



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**PRODUCCIÓN DE SEMILLAS**

**Capacidad germinativa de  
semillas de *Taxus globosa*  
Schltdl.**

SUSANA ELIZABETH RAMIREZ SANCHEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

2012

La presente tesis titulada: **CAPACIDAD GERMINATIVA DE SEMILLAS DE *Taxus globosa* Schtdl.**, realizada por la alumna: Susana Elizabeth Ramírez Sánchez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

  
DR. GABINO GARCÍA DE LOS SANTOS

DIRECTOR DE:  
TESIS

  
DR. JAVIER LÓPEZ UPTON

ASESOR:

  
DR. JESUS VARGAS HERNÁNDEZ

ASESOR:

  
DR. OSCAR J. AYALA GARAY

ASESOR:

  
DRA. LUZ DEL CARMEN LAGUNES ESPINOZA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2012

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a CONACyT por el financiamiento brindado a este proyecto registrado con el número 2004-C01-29/A1, pues sin su apoyo, este proyecto no se hubiera realizado.

## AGRADECIMIENTO

Al Colegio de Postgraduados por permitirme formar parte de su comunidad estudiantil.

Al Dr. Gabino García de los Santos, por ser mi consejero estudiantil, por brindarme el apoyo académico necesario para llevar a cabo la investigación.

Al M en C. Adrián Livera por brindarme su asesoría de manera desinteresada y aportarme con sus conocimientos, una gran ayuda.

Al Dr. Oscar Ayala Garay, por ser un asesor muy crítico y objetivo, por brindarme sus conocimientos, tiempo y sobre todo por ser mi amigo!!!

A la Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza, por su asesoría en esta investigación, por su paciencia y comprensión.

Al Dr. Jesús J. Vargas Hernández, porque con su asesoría, comentarios y sugerencias, mucho de mi proyecto se aterrizó.

Al Dr. Javier López Upton por dirigir parte de esta investigación y aportar en ella, por acompañarme en las colectas y enseñarme mucho en campo.

Al Dr. Marcos Soto Hernández por su apoyo durante de esta investigación, así como al M. en C. Rubén San Miguel por sus observaciones y colaboración.

Al M. en C. Manuel Farfán por su apoyo durante una época difícil del Colegio de Postgraduados.

A mis compañeros Lupita, Juan Manuel Pichardo, Jorge, Juan (ex-laboratorista de semillas) Emmanuel (mi gran amigocho), Sandra por compartir este camino desde la licenciatura, Ceci y Jorge por la ayuda brindada en mis pre-doctorales, a Roberto Noguez por estar ahí cuando necesitaba unas palabras de aliento.

A todos los que en este momento escapan a mi memoria, gracias por compartir parte de mi camino en esta institución, por el apoyo brindado, la amistad y los ratos agradables o desagradables, a todos, gracias!

## DEDICATORIA

A mis padres José Ramírez Zamora y María del Carmen Sánchez Juárez, por inculcarme el amor al estudio y a la dedicación, por formarme como una persona de bien pero sobre todo por darme su amor y ayuda incondicional.

Muy en especial a mi Mami, porque con su copla “Camina siempre adelante y no te detengas por nada, no te permitas perderlo....” Siempre me tirabas de la cama!!!

A mis hijos José Alfredo, Aldo Ernesto, Neydi Betzabe y Carmen Guadalupe, por regalarme parte del tiempo que debo compartir con ellos, para concluir mis estudios. Por compartir mis alegrías y mis tristezas en el ámbito escolar. Por ser de los principales motores para que continúe avanzando, por su paciencia, comprensión y apoyo, los amo y siempre los llevo conmigo.

A Arturo el amor de mi vida, por tu apoyo incondicional, porque a pesar de todo y de todos, siempre estás ahí, reconfortándome y dándome ánimo para seguir adelante. Te amo!

A mi abue (†) por que con sus sabias palabras muchas veces me hacía entrar en razón, por sus cuentos por su amor y su paciencia, Gracias MAMI, porque sé, que sigues conmigo!!!

A Juanis por pertenecer a mi familia y perdonar mis impertinencias, pero sobre todo, por ser parte de nuestras vidas.

A Ariatna y Jorel, por que con sus vocecillas y cariños, me dieron energía para seguir, los amo.

Gracias a todos aquellos que alguna vez me dijeron que no se podía!!!

## CAPACIDAD GERMINATIVA DE SEMILLAS DE *Taxus globosa* Schtdl.

Susana Elizabeth Ramírez Sánchez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2012

*Taxus globosa* Schtdl. es una especie de importancia no solo por encontrarse en la NOM-059-ECOL-2010, sino, también por que produce un metabolito llamado taxol que es utilizado comercialmente para contrarrestar el cáncer. Actualmente, su obtención de esta especie es complicada, pues por encontrarse dentro de la norma, está prohibida su extracción; además su distribución en México es discontinua y su semilla presenta latencia, condición que dificulta mucho la propagación por medio de semilla; la germinación es escalonada y baja (2 al 14%). Es la única especie de este género en México y se considera endémica de nuestro país y de América central. Por lo que, en la presente investigación se buscó evaluar las diferencias morfológicas en las semillas de dos regiones del país, probar diferentes tratamientos pre-germinativos y determinar el tipo de latencia que presenta así como las causas que la originan. Se evaluaron caracteres morfológicos de la semilla como la testa, el megagametofito y el embrión. Esta caracterización física indicó que el embrión es más pequeño de lo reportado en ambas regiones, que la semilla de la región norte es 28 % más grande que la semilla de la región centro y que la testa no representa un impedimento para la imbibición. El tratamiento pre-germinativo que mayor porcentaje de germinación produjo, fue el de incubación (5 meses)-estratificación (2 meses) (14%), seguido por el de incubación (5 meses)-estratificación (2 meses)- aplicación de GA<sub>4/7</sub>(12%), y por último el de incubación (5 meses)-escarificación N-líquido y aplicación de GA<sub>4/7</sub> (10%). El análisis indicó que la latencia que presenta esta especie, es de tipo morfo-fisiológica y es ocasionada por un embrión pequeño y la posible presencia de inhibidores del crecimiento.

**Palabras clave:** *Taxus globosa*, germinación, tratamientos pre-germinativos, incubación, estratificación.



## GERMINATION OF SEEDS OF *Taxus globosa* SCHLTDL.

Susana Elizabeth Ramírez Sánchez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2012

*Taxus globosa* Schtdlt. is important not only for being in the NOM-059-ECOL-2010, but also because it produces a metabolite called taxol which is used commercially to counter cancer. Currently, obtaining this metabolite is complicated because it is regulated by the Mexican norm, and its removal is prohibited. Besides, its distribution in Mexico is irregular and the seed has dormancy, which makes their propagation by seed, complicated, since germination is staggered and low (2 to 14%). It is the only species of this genus in Mexico and is considered endemic in our country and Central America. The present study aimed to evaluate the morphological differences using seeds from two regions of the country, to evaluate pre-germination treatments, determine the type of dormancy that its possible causes. Morphological characters such as seed coat, the megagametophyte and embryo were evaluated. Physical characterization showed that the embryo is smaller than that reported in both regions, that the seed of the northern region is 28% larger than the seed of the central region, and the coat does not hinder the imbibition. The pre-germinative treatments with the highest percentage of germination were the incubation (5 months)-stratification (2 months) (14%) followed by the incubation (5 months)-stratification (2 months) - application of GA<sub>4</sub> / 7(12%), and finally incubation (5 months)-N-liquid scarification and application of GA 4/7(10%). The analysis indicated that the dormancy is morpho-physiological and caused by a small embryo and perhaps combined with the presence of growth inhibitors.

**Key words:** *Taxus globosa*, germination, pre-germination treatments, incubation, stratification.

# Contenido

|  |          |
|--|----------|
| RESUMEN .....  | I        |
| SUMMARY .....  | II       |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | iv       |
| INDICE DE CUADROS .....  | vii      |
| <b>Capítulo I .....</b>  | <b>1</b> |
| INTRODUCCION GENERAL .....   | 1        |
| 1.1.2 Objetivos particulares .....   | 5        |
| 1.1.3 Hipótesis .....  | 5        |
| <b>Capítulo II .....</b>   | <b>6</b> |
| REVISIÓN DE LITERATURA .....   | 6        |
| 2.1 FAMILIA TAXACEAE.....  | 7        |
| 2.1.1 Género <i>Taxus</i> .....  | 7        |
| 2.1.2 Descripción botánica y taxonómica de <i>Taxus globosa</i> .....              | 11       |
| 2.1.3 Descripción de las estructuras reproductivas de <i>Taxus globosa</i> Schtdl. | 12       |
| 2.1.4 Generalidades de <i>Taxus globosa</i> .....                                  | 13       |
| 2.2 SEMILLAS: DEFINICIÓN E IMPORTANCIA .....                                       | 15       |
| 2.2.1 Formación de la semilla .....  | 15       |
| 2.2.2 Germinación .....  | 18       |
| 2.3. LATENCIA EN SEMILLAS.....   | 21       |
| 2.3.1 Definiciones.....  | 21       |
| 2.3.2 Tipos de latencia .....  | 22       |
| 2.3.3 Rompimiento de latencia.....   | 25       |
| 2.3.4 Métodos químicos para romper latencia .....                                  | 28       |

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 2.4.1 Análisis de imágenes .....  | 38 |
| 2.4.2 Métodos radiográficos ..... | 40 |
| 2.5 LITERATURA CITADA .....       | 41 |

## **Capítulo III..... 52**

|   |    |
|---|----|
| VARIACIÓN MORFOLÓGICA DE SEMILLAS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> SCHLTDL., PROCEDENTES DE DOS REGIONES GEOGRÁFICAS DE MÉXICO ..... | 52 |
|---|----|

|               |    |
|---------------|----|
| RESUMEN ..... | 53 |
|---------------|----|

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 3.1 INTRODUCCIÓN..... | 54 |
|-----------------------|----|

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 56 |
|-------------------------------|----|

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 3.2.1 Recolección de semilla..... | 56 |
|-----------------------------------|----|

|   |    |
|---|----|
| 3.2.2 Descripción morfológica externa de la semilla completa..... | 57 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| 3.2.3 Descripción de estructuras internas de la semilla ..... | 58 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| 3.2.4 Caracterización física de la semilla ..... | 59 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| 3.2.5 Evaluación de características físicas de la testa ..... | 60 |
|---|----|

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 3.2.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 60 |
|-----------------------------------|----|

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... | 61 |
|----------------------------------|----|

|   |    |
|---|----|
| 3.3.1 Descripción morfológica externa de la semilla completa..... | 61 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| 3.3.2. Descripción de la morfología interna de la semilla ..... | 63 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| 3.3.3 DESCRIPCIÓN DE ESTRUCTURAS INTERNAS DE LA SEMILLA..... | 65 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| 3.3.4 Caracterización física de la semilla ..... | 66 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| 3.3.5 Características físicas de la testa..... | 68 |
|--|----|

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 3.4 CONCLUSIONES..... | 72 |
|-----------------------|----|

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 3.5 LITERATURA CITADA ..... | 73 |
|-----------------------------|----|

## **Capítulo IV ..... 78**

|  |    |
|--|----|
| LATENCIA EN SEMILLAS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> SCHLTDL. DE DOS REGIONES DE MÉXICO..... | 78 |
|--|----|

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 4.1 INTRODUCCIÓN..... | 79 |
|-----------------------|----|

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 81 |
|-------------------------------|----|

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 4.2.1 Material vegetal..... | 81 |
|-----------------------------|----|

|   |            |
|---|------------|
| 4.2.2 Viabilidad.....   | 82         |
| 4.2.3 Tratamientos pre-germinativos.....                                      | 83         |
| 4.2.4 Prueba de germinación .....   | 84         |
| 4.2.5 Crecimiento embrionario .....   | 85         |
| 4.2.6 Cultivo In vitro de embriones .....                                     | 85         |
| 4.2.7 Análisis estadístico.....   | 86         |
| 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 87         |
| 4.3.1 Viabilidad, tratamientos pre-germinativos y prueba de germinación ..... | 87         |
| 4.3.2 Crecimiento embrionario .....   | 94         |
| 4.3.3 Cultivo in vitro de embriones .....                                     | 96         |
| 4.3.4 Implicaciones.....  | 97         |
| 4.4 CONCLUSIONES.....   | 100        |
| 4.5 LITERATURA CITADA .....   | 101        |
| <b>Capítulo V .....</b>   | <b>106</b> |
| 5.1 DISCUSIÓN GENERAL.....  | 107        |
| 5.2 CONCLUSIONES GENERALES .....  | 112        |
| 5.3 LITERATURA CITADA .....   | 113        |

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2. 1 Ciclo biológico de angiospermas.(Tomado de <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/3er/Vegetales/6666/Espermatofitas.html>) ..... 16
- Figura 2. 2 Ciclo biológico de gimnospermas (Pino) (Tomado de <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/3er/Vegetales/6666/Espermatofitas.html>)..... 17
- Figura 2. 3 Duración de la imbibición y algunos eventos importantes asociados con la germinación y el crecimiento de la plántula. (Traducido de Bewley, 1997). 20
- Figura 2.4. Corte longitudinal de una semilla de testa dura (Poulsen y Stubsgaard, 1995). ..... 26
- Figura 2.5. Balance entre giberelinas y ABA en semillas. (Koornneef *et al.*, 1985, citado en Holdsworth *et al.*, 2001,)..... 31
- Figura 2.6. Formas libres de giberelinas y su precursor (Avila, 2003).GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub> son giberelinas activas ..... 32
- Figura 2.7. Ruta de biosíntesis del Ácido giberélico (GAs). Las enzimas que catalizan las distintas reacciones están señaladas en negrita, y los compartimentos subcelulares donde tienen lugar las reacciones se muestran a la izquierda de la figura. *ent*-copalil fosfato sintasa, CPS; *ent*-kaurenosintasa, KS; *ent*-kaureno oxidasa, KAO; GA 13-oxidasa, GA13ox; GA 20-oxidasa, GA20ox; GA 3-oxidasa, GA3ox; GA 2-oxidasa, GA2ox. (Olszewski *et al.*, 2002)..... 33
- Figura 2.8. Mecanismo molecular de la acción de las GAs en arroz. (A) En presencia de bajas concentraciones de GAs, la proteína SLR1, probablemente formando un complejo con factores de transcripción dependientes de GAs, mantiene

reprimida la expresión de los genes de respuesta a GAs. (B) En presencia de concentraciones elevadas de GAs, GA se une directamente al receptor *GID1*, y el complejo *GID1-GA* interacciona con *SLR1*. El complejo *SCFGID2* es reclutado para *SLR1*, y ser degradado en el proteasoma. La degradación de *SLR1* elimina la represión de los genes de respuesta a GAs. Factores de transcripción dependientes de GA, GA-TF; modificación desconocida, +mod; membrana nuclear, MN; homólogo 1 de Cullin en *Oryza sativa*, *OsCUL1*; homólogo 15 de ASK1 en *Oryza sativa*, *OsSKP15*; ubiquitinación, +ub. (Bishopp *et al.*, 2006.) ..... 35

Figura 2.9. Ácido abscísico (S)-5-(1-hidroxi-2,6,6-trimetil-4-oxo-1-ciclohexil)-3-metil-cis, trans-penta-2,4-dienoico (Bradford, 2004)..... 36

Figura 2.10. Ruta molecular del ABA y la Giberelina (Bishopp *et al.*, 2006). ..... 38

Figura 3. 1 Ubicación geográfica de los sitios de recolección de la semilla de *Taxus globosa* Schltdl. .... 58

Figura 3.2. Semilla completa de *T. globosa* (con arilo) de la región centro (ac) y región norte (an). Semilla de *T. globosa* sin arilo, de la región centro (bc) y norte (bn). ..... 62

Figura 3. 3. Corte longitudinal de semilla (A) de *Taxus globosa* Schltdl. procesada con cloruro de tetrazolio; T = testa, M = micrópilo; Meg = megagametofito; Cav = cavidad embrionaria; E = embrión; (B) Embrión disectado y teñido con cloruro de tetrazolio; S = suspensor; EE = eje embrionario; C = cotiledones. .... 66

Figura 3. 4. Curva de imbibición de semillas de *Taxus globosa* Schltdl. procedentes de dos regiones geográficas de México. .... 70

Figura 4. 1 Sitios de recolección de la semilla de *Taxus globosa* Schltdl..... 82

Figura 4. 2 Porcentaje de germinación en semillas de *T. globosa* Schltdl. procedente de la zona norte de México. Barras verticales, representan el error estándar (ES). Diferentes letras indican diferencias ( $p \leq 0.05$ )..... 89

Figura 4. 3 . Semillas de *Taxus globosa* sometidos a tratamientos pregerminativos, mostrando embriones al final de la investigación. Imágenes tomadas mediante rayos X con Faxitron X-Ray V.30 proporcionado por el CONAFOR-Jalapa, Ver. .... 95

Figura 4. 4 Longitud promedio de los embriones. .... 95

## INDICE DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 2. 1 Clasificación de los árboles de <i>Taxus</i> , según Krüssmann (1983) (En Taylor y Francis, 2003).Modificado con información de Spjut,2010 .....   | 9  |
| Cuadro 2.2. Características de semillas con latencia fisiológica profunda, intermedia y no profunda (Baskin y Baskin, 2004).....   | 24 |
| Cuadro 3. 1 Ubicación de las poblaciones de <i>Taxus globosa</i> Schltl. muestreadas.  | 57 |
| Cuadro 3. 2 Comparación de medias (T de Student) de las variables de morfología externa en la semilla de dos regiones de <i>Taxus globosa</i> Schltl. de México.   | 63 |
| Cuadro 3. 3 Comparación de medias (t de Student) de las variables de morfología interna en semillas de dos regiones de <i>T. globosa</i> Schltl. de México.....  | 65 |
| Cuadro 3. 4 Caracteres físicos de la semilla de <i>Taxus globosa</i> Schltl. procedente de dos regiones geográficas de México. ....  | 67 |
| Cuadro 3. 5. Tratamiento de escarificación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> en semillas de <i>Taxus globosa</i> Schltl. procedentes de dos regiones de México. ....  | 69 |
| Cuadro 4. 1 Comparación de medias del Índice de velocidad de germinación (IVG) en semillas de <i>Taxus globosa</i> Schltl. sometidas a diferentes tratamientos pre-germinativos. ....  | 91 |
| Cuadro 4. 2 Porcentaje de germinación en embriones cultivados <i>in vitro</i> de <i>Taxus globosa</i> Schltl. estratificados., estratificados sin lixiviar (Est/sL) y lixivados sin estratificar<br>estratificar con lixivado<br>(sEst/L)..... | 96 |



# **Capítulo I**

## **INTRODUCCION GENERAL**

## CAPITULO I

*Taxus globosa*, determinada por primera vez en 1838 por Diederich Franz Leonhard von Schlechtendal (Schltdl.), es la única especie perteneciente al género *Taxus* que se encuentra en México, distribuida principalmente en la parte norte de la Sierra Madre Oriental (Nuevo León y Tamaulipas) y esporádicamente en poblaciones de pocos individuos en San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Veracruz, así como en la Sierra de Juárez de Oaxaca y la Meseta Central de Chiapas en México; además, en la Sierra de Minas, la Sierra de Cuchumatanes y la cadena Volcánica en Guatemala, en el sur de El Salvador y en las Cordilleras de Celaque y Tilarán en Honduras (Zamudio, 1992). Esta conífera, conocida comúnmente como romerillo, granadillo o tejo, se distribuye sólo en barrancas muy húmedas y de manera preferencial en el bosque templado (Contreras y Luna, 2001).

*Taxus globosa* es una especie dioica, de lento crecimiento y porte pequeño, usualmente de 4-6 m, rara vez hasta 11 m de altura (Zavala, 2001; Shemluck *et al.*, 2003). Su regeneración natural se basa en las semillas (Zavala, 2001), las que producen de manera escasa por árbol. La Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) la ubica en la lista de especies que requieren “protección especial”. Su predominio en áreas muy remotas, bajo otros árboles como dosel protector, y cercano a arroyos la hacen muy susceptible al aprovechamiento forestal de sus especies asociadas y la falta de humedad. Además, el tejo se aprovecha en algunas localidades por su madera dura, e incluso su follaje con fines ornamentales.

*Taxus globosa* produce una sustancia conocida como “taxol”, que tiene aplicaciones médicas en distintos tipos de cáncer, como el uterino, el ovárico, el de mama, pulmón y cerebro (Ikou *et al.*, 2002); en el tratamiento de Alzheimer (Adlard *et*

## CAPITULO I

*al.*, 2000), en enfermedades del corazón y a nivel de medicina herbolaria tiene aplicaciones como en la gonorrea, reumatismo y como agente antiviral (Barquero, 2007; Nimachow y Rawat, 2011).

El aprovechamiento comercial de la especie y las estrategias de conservación requieren la propagación masiva ya sea por medios vegetativos o sexuales. El enraizamiento de estacas en esta especie se ha realizado con éxito (Muñoz *et al.*, 2009); sin embargo, para mantener variabilidad genética es necesario reproducir el *Taxus* por semilla. No obstante, la semilla es difícil de germinar y se ha reportado en otras especies de *Taxus* que al momento de su dispersión natural, el embrión es pequeño, de 1 o 2 mm y no ha alcanzado su pleno desarrollo, por lo que es considerado un proembrión (Anderson y Owens, 2001; Vance y Rudolf, 2008). Se han probado varios tratamientos pre-germinativos con un éxito relativo (Zavala *et al.*, 2001; Nicholson y Munn, 2003); estos últimos lograron resultados de germinación limitados en poblaciones de Nuevo León. Las poblaciones de *Taxus globosa* en el norte de México son de tamaño mucho mayor que las del centro y sur de México, que tienen tamaños poblacionales menores a 200 árboles maduros (Soto-Hernández *et al.*, 2011), por lo que es de esperarse problemas de endogamia en estas últimas.

En otras coníferas mexicanas con amplia distribución natural se han determinado amplias diferencias en la morfología y en valores germinativos entre poblaciones y/o regiones, lo que puede deberse a la discontinuidad geográfica de su distribución (Reyes *et al.*, 2005; Mápula *et al.*, 2007), que provoca aislamiento entre localidades y diferenciación por selección (Wright, 1968). Por lo tanto, se

## CAPITULO I

esperaría que estas características variaran en *Taxus globosa*, dado el gran aislamiento que existe entre sus poblaciones, y que las más pequeñas, como es el caso de las del centro del país, son más propensas a la endogamia, factores que en otras especies repercuten en un menor tamaño de las semillas y en una reducida capacidad germinativa (Mápula *et al.*, 2007).

Con base en la importancia antropocéntrica de esta especie y las características tan particulares de su propagación y distribución, así como la falta de información básica de *T. globosa*, en esta investigación se tuvo como objetivo estudiar la morfología de la semilla y el comportamiento de su propagación sexual a fin de contribuir a su conservación y posible desarrollo comercial.

# CAPITULO I

## 1.1 Objetivo general

- Estudiar el fenómeno de la latencia de la semilla de *Taxus globosa*.

### 1.1.2 Objetivos particulares

- Estudiar y comparar morfológicamente la semilla de *Taxus globosa* Schlttdl. procedente de diferentes regiones geográficas
- Determinar los diferentes tipos de latencia que se presentan en la semilla de *Taxus globosa* y evaluar diferentes tratamientos pre-germinativos para superarlos.

### 1.1.3 Hipótesis

- Las semillas de *Taxus globosa* de las poblaciones del centro del país difieren en características morfométricas a las semillas de las poblaciones del norte del país.
- La latencia de la semilla de *Taxus globosa* no solo se debe a la inmadurez del embrión sino también a la presencia de inhibidores.

# **Capítulo II**

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

## CAPITULO II

### 2.1 Familia Taxaceae

La familia Taxaceae es la única familia comprendida dentro del orden Taxales; entre sus integrantes encontramos al género *Taxus*, con 24 especies y 55 variedades (Spjut, 2007)

En la familia Taxaceae encontramos árboles y arbustos ramosos, caracterizados por la casi ausencia de resina en sus estructuras. Son gimnospermas de hoja perenne que se encuentran ampliamente distribuidas en el hemisferio norte. Crecen sobre todo en el sotobosque de los hábitats húmedos, desde el bosque templado hasta los climas subtropicales (Price, 1990); son tolerantes a la sombra.

#### 2.1.1 Género *Taxus*

Krüssmann (1983) presenta una clasificación de las especies de *Taxus*, que posteriormente Spjut (2010) amplía (Cuadro 2.1). Género ampliamente distribuido en el Hemisferio Norte; en Europa, en el Norte de África, Asia y América; en España se le puede ver prácticamente en todas las cordilleras. En América en este último continente desde Canadá, Estados Unidos y México. En nuestro país se encuentra desde la parte central de Nuevo León y Tamaulipas, pasando por la cuenca del Golfo y el Eje Neovolcánico Transversal, hasta Chiapas. En Centroamérica se observa hasta el sur de Honduras (Zavala *et al.*, 2001).

