

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISION DE AGRONOMIA



Patógenos encontrados en seis muestras de semillas forestales
(*Pinus cembroides* Zucc., *Pinus greggii* Engelm. y *Cupressus
sempervirens* L.)

Por:

Mirna Bobadilla Meléndez

TESIS.

Presentada como requisito parcial para
Obtener el título de:

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.

Mayo del 2000.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISION DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

Patógenos encontrados en seis muestras de semillas forestales (*Pinus cembroides* Zuc., *Pinus greggii* Engelm. y *Cupressus sempervirens* L.)

Por:

MIRNA BOBADILLA MELENDEZ

TESIS

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

Aprobado por:

MC. M^a Elizabeth Galindo Cepeda
Presidente del Jurado.

Ing. Celestino Flores López
Sinodal.

Ing. Sergio Braham Sabag
Sinodal.

M.C. Reynaldo Alonso Velázco.
Coordinador de la División de Agronomía.

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Mayo del 2000.

INDICE GENERAL

	Página
INDICE DE CUADROS.	iii
RESUMEN.	iv
INTRODUCCION.	1
OBJETIVOS.	2
REVISION DE LITERATURA.	3
Importancia de las Especies Forestales.	3
Generalidades de las Especies.	4
Ubicación taxonómica de <i>Pinus greggii</i>	4
Descripción morfológica de <i>Pinus greggii</i>	5
Distribución geográfica de <i>Pinus greggii</i>	5
Ubicación taxonómica de <i>Cupressus sempervirens</i>	6
Descripción morfológica de <i>Cupressus sempervirens</i>	6
Distribución geográfica de <i>Cupressus sempervirens</i>	7
Ubicación taxonómica de <i>Pinus cembroides</i>	7
Descripción morfológica de <i>Pinus cembroides</i>	7
Distribución geográfica de <i>Pinus cembroides</i>	8
Importancia de las Semillas como Diseminadores de Patógenos.	9
Importancia de las Pruebas de Sanidad de la Semilla.	10
Pruebas de Sanidad de la Semilla.	11
Principales Patógenos asociados a Semillas de Pinos.	12
Hongos de conos y semillas forestales.	13
Hongos que Afectan a las Semillas.	14
Daños que Ocasianan los Hongos a las Semillas.	15
Métodos de Detección de Hongos.	17
Ubicación taxonómica de los hongos encontrados en las semillas.	19
Generalidades de las Bacterias.	20

Ubicación taxonómica de las bacterias encontradas en las semillas.	21
Daños Causados por las Bacterias en las Semillas.	21
Detección e Identificación de Bacterias.	22
Germinación.	24
Latencia.	26
Longevidad de las Semillas.	27
Viabilidad.	27
Pruebas de Germinación.	28
Substratos.	30
Tratamientos para Romper Latencia.	31
Factores que Afectan la Germinación.	33
Evaluación de Plántulas y Semillas no Germinadas.	35
Almacenamiento de la Semilla.	37
Semillas forestales.	38
MATERIALES Y METODOS.	41
Ubicación del Area de Trabajo.	41
Material Utilizado.	41
Detección de Hongos y Bacterias.	41
Identificación de hongos.	42
Identificación de bacterias.	42
Germinación.	44
RESULTADOS Y DISCUSIONES.	46
CONCLUSIONES.	51
RECOMENDACIONES.	52
BIBLIOGRAFIA.	54

INDICE DE CUADROS

	Página
1	Ubicación taxonómica de los hongos encontrados en las semillas, según Alexopoulos, <i>et al.</i> , (1996). 19
2	Material utilizado en la detección de microorganismos, que corresponden a tres especies de semillas forestales con diferente año de colecta y lugar de procedencia. 41
3	Número de semillas con microorganismos, encontrados en las semillas de <i>Pinus cembroides</i> , <i>P. greggii</i> y <i>Cupressus sempervirens</i> 46
4	Microorganismos encontrados en las semillas clasificados como endobióticos y epibióticos de acuerdo a Vázquez y Pineda, (1989). 48
5	Número de plántulas normales (germinación) y anormales, semillas duras, semillas firmes y semillas infectadas. 49

RESUMEN

Uno de los factores que determinan la calidad de la semilla es la presencia de microorganismos, que influyen directamente en la viabilidad. En México los estudios sobre presencia de microorganismos en las semillas, han sido escasos, por tal motivo los objetivos del presente trabajo son los siguientes: Detectar, patógenos presentes en las semillas de *Pinus cembroides*, *Pinus greggi* y *Cupressus sempervirens*, durante la germinación y con diferente tiempo de almacenamiento. Para la detección de patógenos se incubaron las semillas por el método del papel secante, se tomaron 25 semillas de cada especie, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3%, se colocaron 5 semillas en una caja petri con papel filtro húmedo, con 5 repeticiones; las cajas se llevaron a una estufa para su incubación con una temperatura de 28°C, por un período de aproximadamente 5 – 7 días. Para la identificación de hongos se realizaron montas semipermanentes en porta objetos, para poder observar al microscopio sus estructuras, apoyándose con claves de identificación. Para la identificación de bacterias se utilizó el método de medios selectivos y posteriormente las pruebas bioquímicas. Las semillas se colocaron en papel germinador, para su germinación, el material utilizado tenía diferente año y lugar de colecta, se realizaron tacos, para romper dormancia en las semillas se dejaron en agua durante 24 hrs., se evaluó por un periodo de tres semanas, las variables a evaluar además de la germinación fue, semillas no germinadas, semillas firmes, semillas duras y semillas infectadas. Se realizaron tres evaluaciones, una evaluación por semana, haciéndose conteos de las semillas germinadas, semillas visualmente infectadas por hongos y bacterias, semillas que presentaba un aspecto hinchado y semillas duras, no presentaban ninguna de las características anteriores. En las semillas de *Pinus cembroides* se detectó el hongo *Penicillium expansum*, las bacterias *Erwinia sp* y *Xanthomonas sp*; en las semillas de *Pinus greggii* se aislaron los hongos *Syncephalastrum racemosum*, *Rhizopus stolonifer*, las bacterias *Agrobacterium sp* y *Pseudomonas agaricae*, y de las semillas de *Cupressus sempervirens* solo se detecto *Ascochyta sp*, con una muy baja incidencia, la incidencia de bacterias en las semillas fue más alta que la de hongos. *Penicillium expansum*, se presento

en mayor incidencia, afectando la viabilidad de las semillas, ya que este esta considerado como uno de los hongos de almacén de mayor importancia, el de menor importancia e incidencia fue *Ascochyta sp*, ya que este no se ha reportado comúnmente afectando semillas. Las bacterias identificadas en las semillas son de gran importancia dentro de la Fitopatología; estas degradaron completamente a las semillas. Los patógenos presentes en las semillas afectaron la viabilidad de la misma, pero también influyeron otros factores, como la dormancia, entre otros factores de tipo genético, en la baja germinación de las semillas.

INTRODUCCION

Los bosques de coníferas son de gran importancia en la República Mexicana, por su producción de madera y de otros productos indispensables en la industria, juegan un papel importante en el medio ambiente; aunado a esto, algunas especies de coníferas son cultivadas como ornamentales.

Las coníferas de México, especialmente las pináceas, se encuentran en una gran diversidad de condiciones ambientales, se distribuyen en todo el país, encontrando especies desde el nivel del mar hasta las partes más altas de las montañas (Cibrian, 1986).

Generalmente la base de la producción de plantas de casi todas las especies forestales, es la semilla y esta puede obtenerse de las poblaciones silvestres o bien de plantaciones establecidas (Fonseca y Meza, 1995).

Las semillas son unidades de dispersión y reproducción sexual de las plantas superiores, procedentes del desarrollo de los óvulos de sus flores (Besnier, 1989), constituyen la principal unidad de producción y permite la perpetuación de las especies vegetales; por ello, ha sido el centro de atención de numerosos estudios cuya finalidad consiste en obtener los conocimientos necesarios de sus procesos internos y de los mecanismos que permiten la multiplicación de las especies, así como de los factores externos que influyen en estos procesos.

