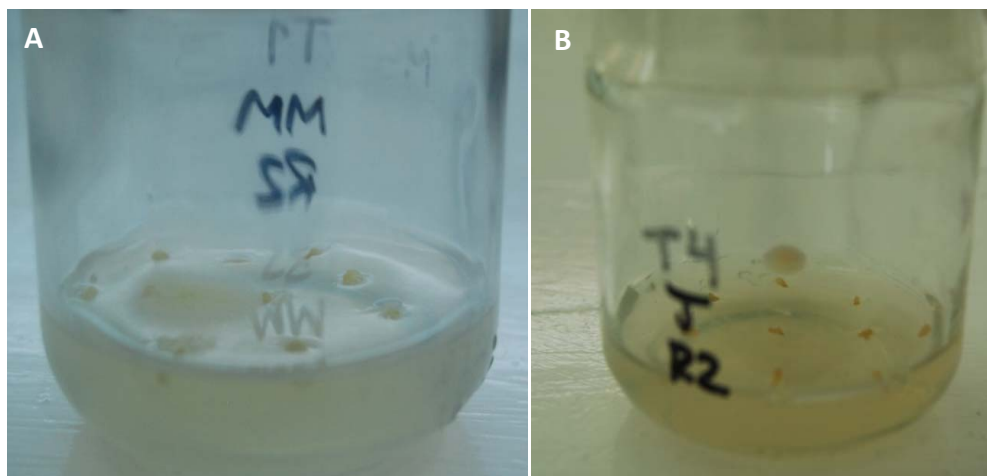


Figura 27. Cultivo *in vitro* de semillas de chile piquín contaminadas por hongos. **A**, semilla de chile piquín colecta La Montosa Moctezuma; **B**, semilla de colecta Tomatlán.

En cuanto a la germinación *in vitro* se observó un bajo porcentaje en todas las colectas, como se describe en el Cuadro 18. En contraste con las pruebas en cajas Petri donde se lograron porcentajes de germinación entre 0 y 60 % sin tratamiento; *in vitro* la germinación alcanzada fluctuó entre 0 y 11.3 %. Por tanto, resulta más conveniente la técnica *ex vitro*.

Cuadro 18. Germinación promedio en semillas de 15 colectas de chile piquín en cultivo *in vitro*. n=12.

Colecta	Germinación (%)
Acaponeta	7.9 ± 1.38
Arizona M1	0.0
Arizona M2	1.3 ± 0.45
Babiácora	0.8 ± 0.28
Cuetzalan	11.3 ± 1.36
González	0.0
Huepac	3.8 ± 0.82
Tomatlán	1.7 ± 0.48
La Montosa	0.0
La Mont Moctezuma	1.3 ± 0.61
Tuxpan	4.2 ± 0.83
San Carlos	0.0
Soto La Marina	0.0
Tepic	0.0
Xicotepec	2.1 ± 0.59

Se graficó por separado el efecto de los tratamientos aplicados (Figura 28) y sobresalió el tratamiento de ácido giberélico  $0.25 \text{ g L}^{-1}$  con 19 % de germinación, aunque es un resultado muy bajo comparado con la prueba *ex vitro*. En el caso de la prueba *in vitro* funciona mejor una concentración muy baja de AG<sub>3</sub> ( $0.25 \text{ g L}^{-1}$ ) que contrasta con la cantidad aplicada *ex vitro* ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ). Es importante señalar que la exposición de la semilla al AG<sub>3</sub> en las pruebas *in vitro* y *ex vitro* fue diferente, esto es, exposición continua vs. exposición durante 24 h.

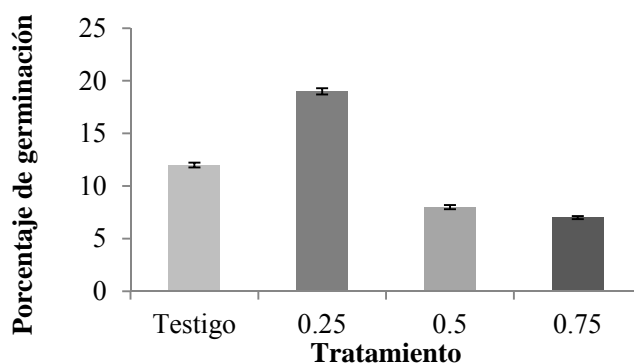


Figura 28. Porcentaje de germinación por tratamiento. T1, testigo; T2,  $0.25 \text{ g L}^{-1}$ ; T3,  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ; T4,  $0.75 \text{ g L}^{-1}$  de AG<sub>3</sub>. n= 45, barras verticales indican desviación estándar.