## CAPITULO II

### Descripción morfológica del Género *Taxus*

Son especies dioicas; árboles o arbustos de 3 a 9 m. raramente alcanzan los 25 m. de alto, corteza escamosa, café rojiza o café oscura; brácteas o ramillas irregulares, erectas o espadiformes (con forma de espada) de color verde amarillento o verde olivo, hojas pectinadas y persisten hasta 4 años, sus flores son pequeñas y solitarias, se encuentran en la parte axilar de las yemas, Las yemas femeninas dan origen a solo un óvulo alrededor de la bráctea que al madurar y ser fecundado da origen a la semilla. Las yemas masculinas se agrupan a lo largo de áreas cercanas a las brácteas y posteriormente dan origen a los sacos polínicos, el fruto es carnoso y es llamado arilo, éste envuelve y protege a la única semilla (Cope, 1998). El tronco principal del árbol de tejo puede llegar a ser bastante fuerte en proporción a su altura. A menudo, el gran diámetro se obtiene por tallos múltiples que se han fusionado con el tiempo. El tejo inglés ha alcanzado una edad aproximada de 1000 años, especialmente los instalados en los cementerios del país (Lewington y Parker, 1999).

### Importancia del Género *Taxus*

La importancia económica que tienen las especies del género *Taxus* en todo el mundo es debido a que es una planta productora de un metabolito (paclitaxel o taxol), útil en tratamiento contra el cáncer. Actualmente dicho metabolito se extrae de manera comercial de *T. baccata*, *T. brevifolia* y *T. canadensis*, sin embargo en la especie mexicana no se realiza aprovechamiento de esta sustancia. *Taxus globosa* se ha



## CAPITULO II

tratado de reproducir sin lograr el éxito necesario para la extracción del taxol y su comercialización (Ramos-Lobato *et al.*, 2003;).

Cuadro 2. 1 Clasificación de los árboles de *Taxus*, según Krüssmann (1983) (En Taylor y Francis, 2003).Modificado con información de Spjut, 2010.

| Nombre común                          | Clasificación Krüssmann y Spjut   |
|---------------------------------------|---|
| <b>Tejo europeo (European yew)</b>    | <i>T. baccata</i> L.<br><br>var. <i>dovastoniana</i> Leighton<br>var. <i>elegantissima</i> Hort. ex C. Lawson<br>var. <i>glauca</i> Jacques ex Carriere,<br>var. <i>pyramidalis</i> Hort. ex C. Lawson,<br>var. <i>variegata</i> Watson<br><i>T. fastigiata</i> Lindl.<br><i>T. recurvata</i> Hort. ex C. Lawson,<br><i>T. biternata</i> Spjut. |
| <b>Tejo Himalayan (Himalayan yew)</b> | <i>T. wallichiana</i> Zucc.†<br>var. <i>yunnanensis</i> (W.C. Cheng & L.K. Fu)<br>C.<br>T. Kuan.<br>T. contorta Griff.*<br>var. <b>Mucronata</b> Spjut.*<br>T. fuana Nan Li & R.R.Mill*   |

## CAPITULO II

Continuación...

| Nombre común                           | cación Krüssmann y Spjut   |
|--|--|
| <b>Tejo Chino (Chinese yew)</b>        | <i>T. celebica</i> (Warb.) H.L. Li, <i>T. chinensis</i> (Pilg.) Rehder.<br><i>var. chinensis</i><br><i>var. mairei</i><br><i>T. mairei</i> (Lemee & H. Lev.) S.Y. Hu ex T.S. Liu,<br><i>var. speciosa</i> (Florin) Spju★<br><i>T. sumatrana</i> (Miq.) de Laub.  |
| <b>Tejo Japones (Japanese yew)</b>     | <i>T. cuspidata</i> Siebold & Zucc.<br><i>T. caespitosa</i> Nakai<br><i>var. latifolia</i> (Pilg.) Spjut★<br><i>var. angustifolia</i> Spjut*<br><i>T. umbraculifera</i> (Siebold ex Endl.) C.Lawson,<br><i>var. hicksii</i> (Hort. ex Rehder) Spjut★<br><i>var. microcarpa</i> (Trautv.) Spjut★<br><i>var. nana</i> (Rehder) Spjut.★ |
| <b>Tejo del Pacífico (Pacific yew)</b> | <i>T. brevifolia</i> Nutt. <i>var. reptaneta</i> Spjut<br><i>var. polychaeta</i> Spjut*  |
| <b>Tejo Mexicano (Mexican yew)</b>     | <i>T. globosa</i> Schlechtd.<br><i>T. globosa var. floridana</i> (Nutt. ex Chapm.) Spjut,  |

## CAPITULO II

Continuación...

| <b>Nombre común</b>                          | <b>Clasificación Krüssmann y Spjut</b>   |
|--|--|
| <b>Tejo de Florida (Florida yew)</b>         | <i>T. floridana</i> Nutt.  |
| <b>Tejo Canadiense (Canadian yew)</b>        | <i>T. canadensis</i> Marsh. <i>T. canadensis</i> var. <i>adpressa</i> (Carriere) Spjut,<br><br><i>T. canadensis</i> var. <i>minor</i> (Michx.) Spjut,  |
| <b>Nuevas especies</b>                       |  |
| <b>China, Rusia, Nor y Sur Korea y Japón</b> | <i>T. biternata</i> Spjut<br><br><i>T. florinii</i> Spjut <sup>†</sup><br><i>T. kingstonii</i> Spjut<br><i>T. obscura</i> Spjut,<br><br><i>T. phytonii</i> Spjut<br><i>T. suffnessii</i> Spjut |

★Nuevas combinaciones \*sinonimias\* nuevas variedades, <sup>†</sup> Sinonimos

### 2.1.2 Descripción botánica y taxonómica de *Taxus globosa*

*Taxus globosa* Schlechtendal es la única especie perteneciente al género *Taxus* que se encuentra en México (Zavala, 2001; Spjut, 2007).

## CAPITULO II

Clasificación taxonómica (IBUNAM, 2010):

Dominio: Eukarya

Reino: Plantae

Grupo: Gimnosperma

Clase: Pinopsida

Orden: Pinales

Familia: Taxaceae

Género: *Taxus*

Especie: *globosa*

Sinonimias: *Taxus baccata* subsp. *globosa* Schltldl.

### 2.1.3 Descripción de las estructuras reproductivas de *Taxus globosa* Schltldl.

Estróbilos masculinos axilares, ubicados en la parte inferior de las ramas, solitarios o rara vez en espigas compactas de 2 a 4, con un pedúnculo corto, con 4 a 5 brácteas membranosas en la base del estróbilo, imbricadas, amarillentas; estróbilos formados por 7 a 14 conjuntos de sacos polínicos con filamentos cortos, que surgen en el ápice del pedúnculo; microsporófilas peltadas con 4-7 sacos polínicos, los cuales presentan dehiscencia longitudinal y tejido conectivo uniendo los sacos (Contreras y Luna, 2001; Spujt, 2007). Óvulos solitarios (no asociados en estróbilos), ubicados en las axilas de las hojas, dispuestos en la parte posterior de las ramas, rodeados por

## CAPITULO II

varias brácteas membranosas, verdes, con el margen escarioso; semillas sin ala, ovoides, de 5 a 7 mm de largo por 4 mm de ancho, de color café, con el ápice apiculado (termina en punta), cubiertas parcialmente por un arilo carnoso de color rojo (Zamudio, 1992). El arilo facilita la dispersión de las semillas por las aves y es la única parte que carece del alcaloide venenoso taxina o taxol, que es de acción paralizante y anticoagulante (Thomas y Powart, 2003).

### 2.1.4 Generalidades de *Taxus globosa*

La especie fue descrita por Schlechtendal en 1938, como ya se mencionó, y es extremadamente rara en cultivo (Soto *et al.*, 2000). Se encuentra incluida en el listado de bajo protección especial en peligro de extinción en México (Diario oficial, 2002).

De manera general existen pocas investigaciones sobre la especie; se han localizado algunos artículos en ecología (Zavala, 2001; Zavala-Chavez 2002), en contenido de taxol (Soto *et al.*, 2000), propagación (Nicholson y Munn, 2003; Muñoz *et al.*, 2009), y distribución (Contreras y Luna, 2001; García-Aranda *et al.*, 2011a; García-Aranda *et al.*, 2011b; Zavala-Chavez, 2002; Shemlukc *et al.*, 2003).

Habita de manera escasa bajo doseles de bosques mixtos de coníferas, generalmente en cañadas o laderas con exposición húmeda a elevaciones desde 1300 hasta 2600 m. (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2011); también se le encuentra esporádicamente en bosques mesófilos de montaña. Dichas condiciones la vuelven

## CAPITULO II

una especie rara o de distribución discontinua y restringida. Además, es tolerante a la sombra, ya que habita bajo el dosel de árboles de mayor porte y no parece prosperar y poder competir adecuadamente sin sombra. Es una especie longeva y de lento crecimiento, se le ubica en comunidades de bosques mixtos de coníferas al norte y más al sur en bosques de Pinus y Abies (Zamudio, 1992; Zavala, 2001; Zavala-Chavez, 2002; Shemluck *et al.* 2003).

## CAPITULO II

### 2.2 Semillas: Definición e importancia

La semilla es un óvulo fecundado, que dará origen a una nueva planta (Fahn, 1978). Douglas (1982) la define como un óvulo maduro, que consta de una planta embrionaria, una fuente de alimento almacenado y una testa o cubierta protectora.

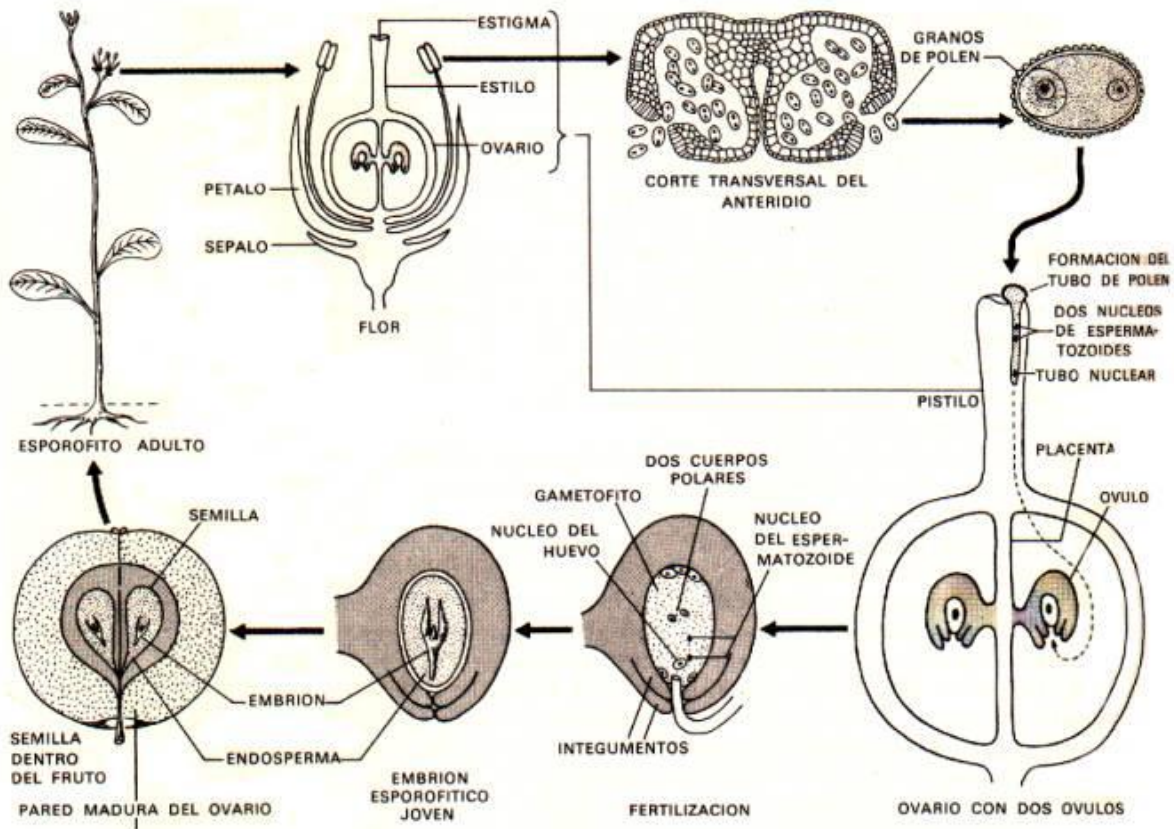
Su importancia biológica radica en que las semillas contienen los recursos genéticos recombinados, además de que en muchos casos están adaptadas para la dispersión, por lo que de ellas depende tanto la repoblación, el desplazamiento dentro de la misma comunidad, como la expansión a nuevos territorios u otros hábitats (Espinosa-Osornio y Engelman, 1998).

#### 2.2.1 Formación de la semilla

La formación de la semilla inicia al ocurrir la fecundación o unión de los gametos masculino (polen) y femenino (óvulo); esta singamia ocurre cuando los gametos están completamente maduros y en angiospermas ocurre una doble fusión, que es conocida como doble fertilización, no es así en gimnospermas, en donde sólo se da una fecundación. En las angiospermas, cuando el grano de polen llega al estigma, éste germina y emite un tubo polínico que crece a través del estigma y hasta el micrópilo;, por este tubo se conducen tres células, el núcleo del tubo y dos células espermáticas, la primera degenera, las otras dos entran al saco embrionario; una se fusiona con dos núcleos polares formando un endospermo triploide ( $3n$ ) y la otra se fusiona con la

## CAPITULO II

célula huevo, formando un cigoto diploide ( $2n$ ) (Figura 2.1) (Copeland y McDonald, 2001).



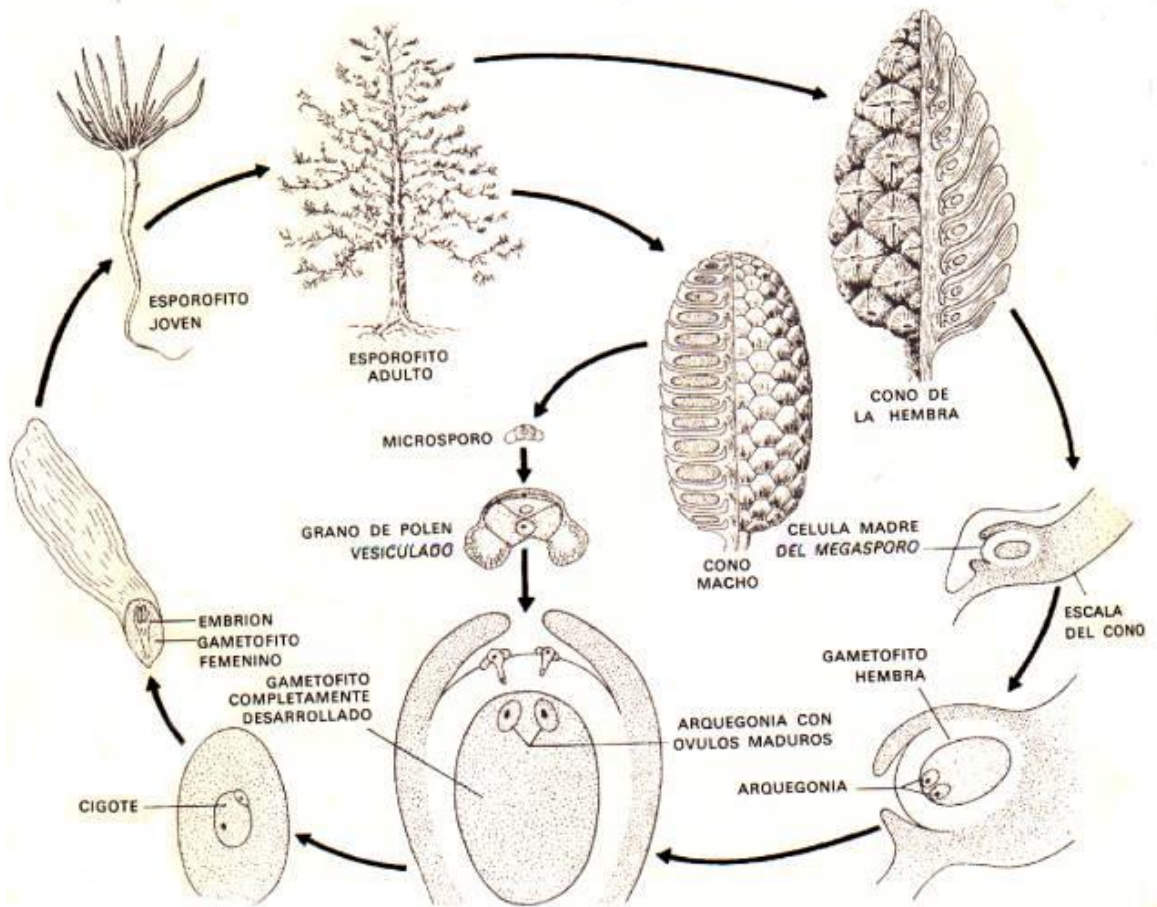
**Figura 2. 1 Ciclo biológico de angiospermas. (Tomado de <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/3er/Vegetales/6666/Espermatofitas.html>)**

En las gimnospermas, el endospermo se forma a partir del tejido del propio saco embrionario. La nucela o megasporangio es el tejido que forma la mayor parte del óvulo y es digerido en parte durante el desarrollo de los tejidos del embrión y el endospermo. La semilla está rodeada por una capa dura y resistente derivada del integumento del óvulo, llamada testa. En las plantas con flores se forma una segunda envoltura por el interior de la testa llamada tegmen. Además, algunas semillas forman proyecciones de la testa que favorecen la absorción de agua en el momento de la germinación o que



## CAPITULO II

actúan como protección suplementaria. En casi todas las semillas, el micrópilo a través del cual había penetrado el tubo polínico en el óvulo, persiste en forma de orificio diminuto de la testa. En las plantas con flores, un peciolo o funículo une la semilla a la placenta por el interior de la pared del fruto. Al retirar la semilla queda una pequeña cicatriz o hilo que señala el punto de inserción del funículo (Figura 2.2) (Taiz y Ziger, 2006).



**Figura 2. 2 Ciclo biológico de gimnospermas (Pino)** (Tomado de <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/3er/Vegetales/6666/Espermatofitas.html>)

Después de la fertilización el óvulo forma la semilla, la cual contiene al embrión embebido en el tejido de reserva, que es llamado endospermo en las angiospermas y

## CAPITULO II

megagametofito en el caso de gimnospermas (Taiz y Zieger, 2006).

### 2.2.2 Germinación

La germinación puede ser definida como la emergencia del embrión de la semilla, determinada por una variedad de actividades anabólicas y catabólicas, incluyendo respiración, síntesis de ADN, proteínas y movilización de reservas después de la absorción de agua. La presencia de oxígeno es necesaria para permitir la respiración aeróbica mientras exista una temperatura adecuada que favorezca los distintos procesos metabólicos (Desai *et al.*, 1997). Durante la imbibición de la semilla madura ocurre una reactivación de los sistemas metabólicos existentes, complementados por la síntesis de nuevos componentes que reanudan la expansión de las células (alargamiento de radícula) y la división celular. El desarrollo de la semilla y la germinación son dos fases fisiológicas distintas del ciclo de vida de una planta; sin embargo, ambas están relacionados con las reservas nutritivas. El desarrollo de la semilla es esencialmente anabólico, se caracteriza por la síntesis y acumulación de reservas en los tejidos de almacenamiento. En la germinación, en cambio, las reservas previamente acumuladas son hidrolizadas para sostener el crecimiento inicial de la plántula, mediante la actividad de enzimas catabólicas (Kobayashi *et al.*, 2003).

Botánicamente, la germinación empieza cuando la semilla seca empieza a absorber agua y se completa cuando el embrión se alarga y la radícula es empujada a través de la testa o cubierta de la semilla. La imbibición o la entrada de agua es un fenómeno

## CAPITULO II

estrictamente físico. La emergencia de la plántula es causada por el crecimiento del embrión, soportado por las reservas almacenadas en las semillas tales como los triacilgliceroles, que son lípidos de almacenamiento en semillas de muchos tipos de plantas, los cuales proporcionan energía y actúan como precursores biosintéticos durante la germinación (Bradford y Bewley, 2003). Después de la imbibición, el metabolismo se reanuda rápidamente, inicialmente usando enzimas y reservas sintetizadas durante el desarrollo y conservados en la semilla seca. Pronto nuevos genes son transcritos, y se elaboran enzimas y nuevos componentes celulares (Bradford y Bewley, 2003). La respiración durante la germinación usa la sacarosa almacenada y una serie de compuestos que contienen galactosa llamados los oligosacáridos serie rafinosa (Bradford y Bewley, 2003).

Desde el punto de vista fisiológico y bioquímico, la germinación se resume en las siguientes fases:

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

## CAPITULO II

Desde que se inicia el proceso de germinación hasta que se termina, ocurren tres fases (Figura 2.3): fase I: imbibición; fase II: síntesis y reparación de ADN; y fase III: post-germinación (Bewley, 1997).

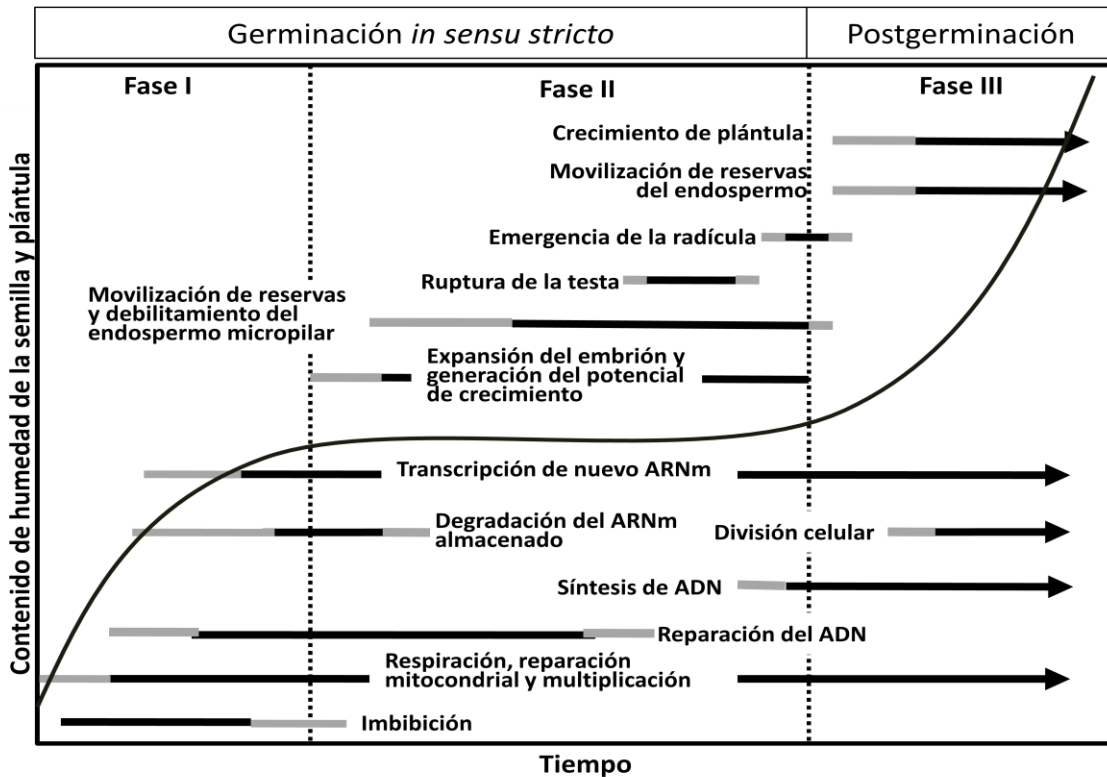


Figura 2. 3 Duración de la imbibición y algunos eventos importantes asociados con la germinación y el crecimiento de la plántula. (Traducido de Bewley, 1997).

Sin embargo, existen condiciones que limitan o retrasan la germinación y se conoce como latencia; las semillas con latencia pueden imbibirse, llegan a la fase II de imbibición, pero permanecen ahí hasta que la latencia es superada.

## CAPITULO II

### 2.3. Latencia en semillas

#### 2.3.1 Definiciones

-Es la incapacidad para germinar en un momento específico bajo la combinación de algunos factores ambientales (temperatura, luz/oscuridad, humedad y condiciones de aireación (intercambio gaseoso) que en otros casos son favorables para su germinación (Figuroa *et al.*, 1996).

-Audesirk *et al.* (2008) denominan estado latente o latencia al fenómeno por el cual una semilla viable no germina, aun cuando se le coloca en un sustrato húmedo, aireado y a una temperatura adecuada para que ocurran los procesos metabólicos que conducen a la germinación.

-Willan (2000) cita que el término “latencia” se refiere a la condición de una semilla viable que impide que ésta germine en presencia de los factores que normalmente se consideran suficientes para la germinación: temperatura y humedad adecuada.