Una herramienta que se ha utilizado para estos fines es el análisis de semillas; que permite conocer con bastante aproximación su comportamiento y con ello, programar adecuadamente la producción de planta en los viveros y así evitar pérdidas al momento de su producción (Fonseca y Meza, 1995).

Uno de los factores que determinan la calidad de plantas es la presencia de microorganismos en la semilla por tal motivo los objetivos del presente trabajo son los siguientes.

OBJETIVOS

Detectar, patógenos presentes en las semillas de *Pinus cembroides* durante la germinación y con diferente tiempo de almacenamiento.

Detectar, patógenos presentes en las semillas de *Pinus greggii* durante la germinación y con diferente tiempo de almacenamiento.

Detectar, patógenos presentes en las semillas de *Cupressus sempervirens* durante la germinación y con diferente tiempo de almacenamiento.

REVISION DE LITERATURA

Importancia de las Especies Forestales

Dentro de la riqueza forestal en México los pinares constituyen un recurso de primera importancia por la demanda de su madera, por la facilidad de su explotación, por la relativa rapidez de su crecimiento de muchas de sus especies y sobre todo por la extensa área de distribución y buen desarrollo que presentan estos bosques en el país.

La explotación de la madera de pino se utiliza en leña para combustible, como materia prima para papel y celulosa, construcción de ebanistería, elaboración de triplay, de chapas cajas, duelas, puntales de minas, postes, durmientes de ferrocarril.

Las semillas comestibles de las especies piñoneras sobre todo de *Pinus cembroides*, son objeto de recolección y comercialización., el Estado de N.L., parece ser el principal proveedor de piñones en la República Mexicana (Rzedowski, 1983).

En *Pinus cembroides* el producto de mayor importancia que se obtiene es la semilla, conocida comúnmente como piñón el que se colecta y comercializa; le siguen en importancia la madera para construcciones rurales y el forraje para la ganadería extensiva. En la actualidad los productos que se obtienen de los bosques piñoneros son: semilla, madera, arbolitos de navidad, hábitat para la fauna silvestre, praderas para la ganadería, estabilidad de cuencas y recreación (Martínez, 1989). Debido a la explotación de sus semillas (piñones) para venta, su regeneración natural podría disminuir a futuro (García y González, 1998).

Pinus greggii es una de las especies de pinos mexicanos quizá de mayor interés y uso potencial en reforestación y recuperación de suelos erosionados, se distribuye de manera natural en la Sierra Madre Oriental de México, pero ha sido utilizado en plantaciones forestales en diversos lugares, ampliando su distribución más allá de la

natural, de acuerdo con varios estudios, *Pinus greggii* prospera en suelos degradados y ha mostrado resistencia a plagas, enfermedades y sequías; también se ha caracterizado por tener buen crecimiento (Zavala y Camacho, 1995).

La madera en su mayor parte se destina al aserrío, aunque también se usa para durmientes, pilotes para minas, vigas, postes para cerca y leña para combustible, produce muy poca resina. (Espejel 1993), es una especie ornamental recomendándose para parques y campos deportivos abiertos (Chávez, 1994).

Cupressus sempervirens se multiplica por semillas, aunque en algunas variedades se acude al injerto, tolera casi toda clase de suelos, incluso pobres, su madera es pesada, duradera; debido a su longevidad se ha plantado como símbolo funerario en los cementerios; se utiliza a menudo formando setos (www.guiaverde.com/arboles, S/A).

La madera del Ciprés común es de grano denso y de color amarillo o rojizo y tan resinosa que resiste la pudrición aún más después de prolongada inmersión en el agua. Tanto esta especie, como *C. macrocarpa* (ciprés monterrey), y *C. lusitanica* ó ciprés de portugal, se cultiva en todas las regiones templadas del mundo en parte por su madera y en parte por su follaje perenne y su elegante forma, como árbol de ornato (Escobar, 1966).

Generalidades de las Especies

Ubicación taxonómica del *Pinus greggii* según Perry (1991).

Reino Plantae
 División Spermatophyta
 Subdivisión. Gymnospermae
 Orden Coniferales
 Familia. Pinaceae
 Género *Pinus*
 Especie *greggii* Engelm.

Descripción morfológica de *Pinus greggii*

Arbol de pequeño tamaño a mediano de 10 a 25m de altura, de copa irregular, con las ramas inferiores horizontales o ligeramente inclinadas, es delgada y ramosa, la corteza en la parte inferior del árbol es gruesa, de color café grisácea; el follaje es levantado y suele vestir toda la ramilla; las hojas se presentan en fascículos de tres; delgadas o gruesas, erectas, de 10 a 15 cm de largo, ásperas y derechas, anchamente triangulares, de color verde claro brillante, de bordes aserrados, estomas presentes en la parte dorsal y ventral, canales resiníferos de 2 a 6, vainas persistentes de 5 a 10 mm de largo, café grisáceo pálido; las hojas viejas con frecuencia se desgarran y caen, los conos son fuertes y tenazmente persistentes, duros, sésiles oblongo-cónico, algo encorvado, de color ocre lustroso, colocados generalmente por pares o en grupos de cinco, miden de 10 a 11 cm, y en ocasiones hasta 15; las escamas son duras y fuertes; de 4 a 4.5 cm de largo por 1.5 cm de ancho; la apófisis desigual, con la cápside deprimida; la semilla es oval, oscura, de 6 a 7 mm con ala de unos 20 mm de largo por 7 mm de ancho, engrosada en la base; la madera no es muy resinosa, es ligera, de color blanco y ligeramente amarilla (Martínez, 1948; Perry, 1991).

Este pino se asemeja al *Pinus patula*, principalmente por sus conos pero se distingue de este por sus hojas, que son cortas, derechas y más gruesas, en tanto que las de *P. patula* son largas, muy delgadas y caídas (Martínez, 1948).

Distribución geográfica

El *Pinus greggii* se encuentra en rodales puros, pero también se encuentra asociado con *P. leiophylla*, *P. teocote*, *P. moctezumae*, *P. arizonica* var. *staminea*, *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* y *P. patula*. En algunas ocasiones en alturas de 3000 msnm, con *P. ayacahuite* var. *brachitera*, *P. rudis* y *Abies* sp., y a los 1500 msnm, con *Liquidambar styraciflua*, *Quercus* sp., *Cupressus* y *Juniperus* sp (Perry, 1991).

La distribución natural de *Pinus greggii* tiene un rango limitado, ubicado en la sierra Madre Oriental, ha sido reportado en los Estados de Coahuila, Nuevo León, San Luis

Potosí e Hidalgo, se ha establecido pequeños grupos de árboles en Veracruz y Puebla, cerca del límite Este con Hidalgo (Perry, 1991).

Se le ha encontrado en Coahuila, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, Guerrero, Puebla y San Luis Potosí (Martínez, 1948).

Su distribución en Coahuila comprende: San Antonio de las Alazanas, cerca de Saltillo, Los Lirios y Arteaga (Martínez, 1948).

Crece en un rango altitudinal de 1300-3000 m.s.n.m., rara vez alcanza altitudes superiores, con una precipitación anual de 600-900 mm, en algunas áreas como Hidalgo, Veracruz y Puebla la precipitación es de 1000 a 1500 mm anualmente; las heladas son comunes en elevaciones altas durante Diciembre y Enero (Perry, 1991).

Ubicación taxonómica del ciprés común según Perry (1991).

Reino. Plantae
 División. Spermatophyta
 Subdivisión. Gymnospermae
 Orden. Coniferales
 Familia. Cupressaceae
 Género. *Cupressus*
 Especie. *sempervirens* L.