Este resultado se puede mejorar a través de más experimentos de desinfección de la semilla adecuados a cada colecta que ya no pudieron incluirse en el presente trabajo. Si se toma como referencia el cultivo *in vitro* de explantes reportado por Robledo y Carrillo (2004) se puede decir que sería más eficiente generar algunas plantas y a partir de allí cultivar explantes (producen 300 % de plantas) para evitar la siembra de semilla que presenta baja efectividad (10 % de plantas). Un resultado similar es el publicado por Berljak (1999) quien describió que el mejor explante para la regeneración de chile son los cotiledones.

Las plántulas obtenidas *in vitro* presentaron etiolación, con elongación de los hipocótilos por las condiciones de oscuridad en que se mantuvieron (Figura 29).



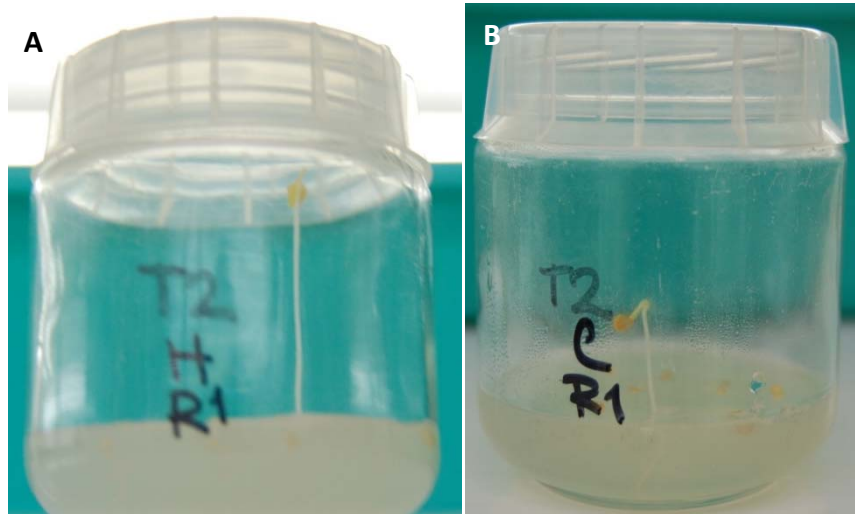


Figura 29. Semillas de chile piquín germinadas *in vitro*. **A**, semilla de chile piquín colecta Huepac con (T2)  $0.25 \text{ g L}^{-1}$  de AG<sub>3</sub>; **B**, semilla de chile piquín colecta Cuetzalan con el mismo tratamiento, ambas en (R1) repetición 1.

## 5. CONCLUSIONES

La proliferación de microorganismos es un evento muy común durante la germinación de las semillas de chile piquín y puede afectar dicho proceso. Para evitar la contaminación durante la germinación, se recomienda usar un tratamiento basado en fungicida Benlate® 0.4 % + plata coloidal estable (Microdyn®) 0.05 %, ya que reduce la contaminación sin perjudicar la germinación de las semillas. El uso de hipoclorito de sodio NaClO como desinfectante de semillas de chile piquín no se recomienda porque reduce el porcentaje de germinación final y a bajas concentraciones tiene un escaso efecto microbicida. La aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en semillas de chile piquín puede usarse para la desinfección de la semilla pero en algunos casos actúa también como promotor de la germinación, por lo que debe emplearse con las debidas precauciones. La prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio a 0.1 % de concentración y por 6 h, es útil para determinar si un lote de semillas no germina porque presentan muerte celular en el embrión o porque tiene cierto grado de latencia.

La humedad es absorbida por la semilla desde las primeras 8 horas de imbibición a través de todas sus estructuras, por lo que ninguna de estas constituye un impedimento para la germinación de las semillas de chile piquín. Durante la germinación hay redistribución de sustancias de reserva que se desplazan del endospermo hacia el embrión, para su germinación y crecimiento.