-Baskin y Baskin (2004) indican que una semilla latente o “dormante” es aquella que no tiene la capacidad de germinar bajo ninguna combinación de factores físicos ambientales como la temperatura, luz/oscuridad, aun cuando estos sean favorables para la germinación.

Todos concuerdan en que es una supresión de la germinación a pesar de tener las condiciones necesarias para que ésta ocurra.

## CAPITULO II

### 2.3.2 Tipos de latencia

Diversos autores plantean distintas clasificaciones de latencia, sin embargo, se debe mencionar que la clasificación más amplia es la de Hartmann y Kester (1988), en la que se clasifica a la latencia causada por la cubierta de las semillas como **exógena**, y **endógena** a la causada por factores internos como la inmadurez o tamaño del embrión, al efecto químico de sustancias producidas internamente por el mismo embrión o contenidas en la semilla. Para este escrito se tomará la clasificación de Baskin y Baskin (2004) (Cuadro 2.2) en el que se propone la clasificación como sistema jerárquico de cinco tipos de latencia: la fisiológica (PD), morfológica (MD), morfofisiológica (MPD), física (PY) y la combinación (PY+PD), y a pesar de que no existe una traducción para el término “dormancy”, se utilizará el término latencia como sinónimo de “dormancy”.

**-Latencia Fisiológica (PD):** Es la latencia más común y se presenta en semillas de gimnospermas y angiospermas; se refiere a la inhibición de la germinación por medio de algún proceso metabólico interno y ésta se divide en latencia fisiológica profunda, intermedia y no profunda. Las semillas con latencia fisiológica, no germinan, o pueden producir plántulas anormales; también se les ha tratado con giberelinas (GA) sin obtener respuesta positiva, ya que requiere de incubación o/y estratificación para germinar, debido a que los mecanismos fisiológicos implicados provocan la detención de crecimiento del embrión, que es generalmente acompañado por la presencia de ABA (Baskin y Baskin, 2004).

Existe un modelo de control remoto que indica que el ácido absísico (ABA) es

## CAPITULO II

producido por el embrión, que induce la latencia durante el desarrollo de la semilla y el GA promueve la germinación en semillas no latentes; sin embargo, la cantidad de GA requerida para la germinación de semillas maduras es controlada por la concentración del ABA durante el desarrollo de las mismas. De acuerdo con este modelo, el ABA y el GA no interaccionan directamente (Baskin y Baskin 2004; Le Page-Degivry, 1977).

**-Latencia Morfológica (MD):** En ella es muy común encontrar embriones no desarrollados (en términos de tamaño), pero bien diferenciados (con cotiledones e hipocótilo radicular). Estos embriones no son latentes fisiológicamente, simplemente necesitan de un tiempo para crecer y germinar.

**-Latencia morfo-fisiológica (MPD):** En ésta, también son comunes los embriones no desarrollados pero en adición, tienen un componente fisiológico, ya que requieren de un tratamiento para romper la latencia, por ejemplo, la combinación de estratificación fría y cálida; en algunos casos la latencia se puede romper con la adición de GA (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

**-Latencia Física (PY):** Es causada por la impermeabilidad al agua, debida a células en empalizada en la cubierta de la semilla que controlan la entrada del agua, pero se puede romper con escarificación mecánica o química (Baskin y Baskin, 1998; Baskin, 2003; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

**-Latencia combinada (PY+PD):** En este caso, se combina la impermeabilidad de la testa al agua con latencia fisiológica del embrión (Baskin y Baskin 2004).

## CAPITULO II

Cuadro 2.2. Características de semillas con latencia fisiológica profunda, intermedia y no profunda (Baskin y Baskin, 2004).

| Niveles de Latencia fisiológica   | Características de la latencia en semillas con diferentes niveles de latencia   |
|---|---|
| “Deep Physiological Dormancy”<br>(Latencia fisiológica profunda)          | Embriones extraídos producen plántulas anormales.<br>El GA no promueve germinación.<br>Las semillas requieren entre tres y cuatro meses de estratificación fría para germinar.  |
| Intermediate Physiological Dormancy”<br>(Latencia fisiológica intermedia) | Embriones extraídos producen plántulas normales.<br>El GA promueve germinación en algunas especies.<br>Las semillas requieren entre dos y tres meses de estratificación fría para romper la latencia.<br>El almacenamiento en seco puede acortar el periodo de estratificación  |
| “Nondeep Physiological Dormancy”<br>(Latencia fisiológica no profunda)    | Embriones extraídos producen plántulas normales.<br>El GA promueve germinación.<br>Dependiendo de las especies, la estratificación fría (0-10°C) o la cálida ( $\geq 15^{\circ}\text{C}$ ) rompe la latencia.<br>Las semillas pueden madurar después en almacenamiento en seco. |



## CAPITULO II

### 2.3.3 Rompimiento de latencia

Los tratamientos pregerminativos son todos aquellos métodos necesarios para romper la latencia de las semillas, como se mencionan a continuación.

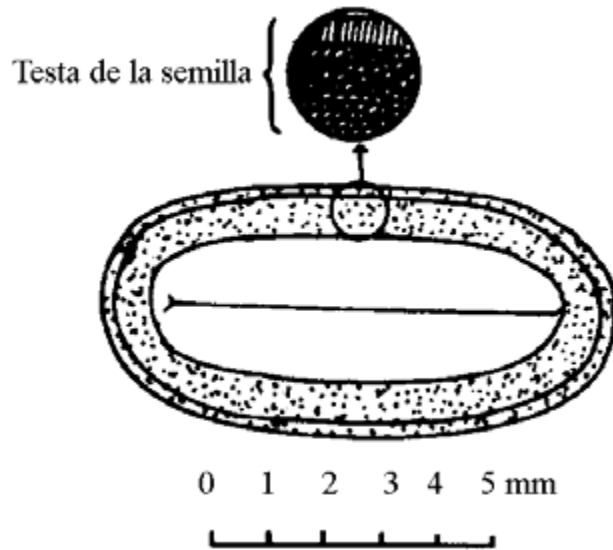
#### **i) Estratificación:**

Procedimiento que se utiliza para romper la latencia fisiológica, que consiste en colocar las semillas entre estratos húmedos, comúnmente arena, turba o vermiculita, en frío o calor. La estratificación en frío es aquella donde se mantienen las semillas a temperaturas bajas (3 a 10 °C), asemejando a las condiciones de invierno, por un período que oscila entre 20 y 60 días, llegando inclusive hasta 120 días.

#### **ii) Escarificación**

Un gran número de especies forestales no germinan debido a que la testa o cubierta seminal es dura e impide la entrada de agua (latencia física, Figura 2.4), y la semilla no germina al menos que ésta sea escarificada. Así, la escarificación es cualquier proceso que rompa, raye, altere mecánicamente o ablande las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases.

## CAPITULO II



**Figura 2.4. Corte longitudinal de una semilla de testa dura (Poulsen y Stubsgaard, 1995).**

La escarificación se subdivide en dos:

### **a) Mecánica:**

Consiste en raspar la cubierta de las semillas con lijas, limas o quebrarlas con un martillo o pinzas. Si es a gran escala, normalmente se utilizan maquinas especiales como tambores giratorios recubiertos en su interior con papel lija, o combinados con arena gruesa o grava. En el caso de grandes cantidades de semillas, se puede utilizar una hormigonera con grava o arena en su interior, o bien un tambor forrado en su interior con material abrasivo (por ejemplo lija).

## CAPITULO II

### b) Química:

La escarificación química consiste en remojar las semillas por períodos breves (5 minutos a 2 horas), en compuestos químicos. Durante el período de tratamiento las semillas deben agitarse regularmente con el fin de obtener resultados uniformes. El tiempo de tratamiento varía según la especie. Al final del tratamiento se escurre el compuesto químico y las semillas se lavan con abundante agua para eliminar el resto. Por ejemplo, las semillas secas se colocan en recipientes no metálicos y se cubren con ácido sulfúrico concentrado en proporción de una parte de semilla por dos de ácido por un tiempo específico dependiendo de la especie, por ejemplo para *Leucaena* se ha aplicado  $H_2SO_4$  al 5% por 10 minutos con buen resultado (Razz y Clavero, 1996). También el uso de hormonas es recomendable dependiendo de la especie y las más utilizadas son las giberelinas.

### iii) Lixiviación:

Las semillas son remojadas en agua corriente con la finalidad de remover los inhibidores químicos presentes en la cubierta. Este tratamiento también es empleado con el objetivo de ablandar la testa. El tiempo de remojo puede ser de 12, 24, 48 y hasta 72 h, y en algunos casos, cambiándoles el agua con cierta frecuencia (Hartmann y Kester, 1988; Sánchez *et al.*, 2001). Por ejemplo, en semillas de *Acacia magnium* Willd., se ha comprobado que la germinación aumenta progresivamente hasta un 5 %,

## CAPITULO II

cuando las semillas se sumergen en agua a 30°C y hasta un 91 %, cuando se sumergen en agua a 100°C (Schelin *et al.*, 2004).

### 2.3.4 Métodos químicos para romper latencia

#### 2.3.4.1 Fitorreguladores u hormonas vegetales

El crecimiento y desarrollo de las plantas está regulado por un equilibrio entre las hormonas **estimulantes** del crecimiento (auxinas, giberelinas y citocininas) y las hormonas **inhibidoras** del crecimiento (ácido abscísico y jasmonatos; Cuadro 2.3) y otras como el etileno, aunque no se revisará en este apartado. La importancia de las hormonas en el desarrollo y crecimiento de las plantas se fundamenta en que éstas participan prácticamente en la regulación de todos los procesos del ciclo vital, desde la germinación de las semillas hasta su maduración en el interior del fruto. Pero la comprensión de sus mecanismos de acción es compleja, dado que a menudo una sola hormona puede afectar muchas respuestas no relacionadas aparentemente, y a la vez un mismo proceso puede estar regulado por diversas hormonas (White *et al.*, 2000).

## CAPITULO II

**Cuadro 2. 3. Fitohormonas implicadas en la germinación de semillas (Bewley y Black, 1994, Bishopp *et al.*, 2006, Bradford y Bewley, 2003).**

| Hormona      | Qué son?   | Biosíntesis   | Acciones   | Transporte  |
|--------------|--|---|--|---|
| Auxina       | Son derivados indólicos relacionados con el ácido indolacético (AIA). Sin embargo existen algunos compuestos fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos con actividad auxínica.   | En meristemos apicales de tallos y raíces, hojas jóvenes y frutos en desarrollo. También en hojas maduras y ápices de raíces, aunque en menor proporción.                   | Elongación, Tropismos, División y diferenciación celular Dominancia apical Disminuye senescencia y la maduración de frutos. Aumenta la síntesis de etileno.  | Basipétalo, Acropétalo.<br><br>No hay transporte transversal.   |
| Giberelina   | Son ácidos carboxílicos diterpenoides tetracíclicos, se las denomina ácidos giberélicos  | En órganos reproductores (flores, semillas inmaduras, embriones germinando) En tejidos vegetativos (ápices, tallos, raíces, y hojas jóvenes)                                | Aumenta crecimiento (su déficit produce plantas enanas). Aumenta elongación. Rompe la latencia. Papel primordial en germinación. Revierte planta adulta en juvenil. Floración Partenocarpia Reduce desarrollo de fruto, y maduración. Vernalización.   | Las giberelinas se encuentran en el floema (también pueden pasar al xilema). El transporte es en todas las direcciones. |
| Citoquininas | Derivan de la adenina o de aminopurinas. Las diferentes cadenas laterales se unen al nitrógeno. Pueden presentarse como: bases libres (que constituyen las formas activas de las citoquininas), o bien ribonucleósidos, ribonucleótidos y glicósidos (que se activan por conversión a la forma de base libre); | Tiene lugar principalmente en el citosol de las células de meristemas apicales de raíz, y también en embriones jóvenes de maíz y hojas jóvenes en crecimiento y desarrollo. | Aumentan la división y diferenciación celular. Rompen el letargo (dormición). Retardan el envejecimiento. Antisenescentes (pueden incluso anular el efecto de las hormonas senescentes). Regulan la síntesis de pigmentos fotosintéticos en los cloroplastos. Mantienen la síntesis de proteínas. Floración y diferenciación de la flor. | Se sintetizan en el ápice de la raíz y en las hojas.<br>Se encuentran en el xilema y el floema.                         |

## CAPITULO II

Cuadro 2.3. Continuación...

| Hormona               | Qué son?  | Biosíntesis   | Acciones  | Transporte   |
|-----------------------|---|---|---|--|
| Ácido abscísico (ABA) | Es un sesquiterpenoide (15 átomos de C) con un anillo de 6 C.   | Se localiza principalmente en los plástidos (70% en cloroplastos) y 10 % en citosol de todos los órganos.   | Menor crecimiento (con excepciones) y elongación. Mayor abscisión de órganos. Mayor envejecimiento. Respuesta gravitrópica. Mayor latencia = menor germinación. Anula el efecto de las giberelinas. Induce cierre estomático  | Se puede transportar de célula a célula por el floema. |
| Jasmonatos            | Derivan del ácido linolénico (un ácido graso no saturado) liberado desde los fosfolípidos de membrana por acción de lipasas. Poseen un anillo de ciclopentanona sustituido en C2 y C3. Los metiljasmonatos son altamente volátiles. | Presentes en toda la planta, con mayor actividad en tejidos en crecimiento como ápices de tallos, hojas jóvenes, frutos inmaduros y extremos de raíces. | Inhiben la elongación de las raíces, la germinación y crecimiento de semillas. Inhiben la germinación de semillas de avena y lechuga. La formación de yemas florales y la biosíntesis de carotenoides. Promueven la formación de raíces adventicias. Promueven la biosíntesis del etileno. Promueven la elongación de la caña de azúcar. Promueven la senescencia y abscisión de hojas. Promueven el cierre de estomas en condiciones de estrés. Promueven la degradación de la clorofila | Vía floema   |

Actualmente, se acepta que la acción de las hormonas sobre cada proceso no ocurre por una vía independiente, sino que la síntesis de algunas hormonas está modulada por otras y la señalización incluye a menudo elementos compartidos

## CAPITULO II

(Gazzarini y McCourt, 2003). De hecho, se propone que las interacciones no guardan un orden jerárquico, sino que serían más similares a una tela de araña en la que las líneas y nodos representarían las distintas hormonas y su efecto inductor o represor sobre otros genes o procesos. La oscilación global de esta red es más importante que la función de cada nodo individual, dado que todos los nodos trabajan en conjunto para dar la oscilación correcta (Gazzarini y McCourt, 2003).

Un ejemplo clásico de interacción entre hormonas es el efecto antagónico del ácido abscísico (ABA) y las GAs sobre la germinación de las semillas (Figura 2.5, Koornneef *et al.*, 1985), pero con el paso del tiempo se han descubierto muchas más interacciones, tanto a nivel de síntesis (las auxinas inducen la síntesis de GAs en diversas especies, y también ayudan a mantener los niveles de brasinoesteroides (BRs) en *Arabidopsis*), como de señalización (mutantes de señalización por etileno tienen sensibilidad alterada a citoquininas (CKs) o ABA, según el gen mutado) (Holdsworth *et al.*, 2001).



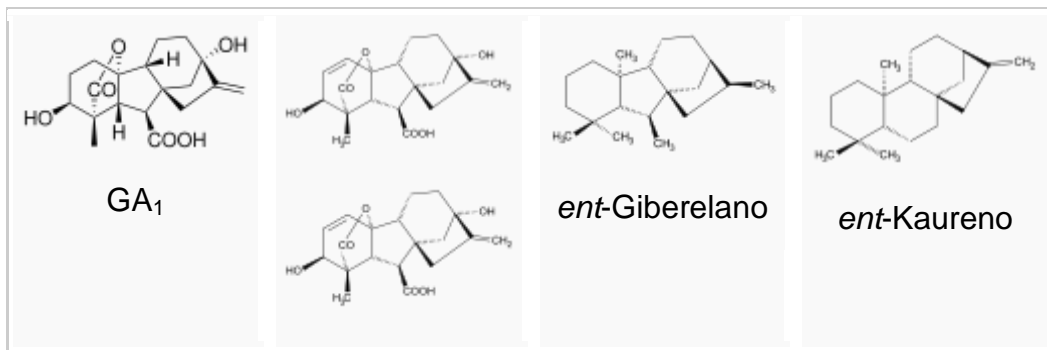
**Figura 2.5. Balance entre giberelinas y ABA en semillas. (Koornneef *et al.*, 1985, citado en Holdsworth *et al.*, 2001,).**

## CAPITULO II

### 2.3.4.2 Giberelinas

Las giberelinas son diterpenoides, ácidos derivados del hidrocarburo heterocíclico *ent*-Kaureno. Existen dos tipos de formas libres (Figura 2.6): las que tienen 20 Carbonos (C) (inactivas) y las de 19 C (originadas por la pérdida de 1 C en determinada posición). Para que sean activas deben cumplir dos condiciones: tener 19 C y tener una hidroxilación en la posición 3. Se pensaba que las giberelinas de 20 C tenían actividad, pero no por sí mismas, ya que tienen que degradarse e hidroxilarse en el C3 (Silva *et al.*, 2001).

Formas conjugadas: Típicamente se forman conjugados con glúcidos, de modo que no tienen actividad.



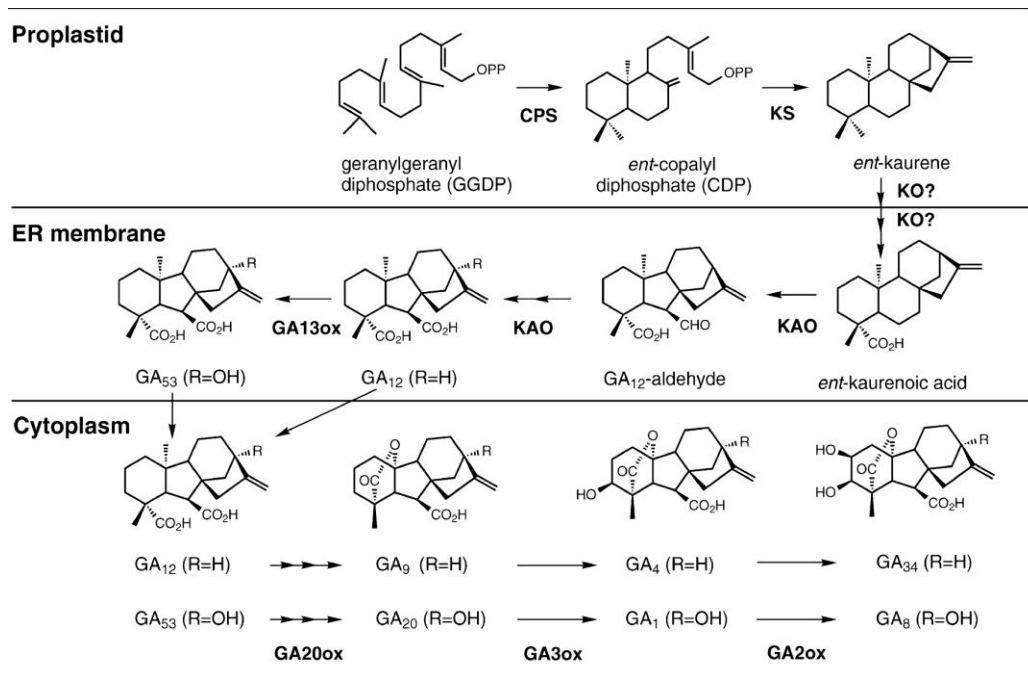
**Figura 2.6. Formas libres de giberelinas y su precursor (Avila, 2003).GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub> son giberelinas activas**

Las giberelinas (GA) tomaron su nombre del hongo de donde fueron extraídas originalmente (*Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. (1931)). En el reino vegetal se ha



## CAPITULO II

establecido que existen aproximadamente 120 diferentes tipos de giberelinas, las cuales se fueron numerando a medida que se fueron descubriendo. Las diferencias entre ellas consisten en ligeros cambios en el número de carbonos o grupos oxidrilos. En las plantas se han identificado cerca de 65 giberelinas, mientras que 12 están exclusivamente en el hongo *Gibberella*; en semillas de manzano se han encontrado 24 distintas giberelinas (Figura 2.7). En condiciones de estrés para la planta, algunas giberelinas se asocian con azúcares y con ello pierden efectividad. De las distintas giberelinas, la GA<sub>3</sub> ha sido la más estudiada por su alta efectividad y presencia en los tejidos vegetales; sin embargo, la GA<sub>1</sub> es reconocida como la más activa de todas. A la GA<sub>3</sub> se le conoce como Ácido Giberélico (Hasan, 2002).



**Figura 2.7. Ruta de biosíntesis del Ácido giberélico (GAs).** Las enzimas que catalizan las distintas reacciones están señaladas en **negrita**, y los compartimentos subcelulares donde tienen lugar las reacciones se muestran a la izquierda de la figura. *ent*-copalil fosfato sintasa, **CPS**; *ent*-kaurenosintasa, **KS**; *ent*-kaureno oxidasa, **KAO**; GA 13-oxidasa, **GA13ox**; GA 20-oxidasa, **GA20ox**; GA 3-oxidasa, **GA3ox**; GA 2-oxidasa, **GA2ox**. (Olszewski *et al.*, 2002).

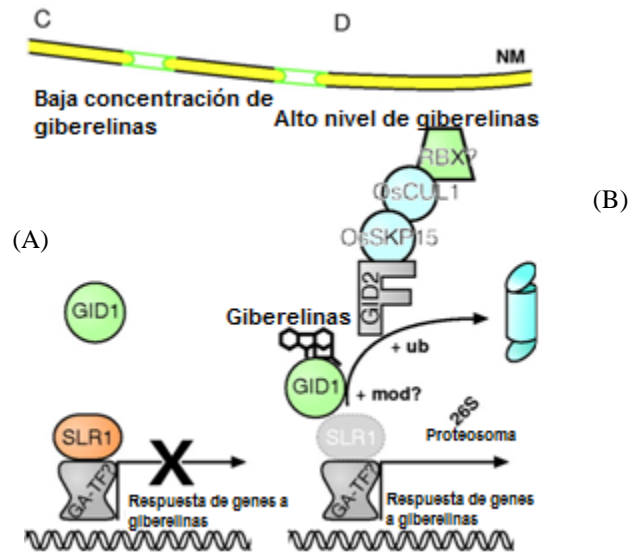
## CAPITULO II

El metabolismo de las GAs se conoce con más detalle que el de auxinas, ya que se han identificado las enzimas que catalizan todos los pasos de la ruta de síntesis, así como los responsables de los primeros pasos del catabolismo (Olszewski *et al.*, 2002). La biosíntesis se puede dividir en tres fases: 1) la biosíntesis de *ent*-kaureno en los proplastidios; 2) la conversión de *ent*-kaureno a GA<sub>12</sub> mediante citocromo P450 monooxigenasas microsomales, y 3) la formación de GAs de 20 y 19 átomos de carbono (C20 y C19) en el citoplasma (Olszewski *et al.*, 2002). Se han identificado numerosas GAs en plantas superiores, hongos y bacterias, pero sólo unas pocas son biológicamente activas (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>) (Olszewski *et al.*, 2002). Las demás son mayoritariamente intermediarias de la ruta o productos del catabolismo.

La Figura 2.7 describe la ruta de biosíntesis que conduce a la formación de GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>. Los últimos pasos de la ruta de biosíntesis son los más importantes a nivel de regulación, y consisten en oxidaciones sucesivas, catalizadas por las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato GA20-oxidasas (GA20ox) y GA 3-oxidasas (GA3ox), y dan lugar a GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>. Las GA 2-oxidasas (GA2ox) catalizan la 2β-hidroxilación que convierte a estas GAs en las formas inactivas GA<sub>34</sub> y GA<sub>8</sub>. La cantidad de GAs bioactivas se puede modular regulando la velocidad de su síntesis y de su degradación. Este balance, además, está regulado por mecanismos de retroalimentación negativa y positiva: la expresión de las GA20-ox y GA3-ox es regulada negativamente por GAs, mientras que la expresión de las GA2-ox es inducida por GAs (Olszewski *et al.*, 2002). En *Arabidopsis*, las GA 20-oxidasas están codificadas por al menos 5 genes (figura 2.8) (AtGA20-ox1 a AtGA20-ox5); las GA 3-oxidasas están codificadas por al menos cuatro

## CAPITULO II

genes (AtGA3-ox1 a AtGA3-ox4), y las GA 2-oxidasas están codificadas por al menos siete genes (AtGA2-ox1 a AtGA2-ox8, AtGA2-ox5 es un pseudogén) (Hedden y Phillips, 2002, Schomburg *et al.*, 2003).