Descripción morfológica de *Cupressus sempervirens*

Cupressus, nombre latino del ciprés, según algunos autores deriva de Cyprus (Chipre), donde es nativo y crece silvestre, *Sempervirens*, del latín, significa siempre verde. Árbol que puede alcanzar 30 m de talla, con porte columnar o extendido; corteza delgada de color pardo grisáceo, con largas fisuras longitudinales que no se exfolian; ramillas cilíndricas, subtetrágonas, de alrededor de 1 mm de grosor; hojas escamiformes, delgadas, aplanadas, con punta obtusa, deprimidas, imbricadas, de color verde oscuro mate, sin

glándulas resiníferas; inflorescencias masculinas terminales, de color amarillo; inflorescencias femeninas terminales, solitarias o en grupos; conos ovoideo-esféricos, de 2-3.5 cm de diámetro, de color verde, pasando a gris marrón lustroso en la madurez; están formados por 10-14 escamas, con 8-20 semillas de ala estrecha por escama; maduración bianual; se encuentra bajo dos formas naturales: f. *horizontalis* (Mill.) Voss (*Cupressus horizontalis* Mill.), con ramificación extendida y aspecto de cedro o de pino; F. *sempervirens* (*Cupressus pyramidalis* Targ.-Tozz.), con porte columnar o piramidal, es la forma más extendida en cultivo (www.guiaverde.com/arboles,S/A).

Distribución geográfica

Es nativo de la región del Mediterráneo su área de distribución original no está bien determinada, ya que fue muy cultivado desde la antigüedad, se le supone nativo del Mediterráneo oriental (Irán, Siria, Chipre), (www.guiaverde.com/arboles,S/A).

Ubicación taxonómica del pino piñonero según Perry (1991).

Reino. Plantae
 División. Spermatophyta
 Subdivisión. Gymnospermae
 Orden. Coniferales
 Familia. Pinaceae
 Género. *Pinus*
 Especie. *cembroides* Zucc.

Descripción morfológica de *Pinus cembroides*

Arbol pequeño de 5 a 15 m, la copa puede ser redonda o piramidal; el tronco suele ser corto. Las ramas grandes comienzan desde poca altura y son extendidas y en su mayoría verticiladas o irregularmente dispuestas; la corteza es ceniza, delgada, agrietada y dividida en placas cortas e irregulares. Las ramillas son grisáceas y ásperas; las hojas están en fascículos de 2 –3 a veces cuatro o cinco de 2.5- 7 cm, son rígidas y generalmente encorvadas con estomas en las tres caras, sus colores verde oscuro, algo azulado pálido,

aveces amarillento y frecuentemente glaucas en las caras internas, son brillantes y de bordes enteros, lisas, dos conductos resiníferos externos; las vainas son de color café claro caen pronto dejando en la base del fascículo una diminuta roseta, los conillos son globosos, de color moreno rojizo, con gruesas escamas; los conos son subglobosos, de 5 a 6 cm, de diámetro y se presentan aislados o en grupos hasta de cinco; caedizos y casi sésiles, de color moreno naranjado o rojizo, con pocas escamas, gruesas en su extremidad y delgadas en los bordes, los cuales se reflejan hacia adentro durante la dehiscencia, sosteniendo las semillas; las semillas están colocadas en depresiones de las escamas y son subcilíndricas y ligeramente triangulares sin ala, de unos 10 mm, de largo, morenas o negruzcas, abultadas en la parte superior y adelgazadas hacia la base, el endospermo es rosa; son comestibles y de buena calidad llamándose piñones (Martínez, 1948; Perry, 1991).

Distribución geográfica

Pinus cembroides es el más común en la República Mexicana, su zona comprende desde los Estados fronterizos hasta Puebla; es el que produce el 90 por ciento de la cosecha de piñonero (Martínez, 1948).

Se distribuye en la Sierra Madre Occidental con la frontera de Estados Unidos (Arizona y Nuevo México) hacia el sur en los Estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, Aguascalientes y Jalisco, hacia el este en Guanajuato, SLP, Querétaro e Hidalgo; en la Sierra Madre Oriental esta distribuido desde Texas hacia el sur en Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas, la humedad y la altitud son factores ecológicos importantes para su distribución, los rangos altitudinales son 1500 a 2800 msnm, crece en asociación con *Pinus nelsoni* a elevaciones de casi 3000 msnm, con una precipitación media de 400 a 450 mm en los meses de estación seca, con un rango de temperatura de 0° a 22° C, siendo los meses fríos Diciembre y Enero, los cálidos Mayo, Junio y Julio (Perry, 1991).

Importancia de las Semillas como Diseminadores de Patógenos

Cuatro grupos de organismos comúnmente asociados con semillas originan enfermedades de plantas, los cuales son los hongos, bacterias, virus y nemátodos (Andersen y Leach, 1984).

Las semillas son importantes porque hospedan a muchos microorganismos, sirven como inóculo primario del desarrollo de muchas enfermedades (Sinclair, 1978).

Los patógenos llevados en las semillas afecta directa o indirectamente la calidad de las semillas, originando con ello pérdida en su rendimiento; pueden sufrir en el campo una reducción en su población debido a que los patógenos atacan y matan las plántulas (Andersen y Leach, 1984).

Los patógenos portados en las semillas no pueden detectarse a simple vista y al movilizar la semilla infectada o contaminada de una región a otra, sin que se someta el material a cuarentena, se permite el desarrollo de nuevas enfermedades (Navarrete, 1995).

En los laboratorios, la precisión de las pruebas de germinación puede ser afectada por ciertos patógenos llevados en las semillas, la viabilidad de las semillas almacenadas puede ser reducida por mohos, los cuales carecen de importancia en el campo pero pueden atacar a las semillas latentes almacenadas (Andersen y Leach, 1984).

El porcentaje de semillas portadoras de hongos y bacterias debe de ser determinado, puesto que la infección transmitida por la semilla es con frecuencia importante como punto inicial de propagación de las enfermedades en el campo (ISTA, 1964).

Los microorganismos parasíticos o saprofíticos pueden entrar en la flor o pueden germinar en la superficie de las semillas como contaminantes externos, también pueden penetrar a las capas externas (Warham, 1984).

Importancia de las Pruebas de Sanidad de la Semilla

Las pruebas para enfermedades sobre semillas es una parte importante en la rutina de inspección para la calidad de semillas, en América, las pruebas no tienen tanta importancia como las pruebas de pureza y germinación, para que estas pruebas tengan un requerimiento razonable deben establecer diversas condiciones: 1) debe ser establecida la infección de la enfermedad que cause reducción en plantas, que conduce enfermedades en campo o que causa otros problemas, la presencia del patógeno en la semilla indica la posibilidad de que cause problemas para el siguiente cultivo; 2) establecer el nivel de infección aceptable y 3) si la enfermedad es desarrollada explosivamente los patógenos pueden ir a ser comparados por restricciones que legalicen la venta de semilla infectada (Copeland y McDonald, 1985).

Las pruebas de las semillas son necesarias para bacterias patógenas por que: las semillas son el inóculo mayor para enfermedades bacterianas; las semillas infectadas introducen enfermedades en áreas libres o introducen razas más virulentas; la inspección visual de los campos no representa ni da una adecuada sanidad de un lote de semillas (Neergaard, 1979).

Estas son esenciales para observar que muchas bacterias patógenas de plantas algunas veces presentaran una reacción de enfermedad en muchos no hospederos, si la población de la bacteria es alta (10^{-7} cel/ml), generalmente los síntomas que se forman son atípicos y no se presentan con inoculaciones de bajo número de células, con las cuales se presenta una enfermedad como respuesta en un hospedero compatible, estos síntomas atípicos son utilizados como características para un hospedero particular no compatible al patógeno estos pueden ser usados como diagnóstico, las pruebas en hospederos confirman la entidad del patógeno sospechado (Lelliott y Stead, 1987).