Los tratamientos de osmo-acondicionamiento con PEG-8000 y KNO<sub>3</sub> no tienen un efecto positivo sobre la germinación, mientras que los mejores resultados se alcanzaron aplicando AG<sub>3</sub> a 5 g L<sup>-1</sup> por 24 h. Las altas concentraciones de AG<sub>3</sub> (5 g L<sup>-1</sup>) pueden ser aplicadas para aumentar y adelantar la germinación en semillas latentes, como es el caso de chile piquín.

Las semillas de chile piquín pueden ser germinadas con técnicas *in vitro* pero es difícil generalizar un protocolo de germinación para todas las colectas probadas. En este tipo de germinación, es recomendable probar otros métodos de desinfección



donde se logre obtener de un 85 a 95 % de germinación o aplicar concentraciones bajas de AG<sub>3</sub> para obtener buenos resultados.

Las áreas absolutas de semilla y del embrión en corte mediano varían entre colectas. Las semillas más pequeñas con embriones pequeños fueron las colectas de Badiraguato y Arizona M2, y las semillas más grandes fueron de Babiácora, Tomatlán y Tuxpan. En contraste, las mayores áreas relativas del embrión (AE/AS) las presentaron Babiácora, Badiraguato, y Tuxpan, siendo éste un mejor indicador morfológico. La curvatura del embrión es un carácter taxonómico útil en el agrupamiento de semillas con embriones curvos de cactáceas, pero en Chile piquín este carácter no parece ser determinante, aunque los embriones con mayor curvatura fueron de semillas con bajo nivel de germinación. Las técnicas de microscopía empleadas para la observación de la estructura interna de las semillas fueron complementarias, aunque la técnica de microscopía electrónica de barrido produce imágenes de mayor resolución y de más fácil procesamiento, pero la técnica es más costosa.

## 6. APÉNDICE

Cuadro 1 A. Compuestos inorgánicos y orgánicos del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (MS).

Componentes inorgánicos	Cantidad (mg L <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.0
KNO <sub>3</sub>	1900.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370.0
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440.0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
Componentes orgánicos	
Tiamina · HCl	0.1
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina · HCl	0.5
Glicina	2.0
Mio – inositol	100.0

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Moctezuma, J. G., J. L. Rodríguez-de-la-O y J. García-Ruíz. 2008. Desinfección y selección inóculo *in vitro* de *Abies religiosa*. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 14(1): 11-14.
- Andrade-Rodríguez, M., J. J. Ayala-Hernández, I. Alia-Tejacal, H. Rodríguez-Mendoza, C. M. Acosta-Durán y V. López-Martínez. 2008. Efecto de promotores de la germinación y sustratos en el desarrollo de plántulas de papayo. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). (25): 617-635.
- Anese, S., E. A. A. Da Silva, A. C. Davide, J. M. Rocha Faria, G. C. M. Soares, A. C. B. Matos, and P. E. Toorop. 2011. Seed priming improves endosperm weakening, germination, and subsequent seedling development of *Solanum lycocarpum* St. Hil. Seed Science and Technology 39: 125-139.
- AOSA. 2000. Tetrazolium Testing Handbook. First revision. Association of Official Seed Analysts. 62 p.
- Araiza Lizarde, N., E. Araiza Lizarde y J. G. Martínez Martínez. 2011. Evaluación de la germinación y crecimiento de plántula de chiltepín (*Capsicum annum L.* variedad *glabriusculum*) en invernadero. Revista Colombiana de Biotecnología. XIII(2): 170-175.
- Azcón-Bieto, J. 1996. Fisiología y Bioquímica Vegetal. MacGraw-Hill/Interamericana. 581 p.
- Bañuelos, N., P. L. Salido y A. Gardea. 2008. Etnobotánica del chiltepín. Pequeño gran señor en la cultura de los sonorenses. Estudios Sociales CIAD 16(32): 177-205.
- Beresniewicz, M. M., A. G. Taylor, M. C. Goffinet, and B. T. Therune. 1995a. Characterization and location of a semipermeable layer in seed coats of leek, onion (Liliaceae), tomato and pepper (Solanaceae). Seed Science and Technology (23): 123-134.
- Beresniewicz, M. M., A. G. Taylor, M. C. Goffinet, and B. T. Therune. 1995b. Chemical nature of a semipermeable layer in seed coats of a leek, onion (Liliaceae), tomato and pepper (Solanaceae). Seed Science and Technology (23): 135-145.
- Berljak, J. 1999. *In vitro* plant regeneration from pepper (*Capsicum annum L.* cv. 'Soroksari') seedling explants. Phytion 39: 289-292.
- Bernal, L. I. 1994. Aspectos Bioquímicos de la Germinación y el Deterioro. Departamento de Bioquímica Vegetal. Facultad de Química. UNAM. México. 108 p.
- Berrie, A. M. M. 1984. Germination and dormancy. In M. B. Wilkins (Ed.), Advanced Plant Physiology (pp. 514). Great Britain: Pitman Publishing.