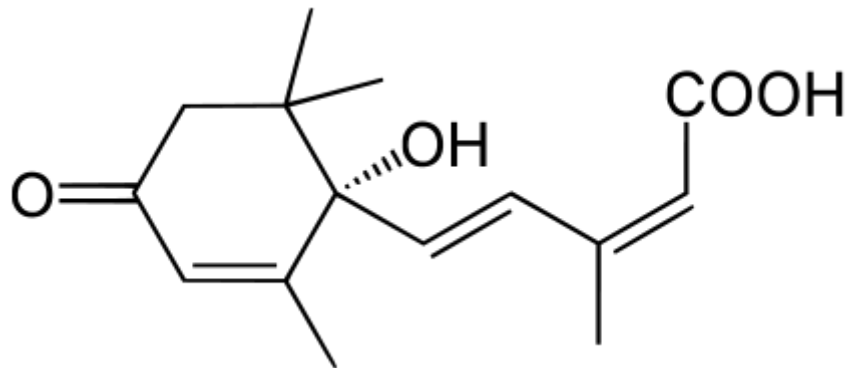


**Figura 2.8. Mecanismo molecular de la acción de las GAs en arroz. (A)** En presencia de bajas concentraciones de GAs, la proteína SLR1, probablemente formando un complejo con factores de transcripción dependientes de GAs, mantiene reprimida la expresión de los genes de respuesta a GAs. **(B)** En presencia de concentraciones elevadas de GAs, GA se une directamente al receptor GID1, y el complejo GID1-GA interactúa con SLR1. El complejo SCFGID2 es reclutado para SLR1, y es degradado en el proteosoma. La degradación de SLR1 elimina la represión de los genes de respuesta a GAs. Factores de transcripción dependientes de GA, GA-TF; modificación desconocida, +mod; membrana nuclear, MN; homólogo 1 de Cullin en *Oryza sativa*, OsCUL1; homólogo 15 de ASK1 en *Oryza sativa*, OsSKP15; ubiquitinación, +ub. (Bishopp *et al.*, 2006.)

## CAPITULO II

### 2.3.4.3 El ácido abscísico (ABA)

El ácido abscísico (Figura 2.9) es un inhibidor, cuyo precursor es el isopentenildifosfato. Este derivado carotenoide tiene dos isómeros *cis* y *trans*, interconvertibles entre ellos en la planta; y dos enantiómeros R-S que no son interconvertibles (Bradford, 2004). La funcionalidad de esta hormona recae sobre la cadena lateral de cinco carbonos. Se sintetiza en los plastidios, fundamentalmente en los cloroplastos. Un aumento en la concentración de esta hormona en la hoja como respuesta a un estrés hídrico causa el cierre de estomas, disminuye la transpiración, inhibe el crecimiento de la planta y el desarrollo de las semillas y los frutos (Bradford, 2004).



**Figura 2.9. Ácido absícico (S)-5-(1-hidroxi-2,6,6-trimetil-4-oxo-1-ciclohexil)-3-metil-cis, trans-penta-2,4-dienoico (Bradford, 2004).**

Hay un momento en el desarrollo embrionario en el que cesa la división celular y las células empiezan a crecer y a acumular sustancias de reserva. Este momento coincide con un incremento en el contenido de ABA de la semilla. Hay evidencias que sugieren

## CAPITULO II

que el ABA está involucrado en la detención del ciclo celular, ya que es capaz de inducir la expresión de un inhibidor de quinasa dependiente de ciclinas, el ICK1 (*Simpson et al., 2004*).

El embrión en esta etapa de la embriogénesis se hace tolerante a la desecación, en parte por la síntesis de proteínas LEA, y pierde hasta el 80% de su contenido en agua. Aunque el ABA tiene un papel fundamental en la regulación de la latencia, hay otros factores que participan en su control, como las proteínas ABI1, ABI2, ABI3 y ERA1 como se ha estudiado en *Arabidopsis* (*Simpson et al., 2004*).

Mediante análisis genéticos se ha demostrado que son importantes para la expresión génica específica de la semilla ABI3/VP1, ABI4, ABI5, LEC1, LEC2 y FUS3 (McCarty *et al.*, 1991; Giraudat *et al.*, 1992). Algunos de ellos regulan la respuesta a ABA (ABI3/VP1, ABI4 y ABI5) y otros regulan principalmente la transición de la embriogénesis a la germinación (LEC1, LEC2, FUS3), aunque esta distinción no es clara porque ABI3/VP1 reprime también la germinación (Holdsworth *et al.*, 2001). Se han descrito interacciones genéticas entre los mutantes *abi3/vp1*, *abi4* y *abi5*, lo que sugiere que estos 3 factores de transcripción pueden controlar la expresión génica específica de semilla o inducible por ABA mediante la formación de un complejo (Finkelstein y Lynch, 2000).

## CAPITULO II

La ruta siguiente se ha dilucidado en algunos estudios (Fig. 2.10).

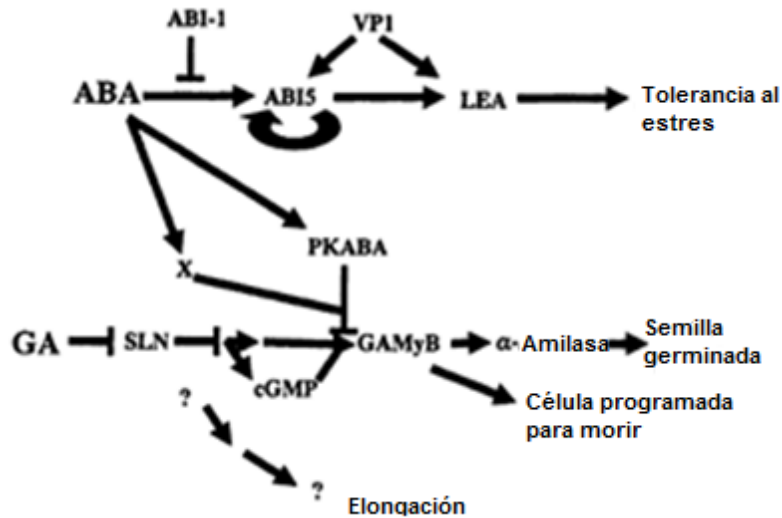


Figura 2.10. Ruta molecular del ABA y la Giberelina (Bishopp *et al.*, 2006).

### 2.4 Métodos de análisis morfológicos

Para estudiar la morfología del embrión se han utilizado métodos destructivos como la disección de semilla y su observación al microscopio, sin embargo el avance de la tecnología ha permitido implementar otros métodos no destructivos como el análisis de imágenes o las radiografías.

#### 2.4.1 Análisis de imágenes

Este análisis permite recoger datos de manera automática a partir de imágenes y realizando la cuantificación de algunas de sus variables (Kruse, 2000). La aplicación requiere de un computador, una cámara o escáner (McDonald *et al.*, 2001) y un

## CAPITULO II

procesador digital de imágenes. Dicho análisis se puede usar con distintos fines, uno de ellos es la identificación de objetos, pues después del procesamiento, las imágenes son transformadas a lenguaje alfa numérico. Los datos generan información cuantitativa de elementos básicos que diferencian y dan significado a cada variable (Verdugo *et al.*, 2007).

En experiencias con vegetales se ha determinado una alta correlación entre los datos obtenidos del análisis de imágenes con las mediciones manuales (Sako *et al.*, 2001). Otras aplicaciones en semillas particularmente de cereales son la inspección y clasificación (Sapirstein *et al.*, 1987). También se ha descrito como método complementario a la microscopía en semillas pequeñas llamadas semillas polvo (Glasbey y Horgan, 1995; Verdugo *et al.*, 2007). También se aplica en la evaluación de la efectividad en tratamientos sanitarios sobre testas, la estimación de calidad, dimensiones y evaluación de daños, y la separación e identificación de semillas de diferentes especies (Kruse, 2000), discriminación de variedades (Dehghan-Shoar *et al.*, 1998), madurez y caracterización de atributos físicos mediante métodos no destructivos (Illipronti *et al.*, 1997).

Las variables frecuentemente evaluadas en la descripción morfológica de semillas mediante análisis de imágenes se centran en aspectos biométricos como la longitud, el área y el ancho (Illipronti *et al.*, 1997; Dehghan-Shoar *et al.*, 1998), la forma (Sahoo *et al.*, 2000) y peculiaridades morfológicas (Dehghan-Shoar *et al.*, 1998). Hay informes de mediciones específicas en testas como estudio del color, textura (Sahoo *et al.*, 2000; Leyva *et al.*, 2002) y aspectos tridimensionales o de caracterización (García y Estrada,

## CAPITULO II

1999). Esta técnica puede ser aplicada para la identificación de diferentes especies de semillas considerando las características morfológicas propias de cada una (Sako *et al.*, 2001).

### 2.4.2 Métodos radiográficos

Otra técnica utilizada para conocer el estado físico de las semillas es la de rayos X. Hace más de 70 años que se utilizaron por vez primera las radiografías para determinar la calidad de las semillas (Lundstrom, 1903; Kamra, 1964; Willan, 1991). El estudio de Simak y Gustafson (1953) destacó la importancia de la técnica de rayos X como método de diagnóstico en el análisis de las semillas arbóreas. En las pruebas de rayos X se utilizan diversos agentes de contraste o radiopacos que se han aplicado con éxito a especies de *Pinus* y *Picea* (Simak, 1957; Kamra, 1963a, b; Willan, 1991).

El método de rayos X permite detectar las semillas vacías y las estructuras seminales que presentan daño mecánico, un desarrollo interno anormal, medición del grosor de la cubierta y la evaluación de la viabilidad de la semilla cuando se combina con un agente de contraste. Por lo tanto, se puede relacionar ésta con la capacidad de germinar, además de que ayuda a determinar el estado de desarrollo del embrión, la presencia de insectos, y la detección de poliembrionía (Willan, 1991). La radiografía es un método de análisis no destructivo que puede ser utilizado en semillas con un alto valor. La dosis de radiación varía con la especie, pero es relativamente baja (alrededor de 2 rads), por lo que su efecto sobre la semilla y la planta que se originará de ella es prácticamente nulo y no causa daños mecánicos, fisiológicos o genéticos (Kamra, 1964).



## CAPITULO II

### 2.5 LITERATURA CITADA

**Adlard PA, CE King and J C Vickers (2000)** The effects of taxol on the central nervous system response to physical injury. *Acta Neuropathology* 100:183–188.

**Anderson ED and JN Owens (2001)** Embryo development, megagametophyte storage product accumulation, and seed efficiency in *Taxus brevifolia*. *Can. J. For. Res.* 31:1046–1056.

**Audesirk T., G. Audesirk y B.E. Byers. (2008)** *Biología: La vida en la tierra*. Pearson Educación de México. 924 p.

**Avila A, XA (2003)** Regulación por retroalimentación de la biosíntesis de giberelinas en semillas de *Zea mays* L. Tesis de Licenciatura. UAM-Xochimilco. Departamento de Ciencias de la Salud-Biología. México, D.F. 210 p.

**Barquero A (2007)** Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Revista Química Viva* 6(2):19-35.

**Baskin C (2003)** Breaking physical dormancy in seeds – focussing on the lens. *New Phytologist* 158: 227–238

**Baskin CC and JM Baskin (1998)** *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. San Diego, Academic Press. 666 p.

**Baskin JM and CC Baskin (2004)** A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.

**Bewley JD. (1997)** Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9:1055-1066.

**Bewley JD and M Black (1994).** *Seeds Physiology Germination*. 2<sup>a</sup> ed. Plenum Press. New York. 445 p.

## CAPITULO II

- Bishopp A, MA Pekka and Y Helariutta (2006).** Sings of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development*.133:1857-1869.
- Bradford JK (2004)** Seed Production and Quality. Department of Vegetable Crops.University of California.USA. 134 p.
- Bradford KJ and JD Bewley (2003)** Seeds: Biology, Technology and Role *In* Agriculture. In Chrispeels M. J. and D.E. Sadava (eds.). *Plants, Genes and Crop Biotechnology*.Second Edition.Jones and Bartlett Publishers.Boston. USA. Pp: 212-239.
- Contreras M, R y I Luna V (2001)** Presencia de *Taxus globosa* Schlecht. (Taxaceae) en el estado de Chiapas, México. *Polibotánica* 12: 51-55.
- Cope, E.A. (1998)** Taxaceae: The Genera and Cultivated Species. *The Botanical Review* 64:291-322.
- Copeland LO and MB McDonald (2001).** Principles of Seed Science and Technology.Fourth ed. Kluwer Academic Publishers. London. 467 p.
- Dehghan-Shoar M, J G Hampton and S J Haslett (1998)** Identification and discrimination among, Lucerne (*Medicago sativa* L.) varieties using seed image analysis. *Plant Varieties and Seeds*11:107-127.
- Desai B B, P M Kotecha and D K Salunkhe (1997)** Seed Handbook: Biology, Production, Processing and Storage. Marcel Denker. New York. 626 p.
- Diario Oficial (2002)** Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001.Segunda Sección. Protección ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna

## CAPITULO II

silvestres -Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio -Lista de especie en riesgo. Marzo. México, D.F. 85 p.

**Douglas J E (1982)** Programa de semillas: guía de planeación y manejo. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali. Colombia. 333 p.

**Espinosa-Osornio H y M Engleman (1998)** Breve recopilación de anatomía de semillas. Colegio de Postgraduados.100p.

**Fahn A (1978)** Anatomía Vegetal. H. Blume Ediciones, Madrid, España.228 p.

**Figuroa J J, J Armesto y J F Hernández. (1996)** Estrategias de germinación y latencia de semillas en especies del bosque templado de Chiloé, Chile. Revista Chilena de Historia Natural 69:243-251.

**Finch-Savage W. E. y G. Leubner-Metzger. (2006)** Seed dormancy and the control of germination.New Phytologist.171(3):501-523

**Finkelstein R and T Lynch (2000).** The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. PlantCell 12: 599-609.

**García-Aranda M A, E Estrada-Castillón, E Jurado-Ybarra E y U D González-Uribe (2011a)** Análisis de once poblaciones naturales de *Taxus globosa* en la Sierra Madre Oriental. Revista Madera y Bosque.17:1. 93-104 pp.

**García-Aranda M A, E Estrada-Castillón, C Cantú-Ayala y M Pando-Moreno (2011b)** Clasificación de nueve sitios de bosque mixto de coníferas con presencia de *Taxus globosa* en la Sierra Madre Oriental, Nuevo León y Tamaulipas, México. Botanical Sciences 90:53-62

**García de los Santos G y A J Estrada G (1999)** Caracterización de frijol de la

## CAPITULO II

variedad Bayomex mediante descriptores agronómicos y análisis de imágenes de morfología de semillas. Rev. Fitotec. Mex. 22: 63-74

**Gazzarini S and P McCourt (2003)** Cross-talk in plant hormone signalling: what arabidopsis mutants are telling us. Annals of Botany 91:605-612.

**Giraudat J, B Hauge, C Valon, J Smalle, F Parcy and H Goodman (1992)** Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. Plant Cell 4: 1251-1261.

**Glasbey C A y G W Horgan (1995)** Image Analysis for the Biological Sciences. John Wiley & Sons, England. 218 p.

**Hartmann H y D Kester (1988)** Propagación de Plantas. México D.F. Compañía Editorial Continental, 760 p.

**Hasan H A H (2002)** Gibberellin and auxin production by plant root- fungus and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. Rostlinná Výroba (3):101-106.

**Hedden P and Al Phillips (2000)** Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. Trends Plant Sci, 5:523-530.

**Holdsworth M, J Lenton, J Flintham, M Gale, S Kurup, R Mckibbin, P Bailey, V Larner and L Russel (2001)** Genetic control mechanisms regulating the initiation of germination. J. Plant Physiol. 158: 439-445.

**IBUNAM. Instituto de Biología. 2010. *Taxus globosa* Schtdl. IBUNAM:MEXU:OAX813637. UNIBIO: Colecciones Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2011-11-28 Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX813637>**

**Ikuo K, T Tomonori, T Hirokazu, K Fumihiko, F Kazuhiro, Y Masayuki, Y Tokiharui, Y Gan and K Ryoho (2002)** A case of effective paclitaxel therapy for adriamycin

## CAPITULO II

resistant metastatic breast cancer with brain metastases. *Cancer and Chemotherapy* 29(4):585-8 pp.

**Illipronti Jr R A, C J Langerak and W J M Lommen (1997)** Variation in and relationships between physical and physiological seed attributes within a soybean seed lot. *Seed Science and Technology* 25:215-231.

**Kamra S K (1963a)** Determination of mechanical damage on Scots pine seed with X-ray contrast method. *Stud. For. Suecica* 8: 1–20.

**Kamra S K (1963b)** Studies on a suitable contrast agent for the X-ray radiography of Norway spruce seed (*Picea abies*). *Proc. Int. Seed Test. Ass.* 28: 197–201.

**Kamra S K (1964)** Determination of seed quality by X-rays. *Adv. Frontiers of Plant Sci.* 9: 119–130.

**Kobayashi T, K Higashi and H Kamada. (2003)** 4-Hydroxybenzyl alcohol accumulates in flowers and developing fruits of carrot and inhibits seed formation. *Journal of Plant Physiology* 607:19-25.

**Koornneefneef M, A Elgersma, C J Hanhart, E P. Van Loenen-Martinet, L. Von Rijn and J Zeevaart (1985)** A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 65:33-39.

**Kruse M (2000)** The effect of moisture content on linear dimensions in cereal seeds measured by image analysis. *Seed Science and Technology* 28: 779-791.

**Krüssmann, G. (1983).** Manual of cultivated conifers, translated by M. E. Epp. H-D. Warda and G. S. Daniels, eds. Timber Press, Portland.

**Le Page-Degivry MT (1977)** Inhibiteurs non acides et dormance embryonnaire chez *Taxus baccata*. *Physiol. Plant.* 41:85-88.

## CAPITULO II

- Lewington A. and E. Parker (1999)** Ancient trees: trees that live for 1000 years.  
London: Collins and Brown: 66B76.
- Leyva O R, C A Carballo, C A J Mejía. y C G Vázquez (2002)** Procesamiento digital de imágenes para la estimación de textura de endospermo en líneas de maíz.  
Rev. Fitotec. Mex. 25: 355-365.
- Lundstrom A N (1903)** Diskussionssinlägg vid För. F. Skogsvard disk - möte a Robertsfor. Arsskr. Fran Fören. F. Skogsvard i Norrland. Estocolmo. 1904:15.
- Mápula-Larreta M, J López-Upton, J J Vargas-Hernández and A Hernández-Livera. (2007)** Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico.  
Biodiversity and Conservation 16:727–742.
- McCarty D R, T Hattori, C B Carson, V Vasil, M Lazar, and I K Vasil (1991)** The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. Cell 66: 895–905.
- Mcdonald M B, A F Evans y A M Bennett (2001)** Using Scanners to Improve Seed and Seedling Evaluations. Seed Sciences and Technology 29: 683-689.
- Muñoz-Gutiérrez L, J J Vargas-Hernández, J López-Upton y M Soto-Hernández. (2009)** Effect of cutting age and substrate temperature on rooting of *Taxus globosa*. New Forests 38:187–196.
- Nicholson R y D X Munn (2003)** Observations on the propagation of *Taxus globosa* Schltld. Boletín de la Sociedad Botánica de México. Núm 72: 129-130.
- Nimachow G y J S Rawat (2011)** El tejo en la lucha contra el cáncer: Un estudio en West Kameng District de Arunachal Pradesh, India. Spanish Journal of Rural Development 2:2E 43-50.

## CAPITULO II

- Olszewski N, T P Sun and F Gubler (2002)** Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14:S61-S80.
- Poulsen K M y F Stubsgaard (1995)** Three methods for mechanical scarification of hardcoated seed. Humlebaek, Denmark. Danida Forest Seed Centre. 27:15 p.
- Price R A (1990)** The genera of Taxaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 71: 69B91.
- Ramírez-Sánchez S E, J López-Upton, G García de los Santos, J J Vargas-Hernández, A Hernández-Livera y Ó J Ayala-Garay (2011)** Variación Morfológica de Semillas de *Taxus globosa* Schltl. provenientes de dos regiones geográficas de México. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 34 (2): 93 – 99.
- Ramos-Lobato NA, Soto-Hernández M, Zavala-Chavez F, Rodríguez-González MT (2003)** Taxoides en el follaje del Tejo mexicano (*Taxus globosa* Schltl.). *Rev Chapingo Ser Hortic* 9:29–38.
- Razz, R. y T. Clavero. 1996.** Métodos de escarificación en semillas de *Humboldtiella ferruginea* y *Leucaena leucocephala*. *Rev. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia (Venezuela)*. 13:73-77.
- Reyes-Hernández J V, J J Vargas-Hernández, J López-Upton y H Vaquera-Huerta (2005)** Variación morfológica y anatómica en poblaciones Mexicanas de *Pseudotsuga* (pinaceae). *Acta Botánica Mexicana* 70: 47-67.
- Sahoo, L., M. Dadlani, D.P. Singh & S.P. Sharma. 2000.** Characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes using laboratory techniques. *Plant Varieties and Seeds*. 13: 31-43.
- Sako Y, E Regnier, T Daoust, K Harrison and M McDonald (2001)** Computer image

## CAPITULO II

analysis and classification of giant ragweed seeds. *WeedScience* 49: 738-745.

**Sánchez J A, R Orta y B C Muñoz (2001)** Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. *Agronomía Costarricense*. Universidad de Costa Rica. 25:67-91.

**Sapirstein H D, M Neuman, E H Wright, E Shwedyk and W Busshuk (1987)** An instrumental system for cereal grain classification using digital image analysis. *Journal of Cereal Science* 6: 3-14.

**Schelin M, M Tigabu, E Sawadogo and C P Odén (2004)** Predispersal seed predation in *Acacia macrostachya*, its impact on seed viability, and germination responses to scarification and dry heat treatments. *New Forest*. 27:251-267.

**Schomburg M F, C M Bizzell, D J Lee, J A D Zeevaart and R M Amasino (2003)** Over expression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* 15:151-163.

**SEMARNAT (2001)** Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección Ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. SEMARNAT. Diario Oficial de la Federación

**Shemluck J M, E Estrada, R Nicholsons and S W Brobst (2003)** A preliminary study of the taxane chemistry and natural history of the Mexican yew, *Taxus globosa* Schlttdl. *Bololestín de la Sociedad Botánica de México* 72:119-127.

**Silva G M, G H Gámez, F Zavala, H B Cuevas y G R Rojas (2001)** Efecto de cuatro fitorreguladores comerciales en el desarrollo y rendimiento del girasol. *Ciencia UANL*. Vol IV-001: 69-75.



## CAPITULO II

- Simak M and A Gustafsson (1953)** X-ray photography and sensitivity in forest tree species. *Hereditas* 39: 458–468.
- Simak M (1957)** The X-ray contrast method for seed testing: Scots Pine – *Pinus sylvestris* L. *Medd. f. Stat. SkogsForsk. Inst.*, 47(4): 1–22.
- Simpson, J.D., Wang, B.S.P. and Daigle, B.I. (2004)** Long-term seed storage of various Canadian hardwoods and conifers *Seed Sci. & Technol.* 32:561-572.
- Soto M, M Sanjuro, M T González, D. Cruz y F Giral (2000)** El Tejo Mexicano (*Taxus globosa* Schl.). Potencial de su aprovechamiento en taxol. *Ciencia Ergo Sum* 7(3): 277-279.
- Soto-Hernández M, J López Upton, J J Vargas-Hernández, L Muñoz-Gutiérrez, y R San Miguel. 2011.** Estado de conservación de *Taxus globosa* en México. *Spanish Journal of Rural Development II (2 especial)*: 61-68.
- Spjut R. W. 2007.** Taxonomy and Nomenclature of *Taxus* (Taxaceae) *Journal of the Botanical Research. Institute Texas* 1:203-289.
- Spjut R. W. 2010.** Una revisión taxonómica clave para las especies y variedades de *Taxus* (Taxaceae). III Taller Internacional, Cartel, marzo 25-26, Ponferrada, León, España (20workshop\_secondcall.pdf [\). Enviado como tres archivos pdf.](http://www.amorteira.org/PDF/yew%)
- Taiz L y E Zeiger. (2006)** Fisiología Vegetal. Volumen 2. Castelló de la Plana: Publicaciones de la Universidad Jaume I. Traducido de *Plant physiology*, 3ª ed. 1265 p.
- Thomas P A and A Polwart (2003)** *Taxus baccata* L. *Journal of Ecology* 91(3):.489-524.