Las semillas son portadoras de una microflora que varía según la especie hospedera, esto se aplica especialmente a las microfloras arraigadas a más profundidad, aunque en la superficie también puede haber muchos huéspedes accidentales (Warham, *et al.*, S/A).

Los ensayos fitosanitarios tienen por objeto detectar e identificar los organismos patógenos presentes en las semillas, apreciar los daños causados en ellas y prever las posibles consecuencias de las infecciones existentes. (Besnier, 1989).

Pruebas de Sanidad de la Semilla

Warham, *et al.*, (S/A), mencionan que la microflora transmitida por la semilla puede ser identificada empleando pruebas de sanidad de la semilla.

Las pruebas de sanidad de la semilla incluyen:

1.- El examen de las semillas en forma externa o interna, macroscópica o microscópica, para detectar la presencia de patógenos (examen visual, la prueba de lavado y filtración y la prueba del embrión).

2.- La incubación de las semillas en agar o en papel secante húmedo y la identificación de los organismos que surgen (la prueba en placa de agar, la prueba con papel secante y el método de congelación).

3.- La germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas en condiciones que favorecen la producción de los síntomas de diagnóstico (las pruebas con plántulas).

4.- Las sondas de ADN para ciertos patógenos (por ejemplo, la marchitez de Stewart en el maíz).

5.- Las pruebas de ELISA (para bacterias y virus).

Las pruebas de sanidad de la semilla se pueden usar para varios propósitos como son: evaluar la incidencia de un patógeno transmitido por la semilla que puede afectar la calidad de ésta, detectar organismos para propósitos de la cuarentena, determinar la calidad de la semilla en términos de su capacidad de germinación y/o vigor y determinar si es necesario tratar la semilla con plaguicidas (Warham, *et al.*, S/A).

Principales Patógenos Asociados a Semillas de Pinos

Vázquez y Pineda (1989), realizaron ensayos de germinación en semillas de *Pinus pseudostrobus*, *Pinus michoacana* y *Pinus douglasiana*, para detectar microorganismos asociados a las semillas de estas tres especies de pinos, clasificaron a estos, en dos grupos, microorganismos endobióticos, los que se encuentra dentro de la testa de la semilla y microorganismos epibiótico los que se encuentran en la superficie de la testa de la semilla, los resultados fueron los siguientes: los principales microorganismos epibióticos fueron *Botrytis*, *Fusarium*, *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Xanthomonas*; los endobióticos son *Penicillium*, *Botrytis*, *Aspergillus* y *Pestalotia*.

El Commonwealth Mycological Institute de Inglaterra reporto a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Botryodiplodia theobromae*, *Macrophoma sapinae*, *Penicillium sp*, *Penicillium citrinum*, *Pestalotiopsis sp*, *Thomopsis oculata*, *Phomopsis pseudotsuga*, *Rhizopus stolonifer*, *Syncephalastrum recemosun*, *Trichoderma harzianum*, *Trichothecium roseum*, *Sterile insolate*, en semillas de pinos de Honduras *Pinus caribea* y *Pinus oocarpa*; y en el Laboratorio Servicios para la Investigación Agrícola Tropical S.A. de la Lima-Honduras, C.A. reportó en *Pinus caribea* a los hongos *Mucor*, *Curvularia*, *Botryodiplodia*, *Trichoderma* y *Fusarium roseum* presentes en las semillas (Robins y Ochoa, 1983).

Lemus (1999), reporta en semillas de *Pinus catarinae* a los hongos *Fusarium moniliforme var subglutinans*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria resedae* y *Rhizopus sp* y a la bacteria *Pseudomonas syringae pv syringae* afectando la viabilidad.

En algunas investigaciones tienen implicados a los hongos en la pérdida de germinación de las semillas de conos almacenados de abeto douglas (*Pseudotsuga menziesii*) en las pruebas se encontraron a los géneros *Gliocladium*, *Penicillium*, *Spicaria* y *Trichoderma* en mayor frecuencia y con menor frecuencia los géneros *Aspergillus* y *Rhizopus*, (Bloomberg, 1969); además se aislaron a los géneros *Botrytis* y *Trichothecium*, (Hansen y Lewis,1997), también se reporta haber observado bacterias en las semillas (Bloomberg, 1969).

Prochazkova realizó ensayos de 8100 lotes de semillas de coníferas, establece, especies de *Penicillium* en más del 85% de los lotes de semillas del abeto nórdico; *Aspergillus* en 73 y 39 %, *Trhichothecium roseum* cerca del 70% y *Rhizopus stolonifer* en un 40% en los lotes de semillas del pino escocés (Hansen y Lewis, 1997).

Hongos de conos y semillas forestales

Hansen y Lewis (1997). Mencionan que muchos hongos saprófitos o débilmente patogénicos se presentan en cono y semillas en la época de colección y proceso de extracción y subsecuentemente durante las pruebas de semillas y también durante el transplante de las plántulas; muchas especies de *Alternaria*, *Penicillium*, *Trichoderma* y hongos similares, son generalizados en conos cuyo rol es indefinido; dependiendo de cómo invade el hongo la enfermedad de los conos puede ser húmeda o seca y comúnmente lo cubren externamente y algunas veces internamente, las esporas tienen un olor rancio.

Si el hongo se desarrolla después de la maduración del cono, el número y tamaño de conos y semillas no son afectadas, sin embargo las semillas frecuentemente se pudren y el exceso de resina puede impedir la extracción; los hongos se presentan en conos que tienen un inadecuado manejo durante la colecta y durante el almacenamiento, muchos de estos también se presentan en semillas.

Frecuentemente los hongos crecen durante las pruebas de germinación, ensayos de patógenos o en la estratificación de la semilla que se va a sembrar, estos hongos pueden ser fitopatógenos, o afectar la calidad de los lotes de semillas, estos contienen semillas inmaduras o un inadecuado manejo; frecuentemente los daños se presentan antes de la recolección o después durante el almacenamiento, solamente las semillas en dormancia son afectadas, así no hay amenaza a plántulas.

Hongos que Afectan las Semillas

La dispersión de un número grande de hongos patógenos es dependiente de la transmisión de las esporas a través del aire en largas o cortas distancias y su depósito en huéspedes adecuados, los hongos patógenos de las semillas, sin embargo, no están sujetos a estas restricciones, no solamente se dispersan por los mecanismos naturales, sino que además son llevados a grandes distancias por el hombre a cualquier cultivo (Moreno, 1976). ⇐

Los hongos que invaden a las semillas se les han dividido comúnmente en dos formas, hongos de campo y hongos de almacén (Moreno y Zamora, 1978), existe un tercer grupo llamado hongos de deterioro avanzado, que colonizan granos y productos alimenticios que han sufrido un deterioro biológico (De la Garza, 1996).

Los hongos de campo son los que invaden a la semilla cuando aún están sobre la planta, (Moreno y Zamora, 1978) en su formación o maduración, pueden detectarse algunas bacterias, requieren una humedad en el grano del 25 a 30%; en este grupo ubican a los géneros de *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Diplodia* y *Cephalosporium* (De la Garza 1996).

Los hongos de almacén inician su invasión en las últimas etapas de formación de los granos, su actividad comienza con el almacenamiento del mismo y se incrementa paulatinamente, crecen en contenidos bajos de humedad en el grano y con una humedad relativa alta, los géneros involucrados son *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Sporendonema sp* (Moreno y Zamora, 1978).

Los hongos de deterioro avanzado proliferan en productos almacenados a humedades relativas superiores al 90%, son degradadores de la materia orgánica; invaden los granos que están bajo pésimas condiciones de almacenamiento, como son algunas especies del género *Aspergillus*, *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Chaetomium*, *Trichothecium* (De la Garza, 1996).

Syncephalastrum racemosum, se reporta que ha sido aislado principalmente en cereales, alimentos fermentados, cacahuates y carnes procesadas (Pitt y Hocking, 1985).