- Bewley, J. D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9: 1055-1066.
- Bewley, J. D., and M. Black. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum Press. USA. 357 p.
- Bonfil-Sanders, C., I. Cajero-Lázaro, y R. Y. Evans. 2008. Germinación de semillas de seis especies de *Bursera* del centro de México. *Agrociencia* 42: 827-834.
- Bozzola, J. J., and L. D. Russell. 1992. Specimen preparation for scanning electron microscopy. In: *Electron microscopy. Principles and techniques for biologists* (pp. 542). England: Jones and Bartlett Publishers.
- Bradford, K. J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *Horticultural Science* (21): 1105-1112.
- Burgass, R. W., and A. A. Powell. 1984. Evidence for repair processes in the invigoration of seeds by hydration. *Annals of Botany* (53): 753-757.
- Cesty Borda-Yepey, C., E. C. Saenz Tejada y G. P. Pereira Lima. 2007. Micropropagación de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. vía organogénesis directa. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 12(4): 1-12.
- Corner, E. J. H. 1976. *The Seeds of Dicotyledons*. (Vol. 2). Cambridge University Press. London, England. 304 p.
- Chen, P., and J. N. A. Lott. 1992. Studies of a *Capsicum annuum* seeds: structure, storage, reserves and mineral nutrients. *Canadian Journal of Botany* 70(3): 518-529.
- Dell'Aquila, A. 2004. Cabbage, lentil, pepper and tomato seed germination monitored by an image analysis system. *Seed Science and Technology* 32: 225-229.
- Desai, B. B., P. M. Kotecha, and D. K. Salunkhe. 1997. Chap. 2. Seed Morphology and Development. In: *Seeds Handbook. Biology, Production, Processing and Storage*. (pp. 7-28). USA: Marcel Dekker Inc.
- Esau, K. 1987. *Anatomía de las plantas con semilla*. Hemisferio Sur. Argentina. 512 p.
- Flores-Almaráz, R., M. Livera-Muñoz, M. T. Colinas-León, E. A. Gaytán-Acuña y A. Muratalla-Lúa. 2008. Producción de plántulas de ciclamen (*Cyclamen persicum* Mill.) en sustratos basados en polvo de bonote de coco. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 14: 309-318.
- Flores García, A., J. G. Álvarez Moctezuma, J. L. Rodríguez de la O y A. Corona Ambris. 2008. Germinación in vitro de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana* 10(2): 27-33.
- Gahan, B. P. 1984. *Plant Histochemistry and Citochemistry. An introduction*. Academic Press, Inc. England. 301 p.