## CAPITULO II

- Vance N C and O P Rudolf (2008)** *Taxus L. yew*. In: F T Bonner and R G Nisley (Eds.) *Woody Plant Seed Manual*. USDA, Forest Serv., Agriculture Handbook 727. USDA. pp: 1098-1113.
- Verdugo G, J Marchant, J M Cisternas, M X Calderón y P Peñaloza (2007)**. Caracterización morfométrica de la germinación de *Chloraea crispa* Lindl. (orchidaceae) usando Análisis de imagen. *Gayana Bot.* 64(2), 232- 238.
- White C N, W M Proebsting, P Hedden and C J Rivin (2000)**. Gibberellins and seed development in maize. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiol.* 122: 1082-1088.
- Willan R L (1991)** Guía para la Manipulación de semillas forestales. FAO. 500 p.
- Willan R L (2000)** Pretratamientos de semillas. In: Técnicas para la germinación de semillas forestales. Serie Técnica. Manual Técnico No. 39. CATIE-PROSEFOR-DFSC. Turrialba, Costa Rica. 32p.
- Wright, S (1968)** *Evolution and the Genetics of Populations: Genetics and Biometric Foundations*. The University of Chicago Press, Chicago, Il. 480 p.
- Zamudio R S (1992)** Flora del Bajío y regiones adyacentes. Fascículo 9. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán.6 p.
- Zavala Ch F, M Soto-Hernández y M T Rodríguez-González (2001)** El Romerillo (*Taxus globosa* Schlcht.): Biología, dificultades y perspectivas de su Uso. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 7(1): 77-94.
- Zavala CH F (2001)** Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht. en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. II: Población de adultos y algunas características del hábitat. *Ciencia Ergo Sum* 8(2): 166-174.

## CAPITULO II

**Zavala-Chávez F (2002)** Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht. en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. II: Población de juveniles y algunos datos de semillas. *Ciencia Ergo Sum* 9 (2): 177-183.

# **Capítulo III**

**Variación morfológica de semillas de *Taxus globosa*  
Schltdl., procedentes de dos regiones geográficas de  
México**

## CAPITULO III

### RESUMEN

*Taxus globosa* Schldl. es la única especie del género *Taxus* que se encuentra en México y está protegida por el Gobierno Mexicano. Su corteza y hojas contienen taxol, un compuesto de gran valor por su función como anticancerígeno. Su regeneración natural es por semillas, que germinan de manera escasa y presentan latencia. El presente estudio se hizo para conocer la variación morfológica existente en las semillas de *Taxus globosa* y determinar si la latencia es causada por algún factor físico. Se utilizaron semillas procedentes de dos regiones de México: norte (Nuevo León) y centro (Hidalgo y Querétaro). Se midieron las dimensiones de la semilla (largo, ancho, área, perímetro y proporción embrión-megagametofito) mediante análisis de imágenes, así como peso volumétrico y peso de 1000 semillas. Para evaluar las características físicas de la testa, las semillas se escarificaron con ácido sulfúrico durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min y después se les aplicó una prueba de viabilidad con tetrazolio; también se midió la dureza de la testa y la velocidad de imbibición. Se encontraron diferencias geográficas en el tamaño de la semilla (28 % más grande en la región norte); la proporción de embrión-megagametofito fue de sólo 4 % en el norte y de 3 % en el centro; la semilla de ambas regiones sólo soportó 5 min en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y la testa en las semillas del norte es más dura que en las del centro (1.29 vs. 0.86 kg cm<sup>-2</sup>). La semilla del norte absorbe más agua que la del centro. La semilla no necesita escarificación para ablandar la testa. El embrión en *T. globosa* se considera subdesarrollado y posible causa de la latencia de la semilla.

**Palabras clave:** *Taxus globosa*, dureza de testa, imbibición, variación morfológica.

## CAPITULO III

### 3.1 INTRODUCCIÓN

*Taxus globosa* Schltl., comúnmente llamado tejo, romerillo o granadillo, es la única especie del género *Taxus* que se encuentra en México; la corteza y hojas de esta conífera contienen taxol (Shemluck *et al.*, 2003), una sustancia útil en el tratamiento de varios tipos de cáncer (Barquero, 2007; Soto *et al.*, 2000). El gobierno Mexicano considera a *T. globosa* en la categoría de especie rara para su protección por lo restringido de su distribución natural (SEMARNAT, 2010). Habita en los bosques mesófilo de montaña y de pino en zonas aisladas, barrancas húmedas y pendientes pronunciadas (Zavala, 2001), en los Estados de Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca y Chiapas en México; también se encuentra en Guatemala, El Salvador y Honduras (Zamudio, 1992; Shemluck *et al.*, 2003). A pesar de su importancia ecológica y medicinal, existen pocos estudios de *T. globosa* en los que se aborden aspectos de demografía en una localidad (Zavala, 2002), contenido de taxol en corteza y hojas (Soto *et al.*, 2000) o germinación de la semilla (Zavala, 2001; Nicholson y Munn, 2003). Se ha tratado infructuosamente de reproducirla por semilla (Zavala, 2001; Nicholson y Munn, 2003), pero solo se ha tenido éxito con métodos vegetativos (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2009).

La función primordial de la semilla en cualquier especie es producir nuevos individuos. La variación en el tamaño de la semilla se considera importante porque puede proporcionar a la plántula la habilidad para establecerse en un mosaico de micrositios con condiciones bióticas y abióticas diversas (Bonfil, 1998). Se ha reportado que la semilla de *T. globosa* presenta latencia (Zavala, 2001; Shemluck *et al.*, 2003),

### CAPITULO III

característica que según Bewley y Black (1994) puede ser de origen mecánico, fisiológico o morfológico. Según Masa-Aki *et al.* (2007), el conocimiento de la anatomía de la semilla de cualquier especie puede proporcionar información sobre las causas de la latencia y cómo eliminarla. Si bien en otras especies del género *Taxus* se han encontrado embriones inmaduros (Forbis *et al.*, 2002), en *T. globosa* no se han hecho estudios anatómicos que confirmen dicha aseveración, y la descripción disponible de la anatomía de su semilla es muy general. En poblaciones de la región de Mineral del Chico, Hidalgo, Zavala (2002), midió únicamente el peso de la semilla en diferentes grados de madurez.

El tamaño de la semilla se correlaciona positivamente con la germinación y el crecimiento de las plántulas en algunas especies forestales, pues las semillas grandes logran un mayor incremento inicial en altura que las obtenidas de semillas pequeñas, debido a que poseen más tejido de reserva como fuente de alimento inicial para el embrión, y proveen nutrientes por más tiempo (Bonfil, 1998). Stanton (1984) menciona que las semillas grandes de algunas especies forestales pueden germinar más y con mayor vigor que las pequeñas. En especies maderables como *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Tenorio-Galindo *et al.*, 2008) y no maderables como *Stenocercus beneckeii* (Ehrenb.) Buxb. (Ayala-Cordero *et al.*, 2004) se encontraron variaciones en tamaño y peso de la semilla fisiológicamente madura, variación que tiene repercusiones tanto ecológicas como económicas. Munive-Martínez *et al.* (2008) analizaron la variación de semillas en *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw, mediante variables de peso, longitud y ancho, y encontraron diferencias significativas entre regiones, y concluyeron que estas

## CAPITULO III

características sirven como base para incrementar el tamaño de la semilla mediante mejoramiento genético.

En el caso del *T. globosa* se propone usar el tamaño de la semilla como una estrategia de selección temprana para un programa de mejoramiento genético. Por lo anterior, el presente trabajo se realizó con el objetivo de comparar las características morfológicas externas e internas de la semilla de *Taxus globosa* procedentes de dos regiones geográficas, y cuantificar la dureza y grado de permeabilidad de la testa.

### 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.1 Recolección de semilla

La semilla se recolectó en 11 localidades, cinco de ellas en el Estado de Nuevo León, región norte, y seis en los Estados de Hidalgo y Querétaro, región centro (Cuadro 3.1, Figura 3.1). La semilla se obtuvo directamente de la copa de los árboles durante septiembre a noviembre de 2007, cuando el arilo tenía un color rojo. Las semillas recolectadas fueron empaquetadas y rotuladas con datos de sitio y fecha. Se hicieron lotes masales al agrupar la semilla por región. En muestras de semillas completas tomadas al azar se hizo la evaluación morfológica de semillas con y sin arilo; en las semillas sin arilo también se hizo una caracterización física y un análisis anatómico.



## CAPITULO III

**Cuadro 3. 1 Ubicación de las poblaciones de *Taxus globosa* Schltdl. muestreadas.**

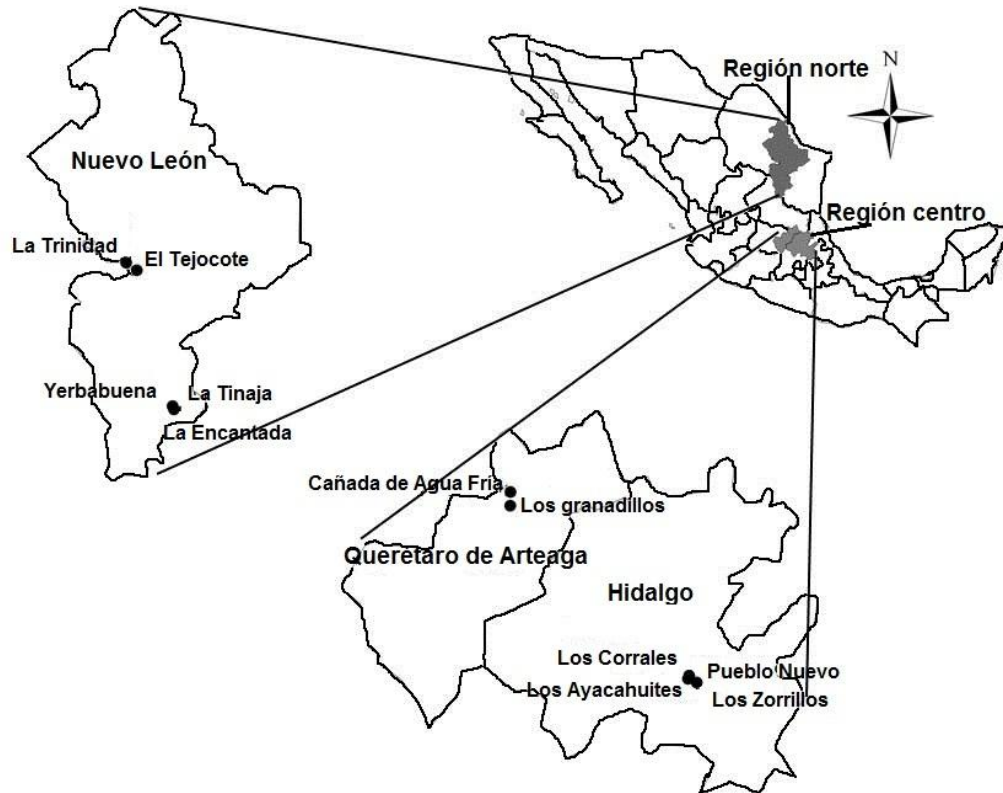
| Localidad             | Municipio, Estado      | Latitud<br>N | Longitud<br>O | Altitud<br>(m) |
|-----------------------|------------------------|--------------|---------------|----------------|
| <b>Región Norte:</b>  |                        |              |               |                |
| El Tejocote           | Santiago, N.L.         | 25°19'20"    | 100°15'30"    | 1970           |
| Cañada La Trinidad    | Santiago, N.L.         | 25°14'49"    | 100°09'20"    | 1361           |
| Yerbabuena            | Zaragoza, N.L.         | 23°55'31"    | 99°47'58"     | 2100           |
| La Encantada          | Zaragoza, N.L.         | 23°55'20"    | 99°48'20"     | 2385           |
| La Tinaja             | Zaragoza, N.L.         | 23°53'25"    | 99°47'29"     | 2580           |
| <b>Región Centro:</b> |                        |              |               |                |
| Los Granadillos       | Pinal de Amoles, Qro.  | 21°12'40"    | 99°41'00"     | 2400           |
| Cañada de Agua Fría   | Pinal de Amoles, Qro.  | 21°08'14"    | 99°41'06"     | 2570           |
| Los Zorrillos         | Mineral El Chico, Hgo. | 20°13'16"    | 98°43'08"     | 2400           |
| Los Corrales          | Mineral El Chico, Hgo. | 20°12'13"    | 98°43'33"     | 2550           |
| Los Ayacahuites       | Mineral El Chico, Hgo. | 20°12'25"    | 98°43'10"     | 2630           |
| Pueblo Nuevo          | Mineral El Chico, Hgo. | 20°11'04"    | 98°40'42"     | 2530           |

### 3.2.2 Descripción morfológica externa de la semilla completa

La descripción morfológica externa de las semillas y el arilo se realizó mediante análisis de imágenes digitales (Media Cybernetics, 1997); se usaron 100 semillas completas, para comparar el arilo entre las regiones; las imágenes se obtuvieron con un escáner marca Epson 3170<sup>®</sup> a color, con una resolución de 2400 dpi. A las mismas semillas se les retiró el arilo y se escanearon nuevamente. Con las imágenes obtenidas

## CAPITULO III

se determinó área, longitud, ancho y perímetro de la semilla sin arilo (García y Estrada, 1999), con apoyo del programa analizador de imágenes Imagetool<sup>®</sup> 3.0 para Windows.



**Figura 3. 1 Ubicación geográfica de los sitios de recolección de la semilla de *Taxus globosa* Schtdl.**

### 3.2.3 Descripción de estructuras internas de la semilla

Para identificar las estructuras internas de la semilla se hizo una prueba topográfica de 2, 3, 5 cloruro de trifeniltetrazolio (Sigma<sup>®</sup>) (ISTA, 2005) en una muestra de 25 semillas por región, sin arilo y pre-acondicionada mediante un remojo en agua

### CAPITULO III

destilada durante 24 h. Las semillas fueron disectadas longitudinalmente y puestas en una solución de cloruro de tetrazolio (0.1 %) durante 8 h. Luego se colocaron bajo la lente de un microscopio estereoscópico (Olimpus<sup>®</sup>), conectado a una computadora, para digitalizar las imágenes; se eliminó el exceso de agua para evitar brillos que pudieran afectar la imagen. De estas semillas se extirparon embriones que también fueron fotografiados.

Para estimar el área, la longitud, el ancho y el perímetro del megagametofito y del embrión se utilizaron otras 25 semillas por región, preacondicionadas como se indicó anteriormente y disectadas longitudinalmente; cada semilla se fotografió por separado con el procedimiento ya descrito; las imágenes obtenidas se analizaron con Imagetool<sup>®</sup> 3.0 para Windows. Con base en la cantidad total de píxeles representados por el megagametofito y el embrión en cada imagen, se obtuvo la proporción que representa la superficie de estas estructuras con respecto a la semilla entera.

#### 3.2.4 Caracterización física de la semilla

En esta caracterización se estimó el peso de 1000 semillas (P1000S), a partir de ocho repeticiones de 100 semillas sin arilo por cada región, según el método propuesto por la ISTA (2005). Además se evaluó el peso volumétrico (PV) de semilla sin arilo, en 5 mL de semilla medidos con una probeta de 10 mL, y posteriormente se valoró su masa; en este procedimiento se realizaron cuatro repeticiones por región. Los pesos se obtuvieron con una balanza analítica Ohaus<sup>®</sup>.

## CAPITULO III

### 3.2.5 Evaluación de características físicas de la testa

Con la finalidad de verificar las características físicas de la testa como posible barrera para la entrada de agua y salida de la radícula, se hicieron tres pruebas en las muestras de ambas regiones. La primera prueba consistió en la escarificación con ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ , grado reactivo), a dos repeticiones de 25 semillas, con tiempos de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min; posteriormente se verificó la viabilidad de la semilla con una prueba de tetrazolio (ISTA, 2005). La segunda prueba fue la evaluación de la dureza en lotes de 25 semillas con cuatro repeticiones, mediante un texturómetro Universal marca Force Five Mod FDV-30<sup>®</sup>, en  $kg\ cm^{-2}$ . La tercera fue una prueba de imbibición en una muestra de 50 semillas con dos repeticiones; las semillas se colocaron en 200 mL de agua destilada, volumen que se mantuvo constante, a una temperatura entre 15 y 23 °C, y se registró el peso total de las muestras cada 24 h en una balanza analítica.

### 3.2.2.6 Análisis estadístico

Las variables de las pruebas de caracterización física, los pesos de 1000 semillas y volumétrico, así como los de la caracterización morfológica, se analizaron por medio de la prueba de t de Student, con muestras apareadas y  $\alpha = 0.01$ , con el programa XLSTAT (<http://www.xlstat.com/>) complemento de EXCEL. Para la comparación entre regiones geográficas en cuanto a las características de la testa, se utilizó un análisis de varianza y una prueba de Tukey con el programa estadístico SAS<sup>®</sup>

## CAPITULO III

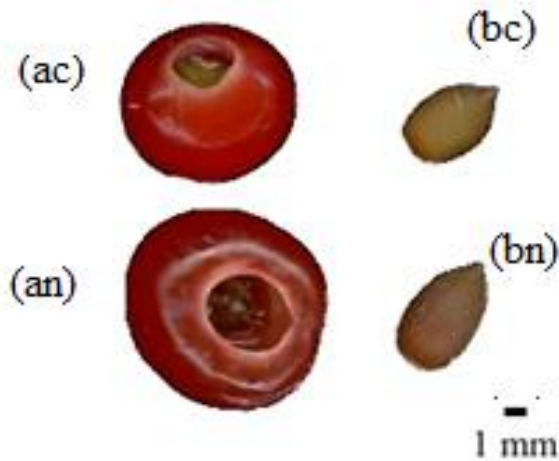
(SAS Institute, 1998). Los datos de la curva de imbibición, que mostraron la cinética de entrada del agua en la semilla, se analizaron mediante una regresión logarítmica con respecto al tiempo, con su respectiva  $R^2$ .

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1 Descripción morfológica externa de la semilla completa

La semilla de *T. globosa* está cubierta por un arilo carnoso y mucilaginoso de color rojo en estado maduro (Figura 3.2), que tiene una abertura en su parte inferior, por la cual se puede ver la semilla; una vez retirado el arilo se observa a la semilla desnuda. Las imágenes obtenidas permitieron analizar las semillas de manera rápida y confiable, en las cuales se detectaron diferencias significativas entre regiones (Cuadro 3.2), ya que las provenientes de la región norte superaron a las del centro en todas las variables medidas ( $P \leq 0.05$ ), tanto en semilla con arilo como sin arilo. Estas diferencias se atribuyen al aislamiento geográfico que existe entre las poblaciones, que pudo haber ocasionado un proceso de diferenciación morfológica, como se ha demostrado en otras especies (Mápula-Larreta *et al.*, 2007; Mehes *et al.*, 2009). El reducido tamaño de las poblaciones de la región centro del país (Hidalgo y Querétaro), puede estar ocasionando endogamia y por tanto, reducción en el tamaño de las semillas como la reportada por Mosseler *et al.* (2000) en poblaciones de *Picea rubens*.

### CAPITULO III



**Figura 3.2. Semilla completa de *T. globosa* (con arilo) de la región centro (ac) y región norte (an). Semilla de *T. globosa* sin arilo, de la región centro (bc) y norte (bn).**

En estas especies se ha encontrado que las poblaciones de sitios más extremos, como es el caso de las semillas del norte, generalmente producen semillas de mayor tamaño, como un mecanismo para aumentar la cantidad de reservas (Donahue y López-Upton, 1996; Mápula-Larreta *et al.*, 2007). Lo anterior podría indicar que las semillas del norte generan plantas más vigorosas (Stanton, 1984). Igualmente *T. globosa* podría estar en un proceso de sub-especiación o extinción, ya que el flujo génico disminuye y provoca cambios genéticos que pueden beneficiar o no a la especie (Ledig, 1986). Para corroborar lo anterior es necesario realizar estudios ecológicos más detallados así como de genética de poblaciones.

### CAPITULO III

**Cuadro 3. 2 Comparación de medias (T de Student) de las variables de morfología externa en la semilla de dos regiones de *Taxus globosa* Schltl. de México.**

| Variables                | Región Norte |        | Región Centro |        | Significancia |
|--------------------------|--------------|--------|---------------|--------|---------------|
|                          | Promedio     | CV (%) | Promedio      | CV (%) |               |
| <b>Semilla completa</b>  |              |        |               |        |               |
| Área (mm <sup>2</sup> )  | 77.48        | 19.61  | 64.61         | 17.40  | **            |
| Longitud (mm)            | 10.37        | 9.85   | 9.53          | 8.88   | **            |
| Ancho (mm)               | 9.54         | 13.47  | 8.81          | 9.48   | **            |
| Perímetro (mm)           | 36.32        | 9.93   | 33.03         | 9.48   | **            |
| <b>Semilla sin arilo</b> |              |        |               |        |               |
| Área (mm <sup>2</sup> )  | 23.82        | 9.62   | 19.15         | 12.32  | **            |
| Longitud (mm)            | 6.57         | 7.81   | 6.18          | 11.64  | **            |
| Ancho (mm)               | 4.72         | 6.53   | 4.04          | 10.83  | **            |
| Perímetro (mm)           | 19.79        | 6.75   | 17.85         | 10.84  | **            |

\*\*Diferencias con nivel de probabilidad de 0.01; CV = coeficiente de variación

#### 3.3.2. Descripción de la morfología interna de la semilla

En las proporciones que representan el megagametofito y el embrión con respecto a la semilla completa no se encontraron diferencias significativas entre regiones. En otros estudios con especies del género *Taxus* se ha observado que el embrión ocupa 10 % del total de la semilla (Forbis *et al.*, 2002). En el presente estudio los embriones de *T. globosa* representan sólo 3 y 4 % del tamaño de la semilla en las regiones centro y norte del país, respectivamente (Cuadro 3.3), por lo que se puede decir que en general el embrión en *T. globosa* es pequeño y subdesarrollado. Forbis *et al.* (2002) reportan que el embrión del género *Taxus* es el más pequeño de las

### CAPITULO III

gimnospermas. Esta información es valiosa, pues puede estar relacionada con el tipo de latencia que presenta la semilla, ya que si el embrión no está completamente desarrollado hasta el punto en que ocupe la longitud total de la semilla y sea capaz de romper la testa para emerger, no logrará germinar; esto coloca a *T. globosa* como una especie que presenta latencia morfológica, que según Forbis *et al.* (2002) ocurre en especies poco evolucionadas a las que llama plantas ancestrales.

En las variables de área, largo, ancho y perímetro de las semillas (Cuadro 3.3) se encontraron diferencias ( $P \leq 0.01$ ) entre ambas regiones. Si estas diferencias tienen relación con procesos biológicos como germinación, crecimiento y desarrollo de plántulas, podrían servir como base para el establecimiento de una estrategia de selección temprana. Sin embargo, estos resultados son preliminares y se requieren más estudios para determinar si el tamaño de la semilla es una característica importante para la supervivencia de las poblaciones de esta especie.



## CAPITULO III

**Cuadro 3. 3 Comparación de medias (t de Student) de las variables de morfología interna en semillas de dos regiones de *T. globosa* Schtdl. de México.**

| Variables  | Región Norte |        | Región Centro |        | Significancia |
|--|--------------|--------|---------------|--------|---------------|
|  | Promedio     | CV (%) | Promedio      | CV (%) |               |
| <b>Megagametofito</b>                                |              |        |               |        |               |
| Área (mm <sup>2</sup> )                              | 12.49        | 12.74  | 9.07          | 18.14  | **            |
| Longitud (mm)  | 4.60         | 5.81   | 4.08          | 11.76  | **            |
| Ancho (mm)   | 3.49         | 7.77   | 2.85          | 8.65   | **            |
| Perímetro (mm)                                       | 17.87        | 17.71  | 12.75         | 16.95  | **            |
| <b>Embrión</b>                                       |              |        |               |        |               |
| Área (mm <sup>2</sup> )                              | 0.760        | 0.21   | 0.569         | 0.26   | **            |
| Longitud (mm)  | 1.925        | 0.12   | 1.701         | 0.17   | **            |
| Ancho (mm)   | 0.569        | 0.11   | 0.470         | 0.15   | **            |
| Perímetro (mm)                                       | 4.649        | 0.13   | 4.146         | 0.18   | Ns            |
| <b>Proporción respecto a la semilla completa (%)</b> |              |        |               |        |               |
| Embrión  | 3.23         | 17.42  | 4.4           | 15.07  | Ns            |
| Megagametofito                                       | 58.11        | 5.24   | 57.81         | 6.74   | Ns            |

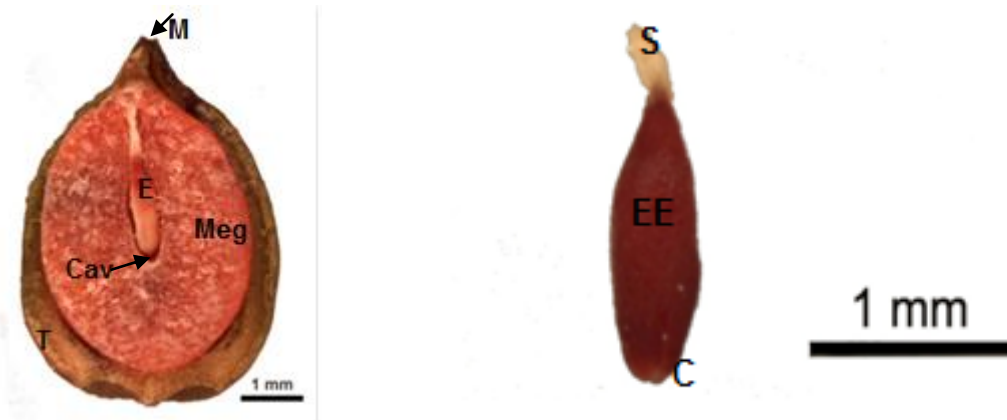
\*\*Significativo con nivel de probabilidad de 0.01; ns = no significativo.