El desarrollo de los hongos en el grano antes y durante el almacenamiento lleva una reducción en el valor de la cosecha por pérdida de peso y deterioro en la calidad del grano, muchos hongos presentes en las semillas son conocidos por degradar la celulosa de las semillas, adicionalmente, estos microorganismos pueden ser activadores o supresores de la germinación de las semillas a través de sus toxinas (Moreno,1976).<=

Daños que Ocasionan los Hongos a las Semillas

Algunos hongos patógenos son llevados superficialmente en las semillas, mientras que otros se les encuentra profundamente, los hongos pueden penetrar la membrana de las semillas y depositarse en los tejidos del cotiledón, la posición del patógeno en o dentro de la semilla puede afectar la sobrevivencia de ésta una vez que se den las condiciones adecuadas, las plántulas que contraen una infección proveniente de la semilla sufren los estragos de la enfermedad que la ataca (Moreno, 1976).<=

Agrios (1986) menciona que la mayoría de las pudriciones o deterioro de los granos y leguminosas después de la cosecha, durante su almacenamiento y transporte, son causados por varias especies del hongo *Aspergillus*, en ocasiones, la infección por *Penicillium* se produce en granos o leguminosas almacenadas a bajas temperaturas y con un contenido de humedad ligeramente por arriba del nivel norma.

Los hongos del almacén, al invadir los embriones de las semillas, hacen que disminuya notablemente el porcentaje de germinación de la semilla infectadas que se utilizan para siembra, los hongos de almacenamiento manchan también a los embriones y semillas que dañan o destruyen; estos actúan a niveles inferiores de humedad donde no hay agua libre disponible, mientras que las bacterias se desarrollan a niveles más altos de humedad.

Moreno (1982) cita que los hongos de almacén constituyen una de las causas de la pérdida de viabilidad debido a la alteración del metabolismo de las semillas, y en general de las pérdidas de volumen, calidad nutritiva y sanitaria de los granos que el hombre y sus animales domésticos consumen.

Alrededor de una docena de especies de *Aspergillus* y varias especies de *Penicillium* comprenden los hongos de almacén, el daño primario causado por los hongos de los almacenes, es su efecto sobre las semillas en germinación, la invasión en las semillas por los hongos de los almacenes las pueden debilitar o destruir, el resultado es una germinación lenta o errática. (Henderson y Christensen, 1980).

Los principales tipos de pérdidas causadas por hongos que se desarrollan en granos almacenados son los siguientes:

- 1) Reducción en el poder germinativo, 2) Ennegrecimiento total o parcial de los granos y semillas (generalmente embriones); 3) Calentamiento y hedor; 4) Diversos cambios bioquímicos; 5) Producción de toxinas, las que al ser ingeridas pueden ser dañinas al hombre y a los animales domésticos; 6) Pérdida de peso. (Christensen y Kasumann 1980).

Las micotoxinas son sustancias producidas por ciertos hongos, y en pequeñas cantidades pueden ser tóxicas a los animales que las ingieren y en algunos casos lo son al estar en contacto con la piel, además alteran la calidad sanitaria de los granos destinados al consumo humano, originando un riesgo para la salud pública.

Las evidencias actuales que se tiene sobre la importancia de los diferentes hongos toxígenos que invaden a los granos indican que los géneros más importantes son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Por ejemplo *Penicillium expansum* produce las toxinas Patulina y Citrinina (Moreno, 1988).

La citrinina al igual que otras toxinas producen toxicosis, asociadas con varias enfermedades tales como alteraciones nerviosas y circulatorias, degeneración de los riñones y del hígado, y muchas otras, la patulina es también una sustancia carcinógena, es tóxica

para algunas bacterias, algunos hongos, plantas superiores y animales, la patulina puede constituir un grave peligro para la salud tanto del hombre como de los animales (Agrios, 1986).

Las principales condiciones que influyen en el desarrollo de los hongos de almacén en los granos almacenados son los siguientes:

1) El contenido de humedad de los granos almacenados; 2) la temperatura; 3) el período de tiempo que el grano es almacenado; 4) el grado de invasión por hongos de almacén que presente el grano antes de su arribó a un determinado sitio; 5) la cantidad de material extraño presente en el grano y 6) las actividades de insectos ácaros (Christensen y Kasumann, 1980).

Métodos de Detección de Hongos

Incubación de la semilla:

En la prueba en placas de agar, la prueba con papel secante y el método de congelación, se incuban las semillas durante cierto tiempo en medio de cultivo particular, en condiciones ambientales específicas para que los patógenos presentes en las semillas se manifiesten (Warham, *et al.*, S/A).

Ensayos de agar:

Los ensayos en agar no son utilizados como los anteriores, en parte por las mayores complicaciones que comportan, para los hongos se utilizan tipos de agar con pH bajo, siendo preferible utilizar agar ya preparado para su uso inmediato, se deben desinfectar las semillas con hipoclorito de sodio (Dhingra y Sinclair, 1995).

Ensayos en papel secante:

El método del papel secante se utiliza especialmente donde la prueba de agar es impracticable, este es aplicado para toda clase de semilla, incluyendo cereales, vegetales, ornamentales y forestales; este proporciona excelentes condiciones para desarrollar micelio y esporulación de conidias de muchos hongos (Neergaard, 1979).

Ensayos con congelación.

En este tipo de ensayos se matan por congelación las semillas, una vez iniciada la germinación, así las semillas constituyen un sustrato nutritivo que favorece un profuso crecimiento de diversos hongos. Se utiliza papel filtro o placas de plástico; se colocan las semillas sobre estos materiales. En cereales se incuban durante otros 2-4 días a 20°C, a continuación se someten a congelación a 20°C bajo cero durante una noche y luego se colocan de nuevo a 20°C bajo ultravioleta próxima (NUV) durante 5-7 días (Besnier, 1989).

Las semillas se desinfectan y luego se colocan en recipientes (cajas petri o charolas con tapa) que contengan papel filtro o papel secante húmedo, las semillas se colocan de modo equidistante de preferencia con el embrión hacia arriba, una vez terminado el periodo de incubación se revisan las semillas y se determina el porcentaje de semillas infectadas y los tipos de hongos presentes (Navarrete, 1995).

Se observa entonces la aparición de síntomas de la enfermedad o de signos del desarrollo del patógeno mismo, se identifican los distintos hongos por características tales como la forma, longitud y disposición de los conidióforos; el tamaño, la septación, el color, la formación de cadenas, la forma etc., de los conidios, y su disposición sobre los conidióforos; la aparición de masas de esporas, las características del micelio, la densidad de la colonia, etc., (Warham, *et al.*, S/A).

Los principales factores que favorecen el crecimiento, la fructificación y el desarrollo de los síntomas de los patógenos son la temperatura, la humedad, la luz y el período de incubación (Besnier, 1989).

Ubicación taxonómica de los hongos encontrados en las semillas

La taxonomía de los hongos encontrados en las semillas, se describe en el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Ubicación taxonómica de los hongos encontrados en las semillas, según Alexopoulos, *et al.*, (1996).

Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Fungi						
	Ascomycota					
		Deuteromycetes	Erotiales	Trichomaceae	<i>Penicillium</i>	<i>expansum</i>
			Sphaeropsidales	Sphaeropsidaceae	<i>Ascochyta</i>	<i>sp</i>
		Zygomycetes	Mucorales	Mucoraceae	<i>Rhizopus</i>	<i>stolonifer</i>
				Syncephalastraceae	<i>Syncephalastrum</i>	<i>racemosum</i>

Generalidades de las Bacterias

Se ha encontrado que cerca de 80 especies de bacterias, muchas de las cuales constan de numerosos patovares que producen enfermedades en las plantas (Agrios, 1986).