- Gallo, C., J. M. Enrico, R. Craviotto y M. Arango. 2012. Variabilidad de la viabilidad y vigor de lotes de semillas de soja con presencia de simientes verdes pertenecientes a cultivares de distintos grupos de maduración producidos en dos fechas de siembra. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 38(2): 133-140.
- García Federico, A., S. Montes Hernández y J. A. Rangel Lucio. 2004. Calidad fisiológica de la semilla de chile piquín (*Capsicum annuum* var. *aviculare*) en dos localidades de Querétaro. Paper presented at the Breeding and Genetic Resources.
- García Federico, A., S. Montes Hernández, J. A. Rangel Lucio, E. García Moya y M. Mendoza Elos. 2010. Respuesta Fisiológica de la Semilla Chile Piquín [*Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill] al Ácido Giberélico e Hidrotermia. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(2): 203-216.
- García M., A. D. 2006. Caracterización física y química de duraznos (*Prunus persica* (L.) Batsch) y efectividad de la refrigeración comercial en frutos acondicionados. *Bioagro* 18(2): 115-121.
- García Villanueva, E. (1992). Caracterización foliar de 15 genotipos de durazno resistentes y susceptibles a cenicilla (*Sphaerotheca pannosa* (Wallr.) Lev.). Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, México.
- González, A. J. 2003. Desinfección de semilla de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo granja asturiana con antifúngicos y antibacterianos. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* (29): 461-470.
- Gray, D., L. K. Drew R., W. Bujalski, and A. W. Nienow. 1991. Comparison of polyethylene glycol polymers, betaine and L-proline for priming vegetable seeds. *Seed Science and Technology* (26): 363-376.
- Guerrero, M. P., M. H. A. Zavaleta, P. A. F. Barrientos, V. C. Gallegos, C. C. A. Núñez, M. E. Valadez y S. J. A. Cuevas. 2006. Técnica para el estudio de la micromorfología interna de semillas duras en *Opuntia* *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(2): 37-43.
- Guo Su-Juan, W. Y.-C., Wang Wen-Shu. 2012. Effects of priming treatments on germination and biochemical characteristics of *Pinus bungeana* seeds. *Forestry Studies in China* 14(3): 200-204.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester, and F. T. J. Davies. 1990. *Plant Propagation. Principles and Practices*. Prentice Hall. USA. 647 p.
- Hernández-Verdugo, S., R. G. López-España, F. Porras, S. Parra-Terraza, M. Villarreal-Romero y T. Osuna-Enciso. 2010. Variación en la germinación entre poblaciones y plantas de chile silvestre. *Agrociencia* 44(6): 667-677.
- Iracheta Donjuan, L., M. C. López Peralta, V. A. González Hernández, I. Sánchez Cabrera y E. Cárdenas Soriano. 2003. Variación genotípica en la capacidad organogénica in vitro del maíz. *Agrociencia* 37(5): 451-465.



- ISTA. 1985. Handbook on Tetrazolium Testing. International Seed Testing Association. Switzerland. 99 p.
- Jarma, A. J., J. C. Arbelaez y J. Clavijo. 2007. Germinación de *Ischaemum rugosum* Salisb. en respuesta a estímulos ambientales y químicos. *Temas Agrarios* 12(2): 31-41.
- Jensen, W. A. 1962. Botanical Histochemistry, Principles and Practice. W. H. Freeman. California, U.S.A. 408 p.
- Jiménez, M. J. N., H. T. Valdés y L. J. M. Garza. 1991. Aspectos generales sobre la germinación de semillas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R.&P.). *Revista Chapingo* XV(73-74).
- Kozlowski, T. T. 1971. Growth and Development of trees (Vol. 2). Academic Press. New York. 285 p.
- Lambers, H., F. S. Chapin, and T. L. Pons. 2008. Plant Physiological Ecology. Springer. USA. 604 p.
- López-Santiago, J., R. Nieto-Ángel, A. F. Barrientos-Priego, E. Rodríguez-Pérez, M. T. Colinas-León, M. W. Borys y F. González-Andrés. 2008. Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus spp.*). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2): 97-111.
- Magnitskiy, S. y G. A. Ligarreto. 2007. El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y del ácido indolacético sobre la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 1(2): 137-141.
- Marín Sánchez, J., J. A. Mejía Contreras, A. Hernández Livera, A. Carballo Carballo y A. Peña Lomelí. 2007. Acondicionamiento osmótico de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.). *Agricultura Técnica en México* 33: 63-71.
- Medina-Martínez, T., H. Villalón-Mendoza, J. Pérez-Hernández, G. Sánchez-Ramos y S. Salinas-Hernández. 2010. Avances y perspectivas de investigación del chile piquín en Tamaulipas, México. *Ciencia UAT* 4(16): 15-20.
- Microsoft. 2007. Microsoft Excel. USA: Microsoft.
- Motic, I. 2007. Motic Images Plus 2.0 ML: Motic China Group, CO., LTD.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murray, D. R. 1984. Seed Physiology. Academic Press. USA. 295 p.
- Núñez-Colín, C. A., M. A. Serrato-Cruz, M. T. Santos-Cortés, C. d. C. Luna-Morales, J. Martínez-Solís y J. A. Cuevas-Sánchez. 2011. Caracterización de *Tagetes filifolia*