### 3.3.3 Descripción de estructuras internas de la semilla

La semilla, como gimnosperma, posee tres estructuras básicas (Figura 3.3), testa, megagametofito y embrión. La parte externa de la testa está compuesta por una serie de capas de tejido, presumiblemente exotesta, mesotesta y endotesta; al absorber agua la exotesta se desprende fácilmente; bajo estas capas se encuentra la testa lignificada. El megagametofito, de consistencia granulosa y color blanco, se

### CAPITULO III

encuentra protegiendo al embrión cuyo tejido blanco es más consistente que el del megagametofito y posee un suspensor que difícilmente se tiñe al ponerse en contacto con la solución de tetrazolio, por ser tejido muerto.



A

B

**Figura 3.3. Corte longitudinal de semilla (A) de *Taxus globosa* Schtdl. procesada con cloruro de tetrazolio; T = testa, M = micrópilo; Meg = megagametofito; Cav = cavidad embrionaria; E = embrión; (B) Embrión disectado y teñido con cloruro de tetrazolio; S = suspensor; EE = eje embrionario; C = cotiledones.**

#### 3.3.4 Caracterización física de la semilla

El peso de 1000 semillas fue mayor en las procedentes de la región norte ( $P \leq 0.01$ ; Cuadro 3.4). Datos similares se han observado en otras especies; por ejemplo, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en donde Mápula-Larreta *et al.* (2007) reportan mayor peso de conos y semillas de poblaciones en Chihuahua, Coahuila y Nuevo León que en las de Veracruz, Hidalgo y Puebla.

En otras coníferas, como *Pinus monticola* Douglas ex. D. Don. y *P. strobus* L., se ha encontrado reducción del peso de las semillas en poblaciones de Canadá, atribuida

### CAPITULO III

a la fragmentación del hábitat, ya que la fragmentación disminuye el flujo génico y reduce la diversidad genética (Mehes *et al.*, 2009). En México, Donahue y López-Upton (1996) y Juárez *et al.* (2006) encontraron amplias diferencias entre poblaciones del norte y centro del país en cuanto a características morfológicas de conos, semillas, hojas y plántulas de *Pinus greggii* Engelm. y *Pseudotsuga menziesii*, lo que fue atribuido a la fragmentación del hábitat, al tamaño reducido de las poblaciones y a la deriva génica que como consecuencia puede reducir el tamaño de las semillas. Esto se observó en las áreas de estudio, ya que las poblaciones del centro se constituyen con 10 a 200 individuos y la región norte con 1,000 a 5,000 individuos por población; otro fenómeno que puede estar involucrado es la fragmentación del hábitat, aplicable a la región centro, ya que las poblaciones están conformadas por pequeños manchones de árboles en cañadas contiguas en la zona, particularmente en el Estado de Hidalgo.

**Cuadro 3. 4 Caracteres físicos de la semilla de *Taxus globosa* Schltdl. procedente de dos regiones geográficas de México.**

| Región | P1000S (g) | CV (%) | PV (kg hL <sup>-1</sup> ) | CV (%) | Dureza                 |        |
|--------|------------|--------|---------------------------|--------|------------------------|--------|
|        |            |        |                           |        | (kg cm <sup>-2</sup> ) | CV (%) |
| Norte  | 44.31 a    | 2.63   | 45.95ns                   | 5.45   | 1.29467 a              | 0.13   |
| Centro | 34.87 b    | 4.25   | 47.05ns                   | 2.13   | 0.86618 b              | 0.42   |
| DMS    | 0.124      |        |                           |        | 0.40298                |        |

Medias con letras iguales dentro de columnas, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMS = diferencia mínima significativa; ns = no significativo; CV = coeficiente de variación; P1000S = peso de mil semillas; PV = peso volumétrico.

Melzack y Watts (1982) reportaron un peso de 56.6 g por 1 000 semillas para *Taxus baccata* L. en la región oriental de Inglaterra, y mencionaron que son las semillas más

### CAPITULO III

pequeñas encontradas en esa zona, y las compararon con semillas de Polonia y Holanda, cuyos valores son de 59 y 77 g por 1 000 semillas, respectivamente. Las semillas del centro de México (34.9 g) están por debajo de los valores reportados hasta ahora para *Taxus globosa*.

La semilla presenta su más alto nivel de vigor y potencial germinativo cuando alcanza la madurez fisiológica. En este estado la semilla tiene el máximo peso seco por haber acumulado la máxima cantidad de reservas nutritivas, y el embrión, presumiblemente, ha completado su desarrollo (Ohto *et al.*, 2007). Por ello, una semilla relativamente pequeña con un alto peso volumétrico, tiene igual calidad fisiológica que una semilla relativamente grande (Rodríguez *et al.*, 1998). En este estudio se encontró que las semillas de la región centro tienen un promedio ligeramente mayor de peso volumétrico que la región norte (47.05 vs. 45.96 kg hL<sup>-1</sup>), pero sin diferencias estadísticas ( $\alpha = 0.01$ ), por lo que se puede concluir que la semilla del centro tiene igual calidad fisiológica que la semilla del norte. Sin embargo, para este estudio no se realizaron pruebas de vigor ni de capacidad germinativa.

#### 3.3.5 Características físicas de la testa

En la prueba de escarificación con ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, grado reactivo) a distintos tiempos, se encontró que la semilla no soporta un tiempo mayor a 5 min (Cuadro 5), puesto que en periodos más prolongados pierde viabilidad. Este dato proporciona un primer indicio de que la testa no es obstáculo para la germinación, pues

### CAPITULO III

se logró romper o dañar en algún grado y se permitió la imbibición; es decir, la germinación no ocurrió por razones inherentes al embrión. En el género *Prosopis*, D'Aubeterre *et al.* (2002) reportaron un alto porcentaje de germinación al aplicar a la semilla, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 5 o 10 min. En contraste, la semilla de *T. globosa* de las dos regiones mexicanas sólo soportó la inmersión en ácido sulfúrico por 5 min sin perder viabilidad. No obstante, se encontraron diferencias ( $P \leq 0.01$ ) entre regiones en dureza de la semilla (Cuadro 4), prueba en la que las semillas del norte superaron a las del centro (1.29 vs. 0.86 kg cm<sup>-2</sup>).

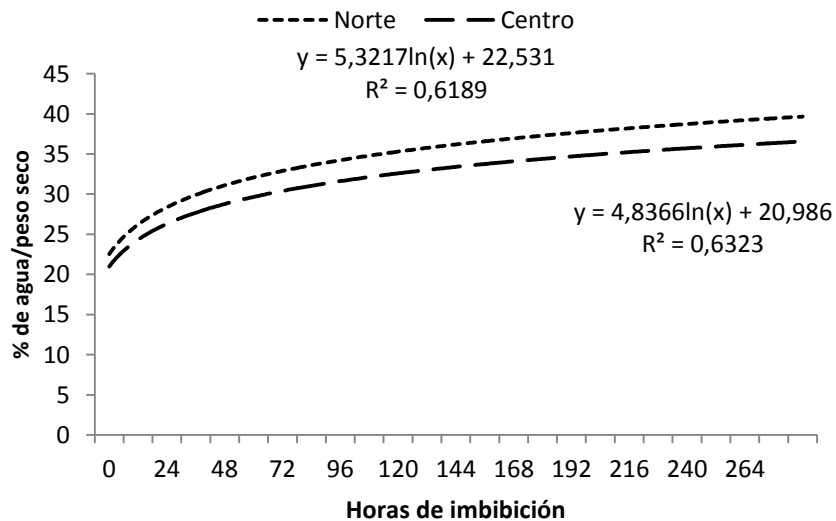
**Cuadro 3. 5. Tratamiento de escarificación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en semillas de *Taxus globosa* Schtdl. procedentes de dos regiones de México.**

| Tratamiento<br>(tiempo en minutos) | Región Norte | Región Centro |
|------------------------------------|--------------|---------------|
| Testigo                            | Viable       | Viable        |
| 5                                  | Viable       | Viable        |
| 10                                 | No viable    | No viable     |
| 15                                 | No viable    | No viable     |
| 20                                 | No viable    | No viable     |
| 25                                 | No viable    | No viable     |
| 30                                 | No viable    | No viable     |

En condiciones naturales, las semillas con cubiertas muy duras germinan sólo hasta que la testa se ablanda, lo que se consigue a través de su degradación bioquímica por digestión de los animales, o acción de microorganismos, habitantes naturales del ambiente o por los efectos físicos del pisoteo (Moreno *et al.*, 2006). Se

### CAPITULO III

esperaría entonces que al tratar de emerger el embrión, la testa no sea un impedimento ni para la entrada del agua ni para la emisión de la radícula. Algunas semillas de otras especies son impermeables al agua. *T. globosa* no parece tener ese problema, ya que las semillas mostraron imbibición plena con sólo 24 h de remojo (Figura 3.4). El patrón de imbibición fue similar entre las dos regiones, aunque las semillas de la región norte absorben agua en menos tiempo; a las 132 h se detiene la imbibición, para las dos regiones. También se puede inferir que el potencial hídrico de la semilla es lo suficientemente negativo para permitir la entrada del agua en el proceso de imbibición.



**Figura 3. 4. Curva de imbibición de semillas de *Taxus globosa* Schldl. procedentes de dos regiones geográficas de México.**

### CAPITULO III

El grosor de la testa y el número de capas de células que la componen juegan un papel importante en el proceso de absorción de agua (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2007). La semilla de *T. globosa* cuenta con varias capas de cutícula que forman la exotesta, y en esta investigación se observó que además de absorber el agua, también la retienen.

El papel de la testa es fundamental en la incorporación de agua por la semilla; ésta y su permeabilidad están relacionadas con el intercambio gaseoso (Bewley y Black, 1994). El efecto de la testa sobre el embrión puede ser químico -por ejemplo, por la presencia de inhibidores fenólicos- o mecánico al impedir el flujo necesario de agua y oxígeno para la germinación (Moreno *et al.*, 2006). De acuerdo con la curva de imbibición obtenida, a partir de las 24 h aumentó la entrada de agua, por lo que permite deducir que la testa de *Taxus globosa* no impide la absorción de agua, de modo que la latencia de la semilla reportada por Nicholson y Munn (2003) probablemente se deba a que el embrión está subdesarrollado o inmaduro.

## CAPITULO III

### 3.4 CONCLUSIONES

Las variables morfológicas y las características físicas analizadas en la semilla de *Taxus globosa* muestran diferencias significativas entre regiones geográficas, ya que son distintas en tamaño (28 % más grande en la región norte). Esta especie presenta un embrión subdesarrollado o latencia de tipo morfológico, que dificulta la germinación de la semilla; la proporción de embrión-megagametofito fue de sólo 4 % en el norte y de 3 % en las del centro. Las semillas provenientes de ambas regiones no requieren de escarificación, ya que no poseen una testa dura e impermeable al agua.



## CAPITULO III

### 3.5 LITERATURA CITADA

- Ayala-Cordero G, T Terrazas, L López-Mata, C Trejo (2004)** Variación en el tamaño y peso de las semilla y su relación con la germinación en una población de *Stenocereus beneckeii*. *Interciencia* 29:692-697.
- Barquero A (2007)** Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Rev. Quím.Viva* 6:19-35.
- Bewley J D, M Black (1994)** *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York. 445 p.
- Bonfil C (1998)** The effects of the seed size, cotyledon reserves, and herbivory on seedling survival and growth in *Quercus rugosa* and *Quercus laurina* (Fagaceae). *Amer. J. Bot.* 85:79-87.
- D'Aubeterre R, J Principal, J García (2002)** Effect of different scarification methods on the germination of three species of the *Prosopis* genera. *Rev. Científica* 12:575-577.
- Domínguez-Domínguez S, A Domínguez-López, A González-Huerta, S Navarro-Galindo (2007)** Cinética de imbibición e isotermas de adsorción de humedad de la semilla de jamaica (*Hibiscus sabdarifa* L.) *Rev. Mex. Ing. Quím.* 3:309-316.
- Donahue J K, J López-Upton (1996)** Geographic variation in leaf, cone and seed morphology of *Pinus greggii* Engelm. in native forest. *For. Ecol. Manage.* 82:145-157.

### CAPITULO III

**Forbis T A, S K Floyd, A Queiroz (2002)** The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: implications for the evolution of seed dormancy. *Evolution* 56:2112-2125.

**García de los Santos G, J A Estrada G (1999)** Caracterización de frijol de la variedad Bayomex mediante descriptores agronómicos y análisis de imágenes de morfología de semillas. *Rev. Fitotec. Mex.* 22:63-74.

**ISTA, International Seed Testing Association (2005)** Handbook on Tetrazolium Testing. Zurich. Switzerland. 100 p.

**Juárez A A, J López-Upton, J J Vargas-Hernández, C Sáenz-Romero (2006)** Variación geográfica en la germinación inicial de plántulas de *Pseudotsuga menziesii* de México. *Agrociencia* 40:783-792.

**Ledig F T (1986)** Conservation strategies for forest gene resources. *For. Ecol. Manage.* 14:77-90

**Mápula-Larreta M, J López-Upton, J J Vargas-Hernández, A Hernández-Livera (2007)** Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico. *Biodiv. Conserv.* 16:727-742.

**Masa-Aki O, L S Stone, J J Harada (2007)** Genetics control of seed development and seed mass. *In: Seed Development, Dormancy and Germination.* K Bradford, H Nonogaki (eds.). *Annu. Plant Rev.* 27:1-24.

**Media Cybernetics (1997)** Image Pro Plus, versión 3.1. Springfield, MD, USA. 534 p.

**Mehes M, K Kabwe-Nkongolo, P Michael (2009)** Assessing genetic diversity and structure of fragmented populations of eastern white pine (*Pinus strobus*) and

### CAPITULO III

- western white pine (*P. monticola*) for conservation management. *J. Plant Ecol.* 2:143-151.
- Melzack R, D Watts (1982)** Variations in seed weight, germination, and seedling vigour in the yew (*Taxus baccata* L.) in England. *J. Biogeography* 9:55-63.
- Moreno F, G A Plaza, S V Magnitsky (2006)** Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). *Agron. Colomb.* 24:290-295.
- Mosseler A, J E Major, J D Simpson, B Daigle, K Lange, Y S Spark, K H Johnsen, O P Rajora (2000)** Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. I. Reproductive traits and fecundity. *Can. J. Bot.* 78:928-940.
- Munive-Martínez E, O Vázquez-Cuecuecha, E M Zamora-Campos, E Fernández-Pedraza, E García-Gallegos (2008)** Variación de conos y semillas de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw de dos procedencias del Estado de Tlaxcala. *Foresta Ver.* 10:39-46.
- Muñoz-Gutiérrez L, J J Vargas-Hernández, J López-Upton, M Soto-Hernández (2009)** Effect of cutting age and substrate temperature on rooting of *Taxus globosa*. *New Forests* 38:187-196.
- Nicholson R, D X Munn (2003)** Observations on the propagation of *Taxus globosa* Schltdl. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 72:129-130.
- Ohto A.A., S. L. Stone and J.J. Harada. (2007)** Genetic control of seed development and seed mass. *In: Seed, Development, and Germination*, Bradford K. and H. Nonogaky. *Annual Plant Reviews*, vol. 27:1-17.
- Rodríguez R, F Narvaez, H Williams (1998)** Calidad de la semilla de líneas e híbridos de sorgo sometidos a intemperismo. *Agron. Mesoam.* 9:45-50.

### CAPITULO III

**SAS Institute (1998)** SAS/STAT Guide for Personal Computers. Version 8.0. Cary, NC, USA. 1128 P.

**SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2010)** Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Diario Oficial, 2da Sección. Protección ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna silvestres -Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio -Lista de especie en riesgo. Diciembre de 2010. México, D.F. 85 p.

**Shemluck, J M, E Estrada, R Nicholson, S W Brobst (2003)** A preliminary study of the taxae chemistry and natural history of the Mexican yew, *Taxus globosa* Schltld. Bol. Soc. Bot. Méx. 72:119-127.

**Soto M, M Sanjurjo, M T Ganzález, D Cruz, F Giral (2000)** El tejo mexicano (*Taxus globosa* Schl.), potencial de su aprovechamiento en taxol. Ciencia *Ergo Sum* 7:277-279.

**Stanton M L (1984)** Development and genetic sources of seed weight variation in *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae). Am. J. Bot. 71:1090-1098.

**Tenorio-Galindo G, D A Rodríguez-Trejo, G F López-Ríos (2008)** Efecto del tamaño y color de la semilla en la germinación de *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Cecropiaceae). Agrociencia 42:585-593.

**Zamudio R S (1992)** Flora del Bajío y regiones adyacentes. Fascículo 9. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán, México 6 p.

**Zavala Ch F (2001)** Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht. en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. I: Población de adultos y algunas características del hábitat. Ciencia *Ergo Sum* 8:169-174.

### CAPITULO III

**Zavala Ch F (2002)** Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht. en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. II: Población de adultos y algunas características del hábitat. *Ciencia Ergo Sum* 8:177-183.

# Capítulo IV

LATENCIA EN SEMILLAS DE *Taxus globosa* SCHLTDL. DE  
DOS REGIONES DE MÉXICO

## 4.1 INTRODUCCIÓN

En todas las plantas es importante la propagación, y ésta adquiere mayor relevancia en especies de interés económico con dificultades para multiplicarse, sobre todo vía sexual (semillas). Identificar las principales condicionantes para la propagación de una especie con problemas de reproducción es fundamental; este es el caso de *Taxus globosa* Schltdl., especie que se encuentra en la lista de especies bajo protección especial por el gobierno mexicano (SEMARNAT, 2010). Este árbol produce una sustancia química conocida como “taxol”, que es utilizado como un fármaco importante en el tratamiento del cáncer (Wani *et al.*, 1971; Shoeb, 2006).

El tejo, como comúnmente le llaman a las plantas del género *Taxus*, se encuentra distribuido esporádicamente, desde la parte templada húmeda del centro de Nuevo León y Tamaulipas, y el oriente del eje Neovolcánico Transversal, el norte de Oaxaca y sur de Chiapas, hasta el sur de Honduras en Centroamérica (Soto *et al.*, 2000; Zavala, 2001; Zavala *et al.*, 2001). Existen pocos estudios en esta especie y no se cultiva (Zavala, 2001, 2002; Soto *et al.*, 2011). Por otro lado, en las regiones donde crece se observa que produce muy poca semilla, lo que constituye otro factor que limita los estudios sobre esta conífera.

La dificultad de germinar semillas de *T. globosa* es parcialmente reportada por Zavala (2001) y Nicholson y Munn, (2003); dichos trabajos refieren tratamientos pre-germinativos con relativo éxito y sin lograr resolver el problema de latencia, condición que presentan las semillas viables y provoca que la germinación no se lleve a cabo a pesar de que existan las condiciones ambientales favorables. Sin embargo, al mismo

tiempo esto le confiere a la especie una “ventaja” para poder germinar a distintos tiempos, permitiendo así su supervivencia en su hábitat natural. Existen varios tipos de latencia, sin embargo la latencia que presenta *T. globosa* no se ha definido, pues el embrión se reporta como inmaduro o pequeño (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2011), y a esta condición Nikolaeva (2001) la clasifica como latencia o dormancia morfológica. Aunado a esto, en otras especies del mismo género se reporta la presencia de inhibidores, condición denominada como latencia o dormancia fisiológica (Le Page-Degivry, 1977; Bewley y Black, 1994; Chien *et al.*, 1998; Baskin y Baskin, 1998, 2004; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006), y que probablemente también *T. globosa* posee. Problemas similares se reportan en algunos géneros de coníferas como *Juniperus*, *Pseudotsuga* y *Abies* (Forbis *et al.*, 2002).

A pesar de que se ha logrado reproducir vegetativamente a *T. globosa* (Muñoz *et al.*, 2009), en trabajos de restauración o mejoramiento genético es necesaria la propagación masiva con alta diversidad genética que se logra con la reproducción sexual, por lo que es deseable lograr una buena germinación de sus semillas, eliminar la latencia así como la heterogeneidad de la emergencia de plántulas, lo que conlleva a un problema económico. Para garantizar una germinación rápida y uniforme, es necesario estudiar los mecanismos que provocan la latencia de la semilla, así como los posibles tratamientos que puedan eliminarla. Nicholson y Munn (2003) aplicaron tratamientos pregerminativos con relativo éxito en *T. globosa* y Ramírez-Sánchez *et al.* (2011) y determinaron que la testa no es una barrera impenetrable para la imbibición; en especies como *Taxus chinensis* var. *mariei* Lemée & Lévillé este problema se ha abordado mediante el cultivo *in vitro* sin obtener resultados favorables (Liu *et al.*, 2011).



Al respecto, Chee (1994) cultivó embriones cigóticos de *T. brevifolia* Nutt., *T. baccata* L., *T. baccata* var. *stricta* L., y de *T. cuspidata* L. logrando germinación de 14, 14, 17 y 11%, respectivamente, e indica que el crecimiento es más rápido por este medio que de manera natural. En esta investigación se estudió de manera sistemática la forma de romper la latencia en semillas de *T. globosa*, mediante la combinación de tratamientos pregerminativos con alternancia en temperatura y promotores del crecimiento (GA<sub>4/7</sub>), monitoreando el efecto de éstos sobre el desarrollo del embrión; además, se cultivaron embriones cigóticos *in vitro*, con el fin de observar si las cubiertas retrasan el desarrollo del embrión, y al mismo tiempo, determinar el tipo de latencia presente y qué tratamientos pregerminativos pueden eliminarla.

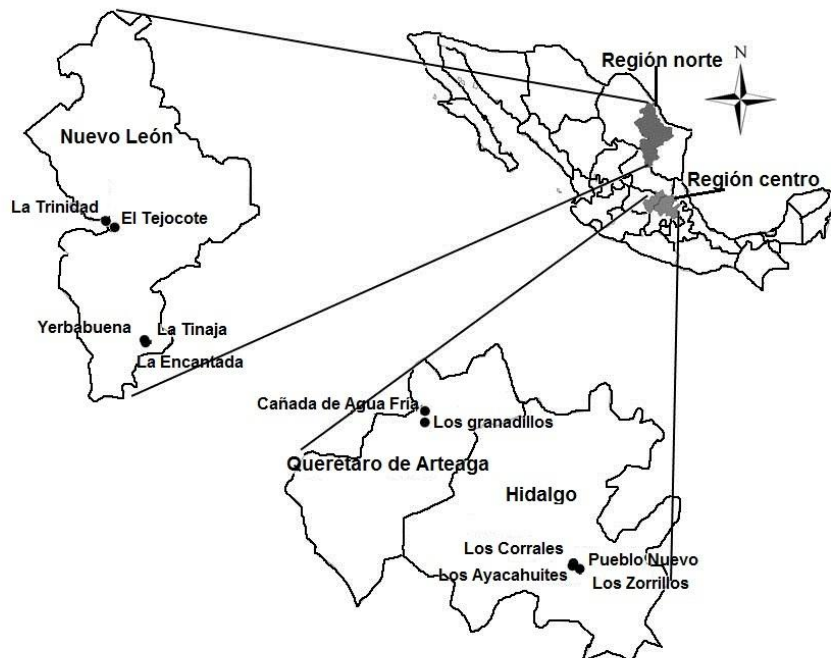
## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Material vegetal

Se recolectó semilla de *T. globosa* en 11 localidades, cinco de ellas en el estado de Nuevo León, México (región Norte), y las otras seis en los estados de Hidalgo y Querétaro, México (región Centro) (Figura 1). La semilla se recolectó en cantidad variable directamente de la copa de los árboles durante los meses de septiembre a noviembre de 2007, cuando el arilo presentaba un color rojo, indicando que estaba madura. Las semillas obtenidas fueron empaquetadas en bolsas de plástico y etiquetadas. Para fines del estudio, se hicieron lotes masales agrupando la semilla por región.

## 4.2.2 Viabilidad

Previo a los tratamientos de germinación, se estimó la viabilidad de las semillas, mediante una prueba de cloruro de tetrazolio al 0.1 % (Sigma®) (ISTA, 2005). Se tomaron dos muestras de 25 semillas por región con dos repeticiones. La misma prueba se repitió al finalizar la evaluación de la germinación con las semillas que no germinaron.



**Figura 4. 1 Sitios de recolección de la semilla de *Taxus globosa* Schtdl.**

### 4.2.3 Tratamientos pre-germinativos

Debido a que los árboles de esta especie producen muy poca semilla, cada tratamiento se evaluó utilizando 25 semillas con cuatro repeticiones (100 semillas en total). Antes de aplicar los tratamientos, las semillas fueron lavadas y desinfectadas con una solución al 1.5 % de hipoclorito de sodio y 25 % de etanol, con una permanencia de 15 min; posteriormente fueron enjuagadas con agua destilada.