Hasta donde se sabe las bacterias no pueden entrar a las plantas a través de cutículas intactas, por lo que se hace a través de heridas o aberturas naturales, la presencia de agua es necesaria para que el patógeno se multiplique y se desplace hasta un punto donde la entrada sea posible, una vez dentro secretan enzimas pectolíticas que les permite agrandar el espacio donde se encuentran y moverse a través de los tejidos, puede producir la muerte celular debido a las toxinas o enzimas pectolíticas producidas (Manners,1986); los insectos diseminan algunas bacterias, las colocan sobre o dentro del huésped (De la Garza,1996).

Las bacterias son las responsables de fuertes pérdidas económicas, como consecuencia a su ataque a las plantas, las cuales pertenecen a cinco grupos que son: *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (García, 1971).

Las bacterias son a menudo portadas en la superficie de la semilla o en otros tejidos de la misma, causan infecciones al sistema vascular; las bacterias que se encuentran en la superficie de las semillas sobreviven por un periodo limitado uno o dos años, mientras que las bacterias que se encuentran dentro de los tejidos de la semilla pueden sobrevivir hasta 24 años bajo condiciones de laboratorio (Neergaard, 1979)

Muchas bacterias fitopatógenas son diseminadas por semillas infectadas interna o externamente, las enfermedades transmitidas por la semilla son caracterizadas por su dispersión a largas distancias (Masao Goto, 1992).

Las bacterias encontradas en las semillas están clasificadas taxonómicamente de la siguiente manera según Masao, (1992).

Reino	División	Clase	Familia	Género	Especie
Procaryonte					
	Gracilicutes				
		Proteobacteria			
			Enterobacteriaceae	<i>Erwinia</i>	<i>sp</i>
			Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium</i>	<i>sp</i>
			Pseudomonaceae	<i>Xanthomonas</i>	<i>sp</i>
				<i>Pseudomonas agaricae</i>	

Daños Causados por las Bacterias en las Semillas.

Neergaard (1979) menciona que el efecto patogénico de las bacterias a las semillas puede ser derivado de uno los siguientes cuatro tipos de daños: aborto de la semilla, pudrición de la semilla, decoloración de la semilla y exudados en la superficie de la semilla, uno u otro puede presentarse o una combinación de estos, que a continuación se describen.

Aborto de la semilla:

La formación de la semilla puede ser totalmente parada, o puede disminuir su tamaño

Pudrición de la semilla

La bacteria puede penetrar a la semilla y causarle una pudrición, ya que facilita la entrada a otros patógenos, las bacterias pueden quedar en la superficie y así contaminar a otras semillas.

Decoloración de la semilla

La decoloración de la superficie de la semilla puede ser debido a lesiones producidas por bacterias patogénicas.

Exudados en la superficie de las semillas

Algunos patógenos, tal vez variedades de algunas especies pueden producir una cantidad excesiva de bacterias las cuales se colocan en la superficie de la semilla asemejando una especie de barniz que cubre a la semilla.

Detección e Identificación de Bacterias

La detección de las bacterias patógenas transmitidas por las semillas requieren técnicas más complicadas que las utilizadas para los hongos, sin embargo, mientras que se conocen unos 125 géneros de hongos que pueden ser transmitidos por las semillas, solo se ha detectado la transmisión de seis géneros de bacterias *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Besnier, 1989)

Rodríguez (1994) menciona que para la identificación de bacterias existen las pruebas sencillas como son las características culturales, fisiológicas o bioquímicas y serológicas.

Características Culturales:

Determinan los requerimientos nutricionales y las condiciones físicas del medio que favorecen el desarrollo de una bacteria en particular.

Características Fisiológicas y Bioquímicas:

Se determinan cuando la bacteria por identificar se hace crecer en la presencia de una sustancia nutritiva específica y después de cierto tiempo, el cultivo se examina para determinar los cambios químicos que se llevaron a cabo.

Besnier (1989) menciona que el método general para la detección e identificación de las bacterias es el llamado método bacteriológico que consiste en la obtención de cultivo puros en medios nutritivos especiales que revelan sus características bioquímicas, complementado por el estudio morfológico de las células al microscopio, su tinción con colorantes selectivos, el estudio de la forma y el color de las colonias y, finalmente, la infección de plantas susceptibles y observación de síntomas aparecidos, los métodos empleados pueden describirse de la siguiente manera:

Cultivo de plantas y plántulas:

Consiste en promover la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas en ambientes propicios para la aparición de los síntomas de la infección, detectando las plantas infectadas en razón de estos síntomas característicos, confirmado la infección aislando el exudado bacteriano a partir de las lesiones y cultivando la bacteria en medios selectivos, lo que permite confirmar la identificación por inoculación del cultivo puro a plantas sensibles o mediante reacciones serológicas.

Medios nutritivos:

La identificación de las bacterias presentes en las semillas puede hacerse inoculando placas de agar con medios nutritivos específicos para las bacterias buscadas. La inoculación puede hacerse con extractos de semillas, con semillas enteras desinfectadas superficialmente o con los líquidos de lavados de las semillas.

Métodos serológicos:

Se introduce parenteralmente un antígeno a un animal este reacciona después de cierto tiempo con la producción de anticuerpos, el suero que contiene el los anticuerpos se conoce como suero inmune o antisuero, una capacidad de los anticuerpos es su habilidad a reaccionar con los antígenos que indujeron su formación, la reacción entre antígeno y anticuerpo es una prueba sensible u específica; existen diversas técnicas serológicas con las

cuales se pueden poner de manifiesto la reacción entre antígeno y anticuerpo, las fundamentales son: La aglutinación es el resultado de la reacción entre el suero inmune específico y la bacteria completa por identificar y la precipitación es cuando el suero inmune se mezcla con un antígeno soluble (Rodríguez, 1994; Besnier, 1989).

Existen otros métodos de identificación como es el del bacteriofago, el del PCR (Reacción de cadena en polimerasa), la determinación de la composición y homología del DNA, la Taxonomía Numérica, el análisis de los lípidos de la pared celular, etc. (Rodríguez, 1994)

Pruebas rápidas de patogenicidad:

La demostración de la patogenicidad de una cepa bacteriana es un procedimiento implicado que requiere mucho tiempo para que aparezcan los síntomas típicos de la enfermedad en la planta y no siempre se dispone de este material, siendo más difícil cuando se trata de árboles

Debido a estos problemas, se ha investigado la forma de determinar en un tiempo corto la patogenicidad de aislamiento bacteriano, a la fecha se tiene la reacción de hipersensibilidad, pudrición de tubérculo de papa, inoculación a frutos verdes de peral o manzana (Rodríguez, 1994).

Germinación

La germinación se define como el brote y desarrollo de las estructuras especiales del embrión, que en la clase de semilla de que se trate indica la capacidad para poder producir una planta normal en condiciones favorables. La germinación se expresa como el porcentaje de semilla pura de la clase considerada que produce plantitas de semilleros normales (Moreno, 1976).

La Asociación de Analistas Oficiales de semillas describe a la germinación como la emergencia y desarrollo de aquellas estructuras esenciales del embrión de la semilla, que para la clase de semilla en cuestión son indicativos de la habilidad de producir una plántula normal bajo condiciones favorables, llámasele viabilidad o capacidad de germinación (ISTA, 1985).

La germinación comienza cuando, en la semilla aletargada o en reposo, se activa la maquinaria bioquímica conservada y se desencadenan los procesos metabólicos (Besnier, 1989).

Toole y Kearns (1984) mencionan que el primer paso para la germinación es la absorción de agua que permite al protoplasma de las células continuar una vida activa, cada especie de semilla debe absorber una determinada cantidad de agua antes de que principie la germinación, esa cantidad depende de la estructura y de la composición de la semilla, cuando las semillas han tomado la suficiente para la germinación, contienen alrededor del 40 al 70 % de agua; la primera evidencia visible de la germinación es la ruptura de las cubiertas de la semilla por la punta de la raíz.