- del centro-sur de México por morfometría de los aquenios. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 539-549.
- Palacios Román, R. 2000. Efecto de iones y otros factores físicos sobre la germinación de semillas. *Journal of de Mexican Chemical Society* 44(3): 233-236.
- Patade, V. Y., K. Maya, and A. Zakwan. 2011. Seed priming mediated germination improvement and tolerance to subsequent exposure to cold and salt stress in *Capsicum*. *Research Journal of Seed Science*: 1-12.
- Ramírez-Meraz, M. 2002. Chile Piquín, Fichas Técnicas por Sistema-Producto. México: INIFAP-SAGARPA.
- Ramírez Meraz, M., O. Pozo Campodonico y L. A. Rodríguez del Bosque. 2003. Tecnología para inducir la germinación del chile piquín. Paper presented at the Primer Simposio Regional de Chile Piquín: Avances de Investigación en Tecnología de Producción y Uso Racional del Recurso Silvestre, Campo Experimental Río Bravo.
- Rehman, S., J. C. Harris, and W. F. Bourne. 1998. Effects of presowing treatments with calcium salts, potassium salts, or germination and salt tolerance of *Acacia* seeds. *Journal of Plant Nutrition* (21): 277-285.
- Robledo, P. A. y C. G. Carrillo. 2004. Regeneración *in vitro* de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) mediante cultivo de cotiledones e hipocotilos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27(2): 121-126.
- Rodríguez-de-la-O, J. L. y J. García-Ruíz. 2008. Desinfección y selección de inóculo *in vitro* de *Abies religiosa*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14: 11-14.
- Rodríguez-del-Bosque, L. A. 2005. Preferencia del consumidor por el chile piquín en comparación con otros chiles en el noreste de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11(2): 279-281.
- Rodríguez del Bosque, L. A., M. Ramírez Meraz y O. Pozo Campodonico. 2004. Tecnología de Producción de Chile Piquín en el Noreste de México. INIFAP-CIRNE 29.
- Ronnie, D. 2003. *Handbook on Seedling Evaluation* (3rd ed.). The International Seed Testing Association. Switzerland. 119 p.
- Ruiz, T. N. A., M. R. Ramírez, S. F. Rincón, T. V. Robledo y G. C. Díaz. (2004). Osmocondicionamiento de semilla de chile ancho (*Capsicum annuum*). In U. A. A. Narro (Ed.), *Avances y Resultados de Proyectos de Investigación* (pp. 364-368).
- Ruzin, E. S. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press. New York, USA. 321 p.



- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México. 759 p.
- SIAP, S. (2013). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. from [www.siap.gob.mx/](http://www.siap.gob.mx/)
- Suzuki, H., S. Obayashi, and H. Luo. 1989. Effects of salt solutions on the priming of several vegetable seeds. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* (38): 131-138.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. Fifth edition. Sinauer Associates, Incorporated. 782 p.
- Vankus, V. 1997. The tetrazolium estimated viability test for seeds of native plants. In F. S. Department of Agriculture, Pacific Northwest Research Station (Ed.), *National Proceedings, Forest and Conservation Nursery Association*. Portland, USA.
- Willan, R. L. y FAO. (1991). Guía para la Manipulación de Semillas Forestales con Especial Referencia a los Trópicos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org/docrep/006/ad232s/ad232s00.htm>
- Wünschová, A., V. Benová, H. Vlasínová, and L. Havel. 2009. Dormancy of *Nicotiana benthamiana* seeds can be broken by different compounds. *Biologia Section Botany* 64(4): 705-710.
- Zavaleta, M. H. A., y M. E. Engleman. 1991. Anatomía de *Casimiroa edulis* (Rutaceae) zapote blanco, durante su desarrollo. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. (51): 53-65.