Los tratamientos fueron el resultado de la combinación de incubación, estratificación, uso de hormonas y escarificación, basándose en los trabajos de Chien *et al.* (1998), Nicholson y Munn (2003) y Vance y Rudolf (2008); se incluyó también el  $\text{KNO}_3$  como promotor químico de la germinación, que ha sido utilizado tanto en hortalizas como en pináceas (Cárdenas, 2011). La incubación consistió en exponer las semillas por cinco meses a un fotoperiodo de 12 horas con luz fluorescente, proporcionando  $736 \mu\text{mol}$  de fotones/ $\text{m}^2/\text{s}^{-1}$  y un termoperiodo de  $15^\circ\text{C}$  en la noche y  $23^\circ\text{C}$  en el día. La estratificación se hizo a una temperatura de  $3^\circ\text{C}$  por dos meses y en los tratamientos de hormonas se utilizó una solución a 500 ppm de las giberelinas  $\text{GA}_{4/7}$  (Sigma ®) en una concentración de 500 ppm. La escarificación de las semillas se llevó a cabo por tres métodos: 1) por inmersión en 100 mL de nitrógeno líquido ( $\text{N}_2$ ) y extracción inmediata a temperatura ambiente; 2) por inmersión durante 20 minutos en agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) a una temperatura de  $70^\circ\text{C}$ ; y 3) por inmersión durante 4 minutos en una solución de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 98%) durante 4 minutos.

Los 13 tratamientos aplicados fueron los siguientes: 1) testigo; 2) incubación; 3) incubación-estratificación; 4) aplicación de  $\text{GA}_{4/7}$ -incubación; 5) incubación-estratificación- aplicación de  $\text{GA}_{4/7}$ ; 6) incubación-escarificación con  $\text{N}_2$ -aplicación de

KNO<sub>3</sub>; 7) incubación-escarificación con N<sub>2</sub>-aplicación de GA<sub>4/7</sub>; 8) incubación-escarificación con N<sub>2</sub>; 9) incubación-escarificación con H<sub>2</sub>O a 70 °C-aplicación de GA<sub>4/7</sub>; 10) incubación-escarificación con H<sub>2</sub>O a 70 °C; 11) incubación-escarificación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-estratificación-aplicación de GA<sub>4/7</sub>; 12) estratificación; y 13) incubación-aplicación de KNO<sub>3</sub>.

#### 4.2.4 Prueba de germinación

Cada lote de semillas previamente desinfectado se colocó sobre papel sanita® húmedo en cajas de plástico, en una cámara de germinación (Lab Line Instruments Serie 798-001) con el régimen de fotoperiodo y de temperatura indicado anteriormente. La prueba de germinación, incluyendo los pre-tratamientos, duró 13 meses; todos los tratamientos iniciaron al mismo tiempo y en su momento fueron colocados en la cámara de germinación desde el inicio y posteriormente, conforme terminó cada uno de los tratamientos pre-germinativos, se incorporaron a dicha cámara, en donde se mantuvieron hasta el final del ensayo. Las semillas se consideraron germinadas cuando la radícula presentaba una longitud de 2 mm (Chien *et al.*, 1998). Una vez iniciada la germinación se hicieron conteos cada semana. Se determinó el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación (IVG) mediante el Índice de Maguire (1962), y se reportan las medias, así como el tiempo medio para alcanzar la germinación máxima (TM) propuesto por Edmond y Drapala (1958).

#### 4.2.5 Crecimiento embrionario

Al inicio de los tratamientos pre-germinativos y tres meses después se tomó una muestra de semillas de cada uno de ellos para evaluar el crecimiento del embrión mediante un análisis de imágenes no destructivo. Se utilizó un tamaño de muestra de 25 semillas hidratadas por tratamiento, aunque fue necesario eliminarles el agua excedente lo suficiente para que las imágenes salieran nítidas; aún así, las semillas medidas variaron de 16 a 25 por tratamiento. Se tomó una radiografía por tratamiento con un Faxitron X-Ray V.30 proporcionado por la CONAFOR-Jalapa, Ver., con una exposición de 26 kv por 3 seg y con. En la imagen obtenida se midió el largo del embrión (LE) con el software del Faxitron X-Ray V. 30. Posteriormente, las semillas fueron reincorporadas a su tratamiento. Una vez obtenidas las imágenes, solo se analizaron los tratamientos en los que se obtuvo germinación (T1, T3, T4, T5, T6 y T7).

#### 4.2.6 Cultivo In vitro de embriones

Del lote de semillas recolectado para la región norte, por ser el lote más numeroso (en el norte las poblaciones de *Taxus* son más grandes), se reservaron 320 semillas para esta prueba y se dividieron en dos grupos (lixiviado sin estratificar y estratificado) con 4 dosis de GA<sub>3</sub> [0 (Testigo), 1, 100 y 500 ppm], para un total de 40 semillas por tratamiento. Las semillas se desinfectaron con un fungicida (Fungimicin®) y un bactericida (Ridumil®) con dosis de 1 y 3 g, respectivamente, por cada 5 L de agua, dejando reposar las semillas en esta solución por 24 h; posteriormente fueron enjuagadas con agua destilada y colocadas en hipoclorito de sodio al 3 % por 10 min; al terminar, se lavaron tres veces con agua estéril. El grupo de lixiviado sin estratificar

(s Est/L) se sometió al chorro del agua por 24 h; mientras que el grupo de estratificado sin lixiviar (Est/sL) se mantuvo a temperatura constante de 3 °C durante 48 h y un día más a 21 °C; posteriormente todas las semillas fueron disectadas para extraer el embrión y sembradas en medio sólido MS con las diferentes dosis de GA<sub>3</sub>. Se colocaron 10 semillas por frasco de cultivo (unidad experimental) y un total de cuatro frascos (40 semillas) por tratamiento, en un diseño completamente al azar. Se evaluó el porcentaje de embriones germinados (EG) por unidad experimental, considerándolos así una vez que se apreció una coloración verde y un alargamiento de 1 mm; las mediciones se iniciaron a la semana de haber realizado la siembra en medio MS y se continuaron por treinta días.

#### 4.2.7 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje y velocidad de germinación de las semillas, se realizó un análisis de varianza de una vía, debido a que la semilla de una de las regiones geográficas no germinó. Previo al análisis, el porcentaje de germinación se transformó con la función arco seno  $\sqrt{((\%/100))}$ , mientras que las variables IVG y TM se analizaron con los valores originales. El análisis estadístico se realizó con el PROC GLM de SAS V.9 (SAS 1998) y en los casos donde se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Para determinar si hubo diferencias significativas entre tratamientos en el alargamiento del embrión durante los tres primeros meses de incubación, se realizó un

análisis de varianza con el PROC ANOVA, considerando cada embrión como una repetición; en este análisis solo se incluyeron los tratamientos en los que hubo germinación de semillas. Para determinar el crecimiento del embrión se utilizaron los datos de longitud del embrión en las imágenes tomadas en las dos fechas de muestreo (al inicio y a los 3 meses de aplicados los tratamientos). Para comparar las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ). En cuanto al cultivo *in vitro* de embriones, el análisis estadístico para evaluar el efecto de los tratamientos en el porcentaje de germinación consideró un diseño factorial 2x4 en diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones. Al igual que en los casos anteriores, para comparar las medias entre tratamiento se realizó una prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

### **4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.3.1 Viabilidad, tratamientos pre-germinativos y prueba de germinación

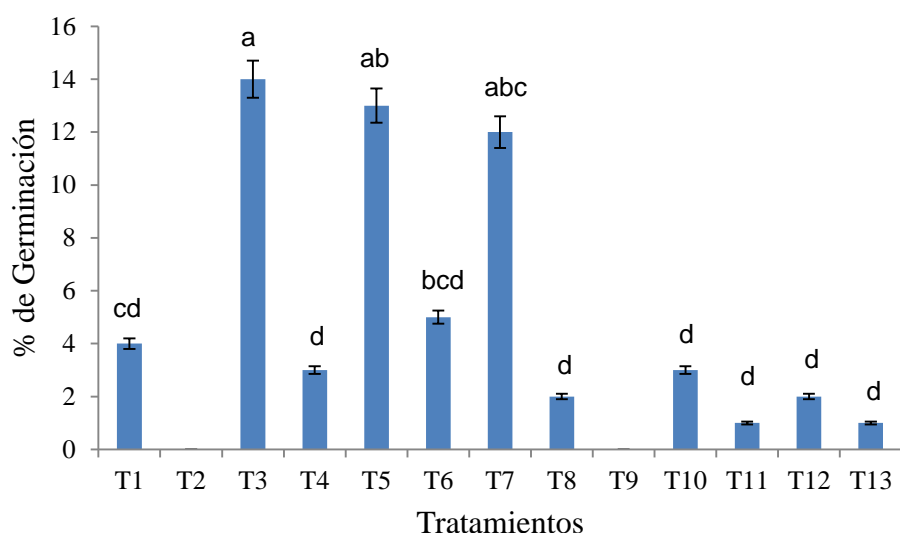
La viabilidad de las semillas fue de 98 % para la región norte y de 60 % para la región centro, y no se encontraron semillas vanas. A pesar de que el estudio duró 13 meses y todas las semillas muestreadas contenían un embrión, ninguna semilla de la región centro germinó. Es posible que el nulo porcentaje de germinación en las semillas de la región central de México se asocie a un nivel alto de endogamia, fenómeno que es común en poblaciones pequeñas y aisladas, características que se observaron al realizar el muestreo en esta zona. En otras especies forestales mexicanas con poblaciones pequeñas y fragmentadas como *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco se han encontrado niveles de diversidad genética reducida (Cruz-Nicolás *et al.*, 2008), alta

proporción de semillas vanas, semilla de menor tamaño, bajos porcentajes de germinación y algunas plantas albinas o mutantes, a diferencia de la zona norte del país (Juárez *et al.*, 2006; Mápula *et al.*, 2007). Ramírez-Sánchez *et al.* (2011) realizaron un estudio previo en el mismo lote de semillas utilizado para esta investigación, y se determinó que las semillas de *T. globosa* del centro del país son 28 % más pequeñas ( $P \leq 0.05$ ) que las de la región norte.

La endogamia también podría afectar el desarrollo del embrión y/o la profundidad de la latencia, ocasionando que la semilla de estas requiera de un tratamiento distinto a los aplicados en el estudio. Sin embargo, para corroborar que la endogamia es la causa principal de la nula germinación de las semillas, es necesario realizar estudios específicos sobre la diversidad genética de estas poblaciones y el nivel de parentesco entre los individuos machos y hembras de las poblaciones. Por otra parte, los resultados obtenidos pueden obedecer simplemente a que las condiciones brindadas a las semillas bajo tratamiento de las poblaciones del centro, no fueron las adecuadas y requieran un tratamiento diferente, o condiciones ambientales (fotoperiodo, temperatura, etc.) distintas, o un mayor tiempo de incubación. García-Aranda (2011) menciona que la especie de *T. globosa* de la región norte es *T. globosa* var. *floridana*, lo que podría indicar un comportamiento ecotípico distinto, con adaptación y requerimientos ambientales diferentes para la óptima germinación de la semilla, por lo que los tratamientos aplicados no ocasionaron resultados similares en la semilla de las dos regiones. Estas posibles diferencias adaptativas dan pauta para continuar la investigación del desarrollo y condiciones de germinación de las semillas de esta región geográfica.



En cuanto a la germinación en semilla de la región norte (Figura 4.2), se encontró que el valor significativamente mayor fue con el tratamiento 3 (incubación-estratificación) aunque no se encontraron diferencias estadísticas entre éste y los tratamientos 5 (incubación-estratificación-AG<sub>4/7</sub>) y 7 (incubación-escarificación con N<sub>2</sub>-AG<sub>4/7</sub>).



**Figura 4. 2 Porcentaje de germinación en semillas de *T. globosa* Schldl. procedente de la zona norte de México. Barras verticales, representan el error estándar (ES). Diferentes letras indican diferencias ( $P \leq 0.05$ ).**

Esos resultados indican que la incubación-estratificación aplicada promovió que el embrión madurara, alcanzando el tamaño adecuado para poder germinar (Le Page-Degivri, 1973; Camacho-Morfín, 1994; Nonogaki y Bradford, 2007). Ramírez-Sánchez *et al.* (2011) reportan que en semilla recién recolectada, la proporción del embrión en relación al volumen total de la semilla es del 4 % para la semilla del norte y del 3 % para la semilla del centro, y en promedio una longitud de 1.92 y 1.72 mm

respectivamente; en esta investigación se encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en ambos casos, y son los valores más pequeños reportados para el género *Taxus* (en promedio ocupa el 10 % del volumen de la semilla) (Forbis *et al.*, 2002); este tamaño de embrión tan reducido le impide a las semillas germinar en cantidades mayores. Aunado a lo anterior, se reporta la presencia de inhibidores del crecimiento en la semilla de otras especies del género (Le Page-Degivri, 1973; Chien *et al.*, 1998); aunque en este estudio no se contempló la detección de estas sustancias, se esperaría que algunos de los tratamientos en los que se adicionó GA o se sometió a estratificación, ocasionaran una reducción de ellas, como registra Chien *et al.* (1998), en donde observó un decremento en la concentración de ácido absísico (ABA) después de someter a las semillas de *Taxus mairei* a una estratificación a 5°C durante 12 meses (de 8,888 a 536 pg por semilla).

Con base en lo anterior, se decidió combinar tratamientos y observar las respuestas, por lo que se probó el tratamiento (5) de incubación-estratificación-aplicación de GA<sub>4/7</sub>, que ocasionó un porcentaje de germinación (13%) como el del tratamiento (7) incubación-escarificación con N<sub>2</sub> -aplicación de GA<sub>4/7</sub> (12%). Se esperaba que la adición de la giberelina elevara el porcentaje de germinación, pero no ocurrió de esa manera; por lo anterior, se sugiere explorar la posibilidad de aplicar el GA antes de la estratificación, con el fin de que la semilla esté expuesta a la giberelina por más tiempo. En relación con el tratamiento (7), es posible que la escarificación con el nitrógeno líquido haya ocasionado rupturas en la testa de la semilla (García *et al.*, 2003) y al adicionar la giberelina se logró la germinación (12%) similar a la observada en el tratamiento 3 (Incubación-estratificación) (14%).

**Cuadro 4. 1 Comparación de medias del Índice de velocidad de germinación (IVG) en semillas de *Taxus globosa* Schltl. sometidas a diferentes tratamientos pre-germinativos.**

| Tratamiento | Descripción   | IVG <sup>†</sup> |
|-------------|---|------------------|
| 1           | Testigo   | 0.0035 bc        |
| 2           | Incubación  | 0.0000 c         |
| 3           | Incubación-estratificación  | 0.0113 a         |
| 4           | Aplicación de GA <sub>4/7</sub> -incubación   | 0.0027 c         |
| 5           | Aplicación de GA <sub>4/7</sub> -incubación   | 0.0112 a         |
| 6           | Incubación-escarificación con N <sub>2</sub> -aplicación de KNO <sub>3</sub>                    | 0.0042 abc       |
| 7           | Incubación-escarificación con N <sub>2</sub> -aplicación de GA <sub>4/7</sub>                   | 0.0107 ab        |
| 8           | Incubación-escarificación con N <sub>2</sub>  | 0.0016 c         |
| 9           | Incubación-escarificación con H <sub>2</sub> O-aplicación de GA <sub>4/7</sub>                  | 0.0000 c         |
| 10          | Incubación-escarificación con H <sub>2</sub> O  | 0.0026 c         |
| 11          | Incubación-escarificación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -estratificación-GA <sub>4/7</sub> | 0.0008 c         |
| 12          | Estratificación   | 0.0017 c         |
| 13          | Incubación-aplicación de KNO <sub>3</sub> .   | 0.0009 c         |

Valores con la misma letra dentro de la columna no difieren estadísticamente, Tukey (P ≤ 0.05).

†: Índice de Maguire, 1968.

En cuanto al índice de velocidad germinativa (IVG) (Cuadro 4.1), los valores mayores se obtuvieron a la par con los porcentajes de germinación altos, observándose diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre estos; con el contraste de que en el tratamiento 7 (Incubación-escarificación con  $N_2$ - aplicación de  $GA_{4/7}$ ) se alcanzó una velocidad de germinación mayor que en el tratamiento 5 (incubación-estratificación-aplicación de  $GA_{4/7}$ ), presumiblemente por la escarificación con nitrógeno líquido (shock térmico), ya que la temperatura desciende drásticamente y fragmenta la testa, permitiéndole germinar, como lo mencionan García *et al*, (2003). El tiempo medio para alcanzar la germinación máxima (TM) fue de 266 días (aproximadamente 9 meses) para el tratamiento 3 (incubación-estratificación), de 220 días (aproximadamente 7 meses) para el tratamiento 5 (incubación-estratificación-aplicación de  $GA_{4/7}$ ) y de 250 días (aproximadamente 8 meses) para el tratamiento 7 (Incubación-escarificación con  $N_2$ - aplicación de  $GA_{4/7}$ ).

A pesar de que para la especie se han reportado valores de germinación relativamente bajos, en este estudio se logró reducir el tiempo de germinación a siete meses pues casi de manera inmediata al salir de la estratificación, en el caso del tratamiento 5 (Incubación-estratificación con  $GA_{4/7}$ ) inició la emergencia radicular, a pesar de esto, se requiere más investigación, para reducir los tiempos a 7 meses. En el caso de Chien *et al*. (1998) obtuvieron 81 % de germinación en *Taxus mairei* después de 8 y 10 meses de exponer la semilla a tratamientos de incubación-estratificación. Por su parte, y aunque no se proporcionan detalles precisos de la metodología experimental y de las condiciones de incubación, Nicholson y Munn (2003) reportan un

34% de germinación en una muestra de 50 semillas de *T. globosa* después de nueve meses de incubación usando temperaturas alternas.

El tiempo medio para alcanzar la germinación máxima (TM) fue de 266 días para el tratamiento 3 (incubación-estratificación), de 220 días para el tratamiento 5 (incubación-estratificación-aplicación de GA<sub>4/7</sub>) y de 250 días para el tratamiento 7 (Incubación-escarificación con N<sub>2</sub>-aplicación de GA<sub>4/7</sub>) sin que existieran diferencias entre ningún tratamiento para esta variable. Los tratamientos anteriores son los que obtuvieron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al resto; a dos de ellos, el 5 y 7 se les aplicó giberelina en forma exógena, como un promotor efectivo del rompimiento de la latencia y de la germinación en *T. globosa*, sin obtener altos porcentajes de germinación.

Los resultados para el testigo (Figura 4.2) muestran que de manera natural el embrión va rompiendo las barreras metabólicas y fisiológicas impuestas, en un tiempo relativamente prolongado que rebasa los ocho meses; al momento de la recolección de las semillas éstas parecen estar “maduras”, pues muestran el arilo en color rojo; sin embargo, esto no necesariamente es un indicativo de que la semilla se encuentre fisiológicamente madura y con la capacidad para germinar. A pesar de que se obtuvieron bajos porcentajes de germinación, para la especie son significativos, pues representan una oportunidad de supervivencia. La germinación escalonada de manera natural, da la oportunidad a las especies de lograr una mayor supervivencia a través del tiempo, promoviendo la formación de un banco de semillas en el suelo y

previniendo la germinación en condiciones no óptimas para la especie (Nikolaeva, 2001).

#### 4.3.2 Crecimiento embrionario

El crecimiento embrionario (LE) fue monitoreado con una prueba no destructiva, aunque no en todos los casos se pudo observar claramente el embrión (Figura 4.3); en los casos en que éste fue visto nítidamente, se tomaron las mediciones y lo anterior se relacionó con el resultado obtenido en la germinación, por lo que solo se muestran los tratamientos que tuvieron diferencias significativas en germinación. Se obtuvieron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos, encontrando al tratamiento 3 (incubación-estratificación) como el que obtuvo un mayor alargamiento en sus embriones (Figura 4.4), lo que explica parcialmente la mayor germinación en dicho tratamiento; sin embargo, la menor tasa de alargamiento la obtuvo el testigo y también mostró germinación aunque baja, lo que indica que el embrión, una vez alcanzado el tamaño o maduración necesarias para germinar, lo hará teniendo las condiciones óptimas. El mayor alargamiento se asoció con un mayor porcentaje de germinación; se observó que la incubación es determinante para que se inicie el desarrollo embrionario, pues es un embrión pequeño y las cubiertas que lo protegen le impiden desarrollarse libremente, por lo que su crecimiento es relativamente lento.

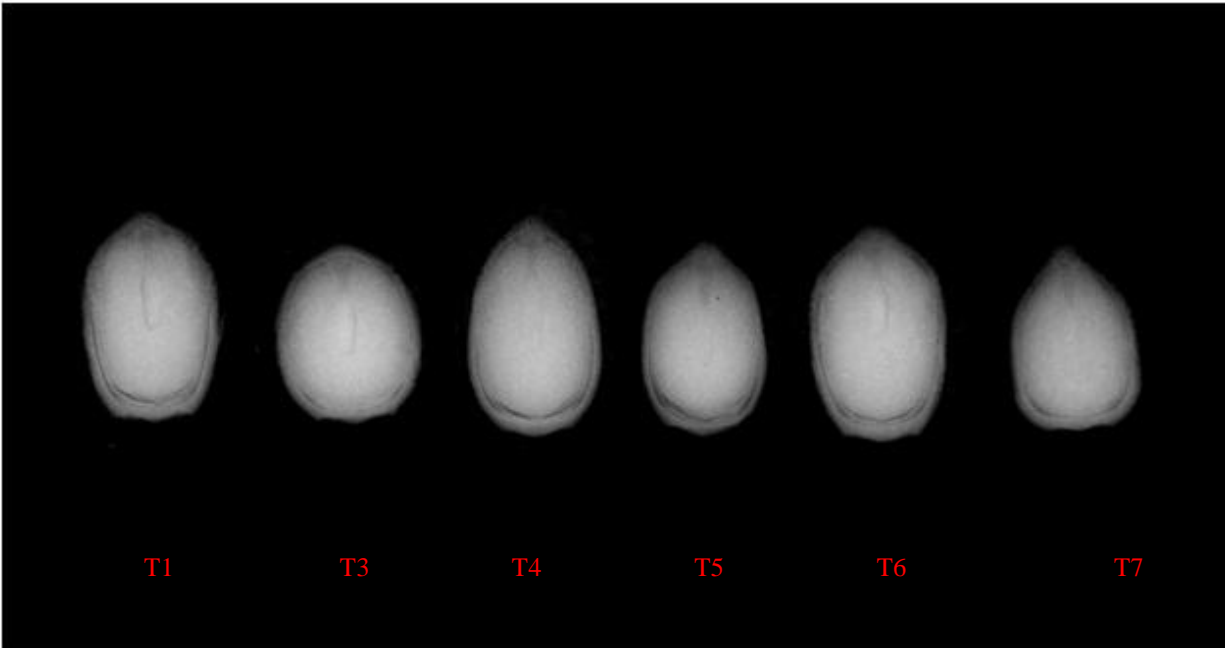


Figura 4. 3 . Semillas de *Taxus globosa* sometidos a tratamientos pregerminativos, mostrando embriones a los tres meses de incubación. Imágenes tomadas mediante rayos X con Faxitron X-Ray V.30 proporcionado por el CONAFOR-Jalapa, Ver.

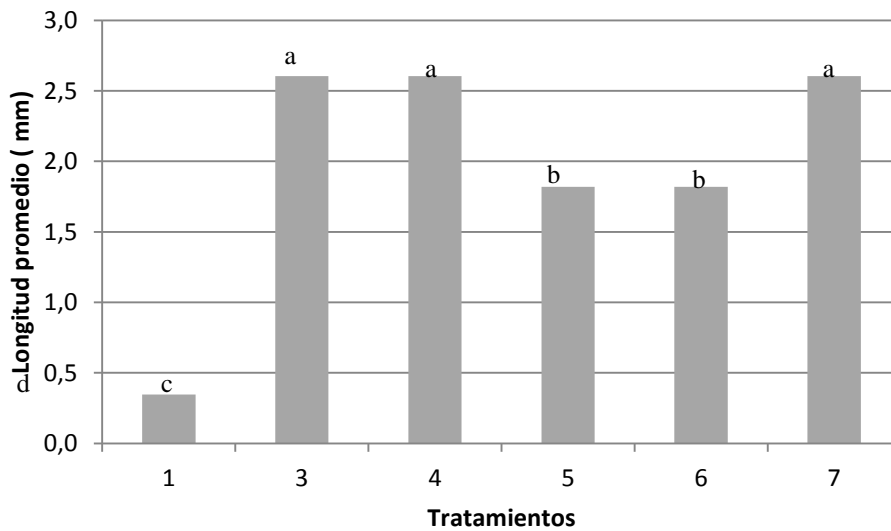


Figura 4. 4 Alargamiento promedio de los embriones después de tres meses de incubación en diferentes tratamientos pre-germinativos.