La germinación llega a su término cuando el embrión se ha convertido en una plántula independiente, facultada para sintetizar su propio alimento (Niembro, 1986).

La germinación de semillas forestales en el vivero y en el campo generalmente es del 50 al 80 por ciento de la germinación de laboratorio pero después de la germinación todavía pueden ocurrir pérdidas. Por lo mismo, el número de plántulas aprovechables producidas por cien semillas viables regularmente va de 10 a 60 para coníferas y varía aún más en especies de hoja ancha; para la mayoría de los pinos va de 61 al 80 % (Rudolf, 1980).

Pinus cembroides a presentado una germinación del 80% como promedio, las temperaturas elevadas provocan latencia de las semillas, *Cupressus sempervirens* ha tenido una germinación del 35 al 40% como promedio (FAO, 1968); en el Invernadero de Alta

Tecnología de la UAAAN, reporta que *P. greggii* a llegado a presentar una germinación del 90% (Braham, 1999).

La mayoría de las especies forestales demuestran durante la siembra en primavera, efectuada a continuación de la cosecha, los mejores resultados de germinación, pero se dan muchos casos en los cuales la semilla no germina, haciéndolo en el siguiente año o también en el tercero, cuarto hasta quinto año después de la cosecha: la edad de la semilla, el momento de la recolección, la forma de almacenamiento y la procedencia tiene una gran influencia en el poder y en el vigor germinativo de la semilla (Brumm y Buchards, 1970).

Latencia

La latencia es la condición que impide la germinación, aún cuando la luz, la humedad, la aireación y la temperatura sean satisfactorias, la latencia puede ser una característica hereditaria, también puede ser inducida durante la extracción y almacenamiento de la semilla, puede ser producida por una cubierta impermeable de la semilla que impide la absorción de agua y de oxígeno, o de la condición de las partes de la semilla en el interior de sus cubiertas (Vera, *et al.*, 1980).

Las semillas con dormición presentan mecanismos fisiológicos inhibitorios, que impiden la germinación en condiciones ambientales favorables, en otros caso, las condiciones de los nutrientes almacenados, o del embrión, impiden la germinación (Camacho, 2000).

Para romper la dormancia de algunas especies, se pueden sumergir las semillas en agua, tallar la cobertura de las semillas con papel lija u otro material, estratificación, etc. (SEP, 1982).

Longevidad de las Semillas

La longevidad es el lapso en que las semillas pueden permanecer en quiescencia o en dormición el cual transcurre de la dispersión o cosecha hasta su muerte (Camacho, 1994).

Algunas veces las semillas se dividen en tres clases, de acuerdo con su lapso de vida bajo las mejores condiciones posibles, pueden ser microbióticas, mesobióticas y macrobióticas (Quick, 1984).

Microbióticas tienen una longevidad menor de 3 años, se tienen semillas que soportan el secado pero que mueren al poco tiempo de estar almacenadas a temperaturas de 10 a 30 °C, las semillas de muchas plantas de zonas cálido- húmedas, frecuentemente no se pueden secar ni tampoco se puede limitar la aireación pues tienen una respiración elevada y todo esto produce semillas de poca longevidad (Camacho, 1994).

Mesobióticas aquí se incluyen todas aquellas semillas las cuales llegan a permanecer viables por espacios de tres a quince años por ejemplo, *Pinus*, *Abies*, *Cupressus*, *Picea*, *Pseudotsuga*, etc., así como algunas latifoliadas como *Fraxinus* y *Liquidambar* (Niembro, 1980).

Macrobióticas son aquellas semillas con más de 15 años de longevidad, entre las cuales se encuentran muchas con dormición física, que llegan a disponer de mecanismos para aprovechar las oportunidades de reducir sus contenidos de humedad (Camacho, 1994).

Viabilidad

La viabilidad se refiere a que individualmente una semilla este viva (Patiño, *et al*, 1983), y esta puede expresarse como el porcentaje de germinación, que indica el número de plántulas producidas por un número de semillas (Hartmann y Kester, 1999).

La viabilidad va ligada con la calidad de la semilla ya que la germinación rápida, el crecimiento vigoroso de las plántulas y el aspecto normal de ellas son atributos de calidad de la semilla. (Hartmann y Kester, 1999).

Una semilla es de buena calidad cuando tiene facultad germinativa, es decir, el poder de germinar si se le coloca en condiciones convenientes, las semillas pierden esta facultad con la edad y más rápidamente cuando su conservación es defectuosa, es útil asegurarse que las semillas son de la última cosecha o, al menos, que no están apunto de perder su facultad germinativa como consecuencia de su edad (Cuisance, 1988).

Una semilla de calidad produce con fidelidad las características genéticas de la especie a cultivar, tiene capacidad para una germinación elevada y esta libre de enfermedades e insectos (Hartman y Kester, 1999).

Los factores que pueden afectar la calidad de la semilla mencionados por Wang y Beardmore (2000) si no son utilizados adecuadamente son:

Recolección de conos: época de recolección, humedad del cono y madurez

Manejo de conos: temperatura ambiental y recolección

Procesamiento de la semilla: secado en estufa, desalado y acondicionamiento

Almacenamiento de la semilla: humedad de la semilla, temperatura de almacenamiento y tipo de envase.

Patiño, *et al.* (1983) menciona que los factores que afectan la calidad de la semilla son la madurez de la semilla, viabilidad inicial, naturaleza de la testa y el método de procesamiento y almacenamiento de semillas.

Pruebas de Germinación

Las pruebas de germinación están diseñadas para indicar cercanamente como es posible, la proporción que pueda esperarse que brote y se desarrolle a formar plantas

fuertes en el campo, el hecho de que una semilla absorba agua, se hinche y eche unas pequeñas raicillas no es garantía de que continuará creciendo y formará una planta (Vera, *et al.*, 1980).

Las enfermedades de las semillas son uno de los factores que provocan el deterioro de la misma, además de las condiciones climáticas anteriores a la cosecha, la madurez de la semilla, el daño mecánico, el ambiente de almacenamiento (temperatura y humedad), los insectos y los genes, el deterioro de la semilla puede medirse de manera cuantitativa evaluando una muestra de semilla (Warham, *et al.*, S/A).

En una prueba de germinación, las semillas se deben colocar bajo condiciones ambientales óptimas de temperatura, luz y humedad (Rodríguez y Navarro, 1975), es necesario sembrar semillas en un substrato uniforme e incubarlas a temperatura óptima para que germinen, después del período de incubación, se determina el número de plántulas normales, el número de plántulas anormales, y el número de semillas no germinadas (Warham, *et al.*, S/A).

Las pruebas de germinación deben efectuarse con semillas tomadas al azar, de la porción de semilla pura de la muestra, al colocar las semillas en el substrato adecuado deben quedar espaciadas y separadas uniformemente, para evitar que las semillas lleguen a estar en contacto durante su germinación (Warham, *et al.*, S/A); en ocasiones y frecuentemente en las semillas de especies arbóreas, se suelen encontrar también semillas vacías, semillas desprovistas de embrión y semillas dañadas por insectos (Besnier, 1989).

La eliminación de las semillas muertas o no viables de un lote incrementa la calidad de este, pues se logra un mejor porcentaje de germinación, este objetivo, se logra al separar por soplado las semillas llenas de las vacías o vanas (Camacho, 2000).

Semilla pura se refiere a la semilla que está presente en forma principal en el lote, la muestra de trabajo se divide visualmente en la semilla pura de la clase en consideración, semillas de otros cultivos, semillas de malezas, material inerte incluyendo estructuras de

tipo semillas, semillas vanas o quebradas, cascabrillo, tierra, piedras y otras basuras. (Hartmann y Kester, 1999).