4.3.3 Cultivo *in vitro* de embriones

Como ya se había mencionado, esta prueba solo se aplicó al lote de semillas de la región geográfica del norte. La respuesta en medio de cultivo *in vitro* se observó a las dos semanas de haberse realizado la siembra y hasta los 30 días. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos de estratificación [estratificación sin lixiviado (Est/sL) y lixiviado sin estratificación (L/sEst)]; sin embargo si hubo diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre las dosis de GA<sub>3</sub> (Cuadro 4.2); la dosis de 1 ppm de GA<sub>3</sub> ocasionó un mayor porcentaje de germinación (27.5 % en promedio de los dos tratamientos de estratificación/lixivación).

**Cuadro 4. 2 Porcentaje de germinación en embriones cultivados *in vitro* de *Taxus globosa* Schltdl. estratificados., estratificados sin lixiviar (Est/sL) y lixiviados sin estratificar con lixiviado (s Est/L).**

| Variable       | Sin AG <sub>3</sub> |        | 1 ppm AG <sub>3</sub> |        | 50 ppm AG <sub>3</sub> |         | 100 AG <sub>3</sub> |        |
|----------------|---------------------|--------|-----------------------|--------|------------------------|---------|---------------------|--------|
|                | Est/sL              | sEst/L | Est/sL                | sEst/L | Est/sL                 | sEst/L  | Est/sL              | sEst/L |
| Germ (%)       | 0                   | 0      | 30 a                  | 25 ab  | 17.5 ab                | 12.5 ab | 15 ab               | 7.5 b  |
| Error estándar | 0                   | 0      | 0.408                 | 0.866  | 0.479                  | 0.629   | 0.866               | 0.479  |

Valores promedio dentro de la hilera, con diferente letra indican diferencias entre ellos ( $p \leq 0.05$ ).

Se encontró que la combinación de una menor cantidad de GA<sub>3</sub> y tratamiento de estratificación, pueden tener un efecto positivo en la germinación *in vitro* de embriones, ya que como se ha citado anteriormente, la estratificación ayuda a bajar los niveles de



ácido absícico, y aunado a que el embrión recibe la dosis directa de GA<sub>3</sub>, se logra una respuesta más satisfactoria.

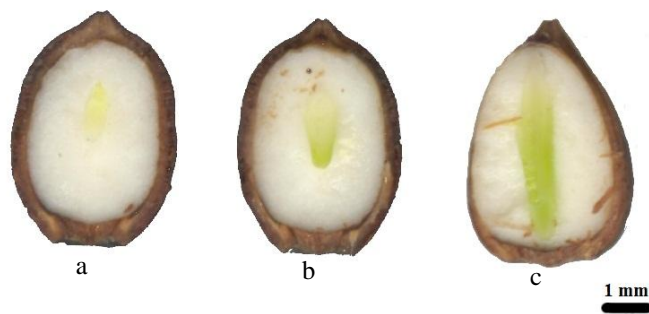
#### 4.3.4 Implicaciones

Baskin & Baskin (2004) mencionan que existen cinco tipos de latencia; el tipo que corresponde a la semilla de *T. globosa* es el de latencia morfológica, por tener un embrión pequeño y/o indiferenciado; sin embargo, los embriones con este tipo de latencia no tienen latencia fisiológica y la semilla de *Taxus globosa* sí la presentó, por lo que esta especie cae en la clasificación de “latencia morfo-fisiológica”, en la que, aunado al embrión pequeño o indiferenciado, se presenta un componente fisiológico (ABA) que provoca la latencia. Por lo tanto, en este caso es necesaria la aplicación de tratamientos pre-germinativos para poder eliminar la latencia fisiológica. Baskin & Baskin (2004) clasifican a su vez a la latencia morfo-fisiológica en ocho tipos, y a *T. globosa* le corresponde el tipo de intermedia simple, pues necesita de incubación (el periodo en el cual el embrión se desarrolla) y estratificación con la aplicación de GA para promover la germinación. A este tipo de latencia, Nikolaeva (2001) le denomina latencia endógena, y también maneja la profundidad de estas, concordando con Baskin y Baskin (2004).

En otras investigaciones con distintas especies de *Taxus* (Chien *et al.*, 1998; Zarek, 2007; Hosseini, *et al.*, 2011), se ha observado que el cultivo *in vitro* resuelve el problema de la latencia, pues al parecer otras especies de *Taxus* presentan testa impermeable, lo que también impide la germinación, no así en el caso de *T. globosa*.

Sin embargo, al retirar la testa y el megagametofito, se obtuvo germinación de embriones *in vitro*, observándose que en ellas radica el mecanismo para entrar en latencia. Se observó que en *T. globosa* el embrión debe crecer hasta casi ocupar la longitud completa de la semilla para poder germinar en una prueba normal de germinación, como la aplicada para los tratamientos pre-germinativos, durante la primera etapa de esta investigación (Figura 4.5), no así en cultivo *in vitro*, lo que explica en parte la rápida germinación en estas condiciones.

Bajo este tipo de cultivo la etapa crucial es la de aclimatación de las plántulas a su medio habitual, sin embargo Hosseini *et al.* (2011) han logrado avanzar proporcionando otra línea de investigación, en donde se agrega una etapa de cultivo en hidroponía para alargar la vida de las plántulas al término del periodo de cultivo *in vitro*.



**Figura 4.5. Semilla disectada mostrando embriones en el tratamiento 3 (incubación-estratificación), (a) inicio del tratamiento, 0 días, (b)180 días y (c) a 270 días con tratamiento pre-germinativo.**

#### CAPITULO IV

En esta investigación se evaluó la adición de GA<sub>4/7</sub> y GA<sub>3</sub> en diferentes etapas del ensayo, encontrando que los dos tipos de GA tienen respuestas favorables; sin embargo, los resultados de estos ensayos deben dar pauta para realizar más investigación con ambas hormonas y lograr estandarizar un método para una buena germinación ya sea *in vitro* o de manera normal. En el caso de *T. baccata* no fue necesario agregar GA; el medio MS fue suficiente para lograr la germinación de embriones bajo cultivo *in vitro* (Zarek, 2007; Hosseini *et al.*, 2011).

En cuanto a la regionalización de la semilla (Norte y Centro) es necesario continuar investigando el estado actual de las poblaciones, sobre todo las del Centro, pues el hecho de no lograr la germinación de las semillas colectadas en ellas, es un indicativo de que hay algunos problemas con el proceso reproductivo en dichas poblaciones que podrían aumentar las amenazas de permanencia que ya enfrentan en su hábitat natural o bien que en efecto se ha dado una especiación como lo menciona García-Aranda *et al.* (2011); de ser así, se debe documentar ampliamente este hecho.

#### 4.4 CONCLUSIONES

La latencia que presenta la semilla de *T. globosa* es de tipo morfo-fisiológica intermedia. El tratamiento de incubación a 23°C temperatura por 5 meses seguida de un periodo de estratificación a 3°C durante 2 meses es el que dio mejores resultados, con un 14 % de germinación en las semillas de *T. globosa* de la región norte. Estos tratamientos deben complementarse con la aplicación de giberelinas GA<sub>4/7</sub> al inicio del periodo de estratificación para obtener un mayor porcentaje de germinación en semillas completas.

El cultivo *in vitro* de embriones de *T. globosa* resuelve el problema de latencia en la semilla; sin embargo, para que este método sea útil en la práctica, es necesario resolver también el problema de aclimatación de las plántulas al moverlas de las condiciones *in vitro* a las condiciones de crecimiento en el vivero o invernadero.

#### 4.5 LITERATURA CITADA

- Baskin, C. C., and J. M. Baskin. (1998)** Seeds. Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. San Diego, Academic Press. 477 p.
- Baskin, J. M, and C. C. Baskin. (2004)** A classification system for seed dormancy. Seed Science Research 14: 1-16.
- Bewley, J.D., and M. Black. (1994)** Seeds Physiology Germination. 2<sup>a</sup> ed. Plenum Press. New York. 445 p.
- Camacho-Morfín, F. (1994)** Dormición de Semillas: Causas y Tratamientos. Ed. Trillas. México. 125 p.
- Cárdenas, H. F. J. (2011)** Morfología y tratamientos pregerminativos de semillas de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss). Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. 92 pp.
- Chee, P. P. (1994)** Organogenesis in *Taxus brevifolia* tissue cultures. Plant Cell Reports 14(9): 560-565.
- Chien, C. T., L. Huang, and T. P. Lin. (1998)** Changes in ultrastructure and abscisic acid level and response to applied gibberellins in *Taxus mairei* seeds treated with warm and cold stratification. Annals of Botany 81: 41-47.
- Cruz-Nicolás, J., J. J. Vargas-Hernández, P. Ramírez-Vallejo y J. López-Upton. (2008)** Patrón de cruzamiento en poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, en México. Agrociencia 42: 367-378.
- Edmond, J. B. and W. J. Drapala. (1958)** The effect of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. Proceeding of the American Society for Horticultural Science 71: 738-34.

- Finch-Savage, W. E. and G. Leubner-Metzger. (2006)** Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171(3): 503-23.
- Forbis, T. A., S. K Floyd, and, A. Queiroz. (2002)** The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: implications for the evolution of seed dormancy. *Evolution* 56: 2112–2125.
- García-Aranda, M.A., A. E. Estrada-Castillón, E. Jurado-Ibarra y D.U. González-Uribe. (2011)** Análisis de once poblaciones naturales de *Taxus globosa* en la Sierra Madre Oriental. *Madera y Bosque*. 17:93-104.
- García de los S. G. y Steiner J. J. (2003)** Diversidad genética en *Lotus corniculatus* determinada por caracteres morfológicos y RAPDs. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26 (3):173-181.
- Hosseini, T.A, M. Shariati, M. R. Mofid and M. K. Nekui. (2011)** Rapid germination and development of *Taxus baccata* L. by in vitro embryo culture and hydroponic growth of seedlings. *In Vitro Cellular & Development Biology – Plant*. 47:561–568.
- ISTA. (2005)** Handbook on tetrazolium testing. International Seed Testing Association. Zurich. Switzerland. 100 p.
- Juárez, A. A., J. López-Upton, J. J. Vargas-Hernández, y C. Sáenz-Romero. (2006)** Variación geográfica en la germinación inicial de plántulas de *Pseudotsuga menziesii* de México. *Agrociencia* 40:783-792.
- Le Page-Degivry, M. T. (1973)** Etude en cultura *in vitro* de la dormance embryonnaire chez *Taxus baccata* L. *Biología Plantarum* 15 (4):264-269.

- Le Page-Degivry, M.T. (1977)** Inhibiteurs non acides et dormance embryonnaire chez *Taxus baccata*. *Physiology Plantarum* 41:85-88.
- Liu, D., H.L. Yu, F.L. Li, and H.H. Guo. (2011)** An analysis of dormancy and dormancy release in *Taxus chinensis* var. *mairei* seeds. *Seed Science & Technology* 39: 29-43.
- Maguire, J. D. (1962)** Speed of germination—aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science, Madison*. 2:176-177.
- Mápula-Larreta, M., J. López-Upton, J. J Vargas-Hernández y A. Hernández-Livera. (2007)** Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico. *Biodiversity and Conservation* 16:727–742.
- Muñoz-Gutiérrez, L., J. J. Vargas-Hernández, J. López-Upton and M. Soto-Hernández. (2009)** Effect of cutting age and substrate temperature on rooting of *Taxus globosa*. *New Forests* 38 (1-2): 187-196.
- Nicholson, R., y D. X. Munn. (2003)** Observations on the propagation of *Taxus globosa* Schldl. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 72:129-130.
- Nikolaeva, M. G. (2001)** An update of Nikolaeva's seed dormancy classification system and its relevance to the ecology, physiology, biogeography and phylogenetic relationships of seed dormancy and germination. *Botanicheskii Zhurnal* 86(12):1-14.
- Nonogaki, H. and J. K. Bradford. (2007)** *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell Publishing Ltd. Australia. 329 p.
- Ramírez-Sánchez, S. E., J. López-Upton, G. García de los Santos., J. J. Vargas-Hernández, A. Hernández-Livera, y O. J. Ayala-Garay. (2011)** Variación

- morfológica de semillas de *Taxus globosa* Schltl. provenientes de dos regiones geográficas de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 3(2):93-99.
- SAS. (1998)** SAS User's Guide: Statistics. Release 6.03. SAS Institute, Inc. Cary. 1028 p.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT. (2010)** Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Diario Oficial, 2da Sección. Protección ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna silvestres -Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio -Lista de especie en riesgo. Diciembre de 2010. México, D.F. 85 p.
- Shoeb, M. (2006)** Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh Journal Pharmacology* 1:35-41.
- Soto, M., M. Sanjurjo, M. T. González, D. Cruz y F. Giral. (2000)** El Tejo mexicano (*Taxus globosa* Schl.) potencial de su aprovechamiento en taxol. *Ciencia Ergo Sum* 7:277-279.
- Soto-Hernández, M., J. López Upton, J. J. Vargas-Hernández, L. Muñoz-Gutiérrez y R. San Miguel. (2011)** Estado de conservación de *Taxus globosa* en México. *Spanish Journal of Rural Development II* (2 especial): 61-68.
- Vance, N. C. and P. O. Rudolf. (2008)** *Taxus* L. yew. In: F. T. Bonner, R. G. Nisley (eds.). *Woody Plant Seed Manual* (revised edition). USDA, For. Serv., Agriculture Handbook 727. The Woody Plant Seed Manual. pp: 489-524.
- Wani, M. C., H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail. (1971)** Plant anti-tumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel anti-leukemic



and anti-tumor agent from *Taxus brevifolia*. Journal American Chemical Society. 93: 2325-27.

**Zarek M.(2007)** A practical method for overcoming the dormancy of *Taxus baccata* isolated embryos under in vitro conditions. *In vitro Cellular & Development Biology - Plant* 43:623–630

**Zavala Ch., F. (2001)** Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht. en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. I: Población de adultos y algunas características del hábitat. *Ciencia Ergo Sum* 8: 166-174.

**Zavala Ch., F. (2002)** Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht. en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. II: Población de juveniles y algunos datos de semillas. *Ciencia Ergo Sum* 9:177-183.

**Zavala, Ch. F., M. Soto-Hernández y M. T. Rodríguez-González. (2001)** El Romerillo (*Taxus globosa* Schltld.): Biología, dificultades y perspectivas de su uso. Revista Chapingo. Serie Horticultura 7: 77-94.

# Capítulo V

## 5.1 DISCUSIÓN GENERAL

Las semillas son el más importante y con frecuencia el único medio de reproducción y dispersión de las plantas, ya que son responsables de la permanencia de la vegetación en la tierra. Las semillas tienen la capacidad para permanecer en estado de latencia, mecanismo que evita la rápida y homogénea emergencia de plántulas, promueve la formación de un banco de semillas en el suelo, y favorece la conservación de la variabilidad genética (Nikolaeva, 2001); sin embargo, la latencia en semillas de plantas de importancia económica provoca grandes problemas al complicar su producción en sistemas cultivados. La semilla de *Taxus globosa* Schltdl. presenta latencia, y por las evidencias bibliográficas y las experimentales obtenidas en la presente investigación, se descarta la posibilidad de latencia impuesta por las cubiertas, pues la imbibición ocurre de manera normal (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2011); lo contrario ocurre en *T. baccata*, pues Hosseini *et al.* (2011) reportaron que la testa es impermeable al agua, lo que le da a *T. globosa* particularidad en los tratamientos que se apliquen.

La latencia que presenta la semilla de *T. globosa* es más bien de tipo morfológico, debido a que el embrión es muy pequeño (4% del volumen total) y no tiene el potencial para germinar; necesita periodos largos y cálidos de incubación para que termine su desarrollo; esta semilla también presenta latencia fisiológica porque el metabolismo de la semilla produce ABA que impide la germinación. La caracterización como latencia de tipo intermedio se refiere a que dentro del sistema de clasificación de Baskin and Baskin (2004), este tipo de latencia requiere de estratificación por un periodo

relativamente largo, que va de 2 a 3 meses (0 - 3°C), y la adición de GA no reemplaza la estratificación, pero promueve la germinación después de someter las semillas a estratificación; además, en las semillas de otras especies de *Taxus* se ha reportado la presencia de ácido abscísico (Chien et al., 1998; Le Page-Degivry, 1973, 9177). En este caso se tiene una latencia combinada, pues presenta embrión pequeño con presencia de inhibidores y requiere de tratamientos pre-germinativos para poder romperla.

Para esta investigación se tomaron muestras de semillas de dos zonas de la República Mexicana. La zona norte que comprendió cinco poblaciones naturales en el estado de Nuevo León, con una amplitud elevacional de los 1360 hasta los 2580 m, y la zona centro que comprendió seis poblaciones naturales de los estados de Querétaro e Hidalgo, con un intervalo altitudinal de los 2400 a los 2630 m. En esta última zona se observó que las poblaciones son pequeñas (menor a 100 individuos) y discontinuas. La discontinuidad de estas poblaciones puede estar indicando fragmentación en ellas, tendientes a un comportamiento de metapoblaciones (Mosseler, 1995). Esto apunta a cierto nivel de aislamiento de las mismas y por lo tanto, a un limitado intercambio genético entre ellas, lo que conlleva a un posible problema de endogamia, que podría explicar el menor tamaño y peso de las semillas, así como la reducida capacidad germinativa (de hecho, la semilla de las poblaciones de la región centro de México presentó 0% de germinación), encontrados en el presente estudio. Esta situación coincide con los resultados que se han encontrado en otras especies de coníferas con poblaciones pequeñas y aisladas entre sí (O'Connell et al., 2006; Mápula-Larreta et al., 2007), En la región sur, *T. globosa* produce relativamente poca semilla, y la viabilidad

obtenida en este estudio fue del 60%. Durante la recolección de las semillas se observaron excretas conteniendo semillas enteras de *T. globosa*, lo cual indica que algunas de ellas pasan por el tracto digestivo de animales y solo se consume el arilo; en otros casos se observaron semillas rotas y vacías, presumiblemente por aves o pequeños roedores que se alimentan de ellas, contribuyendo a reducir el número de semillas disponibles en el banco de semillas. Las poblaciones de *T. globosa*, como de otras especies de *Taxus* se reducen debido a que aves y pequeños mamíferos se alimentan de las semillas (García *et al.*, 2005; Vance *et al.*, 2008), lo cual también se observó durante la colecta de la semilla para la presente investigación.

Debido a los problemas que presentan las semillas de la zona centro, los tratamientos aplicados para romper la latencia fueron insuficientes, pues por su condición, posiblemente causada por efectos de la endogamia, la germinación de las semillas se dificulta, lo cual indica que se debe realizar investigación en torno a la posible poca variabilidad genética en las poblaciones y su efecto en el comportamiento germinativo de las semillas que allí se producen.

Por otro lado, se observó que las poblaciones de tejo en el norte son de mayor tamaño, continuas y con árboles de mayor porte, lo que también confirma García-Aranda *et al.*, (2011); las semillas obtenidas en esta región resultaron de mayor tamaño y peso (28%) que las del centro, por lo que la aplicación de tratamientos para romper la latencia produjo mejores resultados en ellas (hasta un 14%), aunque no los que se esperaban, por lo que es necesario realizar más investigación en este aspecto.

El tratamiento pre-germinativo que mejor comportamiento presentó fue el que incluyó un periodo de incubación en temperaturas de 23 °C por 5 meses seguido de un periodo de estratificación a 3°C por 2 meses (T3); con esta combinación de condiciones ambientales se promovió el crecimiento del embrión en la primera parte (incubación), y en la segunda se redujo el nivel de ABA (estratificación), lo que permitió que el nivel de giberelinas aumentara y provocara la germinación de las semillas.

En los tratamientos en los que se utilizó como primera fase la incubación, se obtuvieron resultados similares entre ellos con solo pequeñas variantes, como la adición de GA al final de la estratificación, y aunque se esperaba un porcentaje mayor de germinación, este resultado posiblemente podría mejorarse al incrementar el tiempo de exposición de la semillas al GA, o modificar el periodo y condiciones de incubación así como la aplicación de otras temperaturas, pues por ser una especie con particularidades y poco estudiada, las posibilidades de investigación son amplias.

De manera general se observó que la estratificación fue necesaria para romper la latencia y en los casos en que ésta se sustituyó con la escarificación con nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>), el descenso brusco de temperatura coadyuvó a fragmentar la testa y se observó una rápida emergencia radicular casi de manera inmediata después de aplicar el N líquido, lo que no ocurrió al aplicar similar tratamiento sin escarificación de la testa con N líquido. La giberelina debe adicionarse con la intención de que la semilla absorba la mayor cantidad de ella, ya que puede aplicarse como un complemento a la escarificación con nitrógeno líquido, esto cuando la germinación es en la semilla completa.

En el cultivo *in vitro* de embriones se observó mayor germinación con la adición de GA<sub>3</sub> (1 ppm), por lo que este método puede reducir el tiempo de los tratamientos pre-germinativos; en *T. baccata* no fue necesario la adición de ningún promotor, ya que se obtuvo buena germinación (62%) en medio MS adicionado con carbón activado y en oscuridad (Zarek, 2007), En otra investigación, Hosseini *et al.* (2011) cultivaron embriones de *T. baccata in vitro* obteniendo germinaciones altas (100%) en medio MS, y continuó con un periodo de aclimatación en cultivo, hidropónico, encontrando que la combinación de ambos métodos es favorable para acortar el tiempo de germinación en semillas de especies como *T. baccata*; sin embargo, habría que superar el periodo de aclimatación de hidroponia a suelo al usar este tipo de técnicas de propagación de plantas.

## 5.2 CONCLUSIONES GENERALES

Las diferencias significativas encontradas entre regiones geográficas en los caracteres morfológicos y físicos de la semilla sugieren una mayor calidad de las semillas de *Taxus globosa* recolectadas en la región norte. Las cubiertas seminales no representan un impedimento para la entrada de agua en las semillas de *Taxus globosa* de las dos regiones muestreadas. A pesar de los diferentes tratamientos pre-germinativos utilizados, no fue posible hacer germinar la semilla obtenida de la región centro; en cambio, en la semilla de la región norte sí hubo un efecto positivo de algunos tratamientos sobre la germinación de las semillas.

Con base en el comportamiento de los tratamientos aplicados, se concluye que en las semillas de la zona norte se deben aplicar tratamientos pre-germinativos combinados, como la incubación y estratificación.

Por las características de la especie y el poco trabajo realizado en la misma, éste se considera como un estudio que permitirá reorientar la investigación en torno a la modificación de algunos factores, en aquellos tratamientos donde se usan periodos de incubación y/o de estratificación para generar métodos más efectivos que permitan eliminar la latencia en la semilla de *Taxus globosa*.



### 5.3 LITERATURA CITADA

**Baskin, J. M, and C. C. Baskin. (2004)** A classification system for seed dormancy. Seed Science Research 14: 1-16.

**García, D., J. R. Obeso and I. Martínez. (2005)** Rodent seed predation promotes differential recruitment among bird-dispersed trees in temperate secondary forests. Oecologia. 144: 435–446.

**García-Aranda, M.A., A. E. Estrada-Castillón, E. Jurado-Ibarra y D.U. González-Uribe. (2011)** Análisis de once poblaciones naturales de *Taxus globosa* en la Sierra Madre Oriental. Madera y Bosque. 17:93-104.

**Hosseini, T.A., M. Shariati, M. R. Mofid and M. K. Nekui. (2011)** Rapid germination and development of *Taxus baccata* L. by in vitro embryo culture and hydroponic growth of seedlings. *In Vitro Cellular & Development Biology – Plant.* 47:561–568.

**Mápula-Larreta, M., J. López-Upton, J. J Vargas-Hernández y A. Hernández-Livera. (2007)** Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico. Biodiversity and Conservation 16:727–742.

**Mosseler, A. (1995)** Minimum viable population size and the conservation of forest genetics resources. *In: Tree Improvement: Applied Research and Technology Transfer.* Puri, S. (Ed.). Science Publishers. U.S.A. 191-205 pp.

**Nikolaeva, M. G. (2001)** An update of Nikolaeva's seed dormancy classification system and its relevance to the ecology, physiology, biogeography and phylogenetic relationships of seed dormancy and germination. *Botanicheskii Zhurnal* 86(12):1-14.

- O'Connell L M, A Mosseler and O P Rajora. (2006)** Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97: 418-426.
- Ramírez-Sánchez, S. E., J. López-Upton, G. García de los Santos., J. J. Vargas-Hernández, A. Hernández-Livera, y O. J. Ayala-Garay. (2011)** Variación morfológica de semillas de *Taxus globosa* Schlttdl. provenientes de dos regiones geográficas de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 3(2):93-99.
- Vance, N. C. and P. O. Rudolf. (2008)** *Taxus* L. yew. *In*: F. T. Bonner, R. G. Nisley (eds.). *Woody Plant Seed Manual* (revised edition). USDA, For. Serv., Agriculture Handbook 727. *The Woody Plant Seed Manual*. pp: 489-524.
- Zarek M. (2007)** A practical method for overcoming the dormancy of *Taxus baccata* isolated embryos under in vitro conditions. *In vitro Cellular & Development Biology - Plant* 43:623–630