La mayor parte de las pruebas se realizan en sustratos no tóxicos tales como papel secante, toallas de papel o papel filtro, los cuales se usan solos o encerrados en cajas de petri o en otros recipientes, durante todo el período de la prueba se debe proporcionar a las semillas una humedad adecuada, la humedad excesiva puede ocasionar una restricción en la respiración (la absorción de oxígeno y la expulsión de gas carbónico de las semillas) y detener la germinación de las semillas (Vera *et al.*, 1980).

Substratos

Los sustratos son utilizados para proveer humedad adecuada y sostén a las semillas durante su germinación, se puede emplear diferentes materiales como: agar, agrolita, algodón, arena, papel, tela, vermículita y tierra.

Un medio ideal para que las semillas puedan germinar y se pueda observar el crecimiento inicial de las plántulas, debe tener una buena retención de humedad, pH entre 6 y 7.5, porosidad y ausencia de sustancias tóxicas y microorganismos que puedan afectar la germinación de las semillas, los síntomas característicos de la toxicidad son la falta de desarrollo en las raíces, que estén descoloridas y la formación de agallas y tumores.

A nivel internacional únicamente está aprobada la siembra sobre papel, arena y tierra; por la facilidad en su empleo se prefiere el uso del primer sustrato (Camacho, 1994).

Para efectuar las pruebas de germinación se utilizan diversas clase de substratos como:

- Toallas de papel enrolladas y colocadas dentro de cajas de plástico o dentro de las germinadoras.
- Papel filtro cortado en discos para las pruebas en cajas petri
- Papel cartoncillo – secantes- cortados en discos para pruebas en cajas de petri.
- Arenas para pruebas de germinación en cajas de plástico
- Arena de río para pruebas de germinación bajo condiciones de invernadero, utilizando cajoneras de madera o bancos de cemento.
- Tierra para las pruebas de germinación en el suelo fuera o dentro del invernadero (Rodríguez y Navarro, 1975).

Tratamientos para Romper Latencia

En la inducción de la germinación de la semilla, el rompimiento de la latencia es un gran problema. Los analistas de semillas consideran como semillas latentes a aquellas que son potencialmente viables pero no germinan con prontitud, cuando se les coloca bajo condiciones favorables de temperatura, a menos que hayan sido sometidas a algún tratamiento especial (Vera *et al.*, 1980).

Remojo continuo en agua a temperatura ambiente: Consiste en colocar las semillas dentro de un volumen de agua durante un período de 12 horas a 10 días, con el fin de lograr el lavado o lixiviación de las sustancias solubles que impiden la germinación (los inhibidores) (Camacho, 2000).

Remojo alternado con secado: Se alterna el remojo con períodos de secado al sol, con el propósito de lavar los inhibidores y el debilitamiento de las cubiertas leñosas, el número de veces que las semillas deben de ser remojadas y secadas varía de una a siete, (Camacho, 2000).

El remojo facilita y activa la germinación, como la estratificación a la que a veces puede reemplazar, su duración, es de 12 a 24 horas normalmente, no excede de tres días, es más eficaz en agua tibia o caliente (70°), a la que se deja enfriar progresivamente después de haber sumergido en ella las semillas, en cuanto empiezan a hincharse, las semillas deben ser sembradas enseguida en un medio suficientemente cálido y húmedo (Cuisance, 1988).

A veces se acostumbra remojar las semillas antes de sembrarlas para iniciar el proceso de germinación y disminuir el tiempo que requieren las plantas para brotar del suelo, este tratamiento es apropiado para semillas que normalmente son lentas para germinar, para semillas secas y duras o cuando existe una cierta condición de latencia (Rodríguez y Navarro, 1975).

Acido sulfúrico (AS): En semillas que no responden al tratamiento con agua caliente, la opción para hacerlas germinar es la inmersión en AS, el tratamiento consiste en colocar las semillas en una bolsa de malla plástica resistente al ácido y sumergirlas a una concentración industrial del 95% de pureza, la duración del tratamiento puede ir de 15 minutos a 2 horas, se levanta la bolsa, se deja escurrir y por separado se procede a lavar las semillas con agua corriente durante diez minutos. Otras sustancias como ácido clorhídrico, nítrico, sosa y potasa no se recomiendan ya que resultan más peligrosas y menos efectivas que el ácido sulfúrico. (Hatmann y Kester, 1999).

Escarificación mecánica: Consiste en perforar o lijar la cubierta externa de las semillas o bien hacerles cortes, en semillas impermeables el tratamiento puede ser efectivo, el trabajo puede hacerse a mano, especialmente para fines de laboratorio, la escarificación manual requiere de mucha mano de obra, su empleo únicamente se justifica para las semillas del durazno, en las que la cubierta leñosa puede eliminarse fácilmente de un golpe (Camacho, 2000).

Estratificación consiste en que las semillas embebidas en agua son sometidas a un periodo de enfriamiento para que se efectúe la post maduración del embrión, las semillas se

colocan en capas intercaladas con medio húmedo como tierra o arena (Hatmann y Kester, 1999).

Reguladores de crecimiento: Las sustancias más empleadas son las giberelinas, en algunos casos pueden sustituir el empleo del enfriamiento en húmedo. Los productos comerciales (Progib y Activol) tienen concentraciones del 10% y vienen listos para disolverse en agua, se emplean en preparaciones de 500 a 1000 ppm y las semillas se someten a remojo por lapsos de 12 a 24 horas en obscuridad, otro compuesto es la tiourea, se emplean soluciones más concentradas de 0.5 al 2%; se ha utilizado la aplicación de soluciones de nitrato de potasio, en algunas especies se ha encontrado que el agua oxigenada puede estimular la germinación, mediante el remojo en soluciones comerciales del 2 al 3% (Camacho, 2000).

Factores que Afectan la Germinación de las Semillas

La baja germinación puede deberse a las propiedades genéticas de ciertos cultivares, desarrollo incompleto en la planta, daños durante la cosecha, procesamiento inadecuado, almacenamiento impropio, enfermedades y envejecimiento, también pueden influir los factores internos de la semilla y factores ambientales, por lo general la pérdida de viabilidad va precedida por un periodo de declinación del vigor (Hartmann y Kester, 1999).

Dormancia: Las semillas sanas y sin daños que fallan al germinar después de ser colocadas en condiciones adecuadas para la germinación; estas semillas se dice que son dormantes, la dormancia es el resultado de la interacción de las condiciones ambientales impuestas y las propiedades hereditarias de las plantas, la dormancia también puede deberse al bloqueo de la imbibición de agua, la activación de los procesos metabólicos y el crecimiento del embrión, bajo condiciones naturales, en vivero o en laboratorio, las semillas dormantes pueden ser inducidas a germinar en un período de tiempo razonable (Krugman, *et al.*, 1974).

Si las semillas que maduran en otoño (caso de género *Pinus*) germinaran de inmediato es muy probable que sus plántulas murieran en el invierno, por lo cual muchas de estas semillas requieren de enfriamiento invernal para germinar, haciéndolo hasta la primavera y verano siguiente (Hartmann y Kester, 1999).

Viabilidad: La viabilidad es la cualidad de una semilla de ser potencialmente capaz de germinar, esta calidad se ve influida por factores que actúan antes y después de la maduración de las semillas, después de que la semilla ha madurado, hay un período en el cual ésta es capaz de germinar, la duración de este período está influenciada por la especie, las condiciones de almacenamiento de la semilla, sus fluctuaciones de humedad y el estado de latencia de la semilla, todos los lotes de semillas pasan por un período en el cual su viabilidad permanece más o menos constantes, aunque con la tendencia natural a disminuir, una vez superado este período, el envejecimiento se acelera hasta que todas las semillas del lote pierden su capacidad para germinar (Hartmann y Kester, 1999).

Agua: El contenido de agua es un factor muy importante en el control de la germinación de la semilla, la capacidad de absorción de agua durante la imbibición varía con la naturaleza de la semilla y la permeabilidad de las cubiertas, la absorción depende también de la disponibilidad de agua en el medio circundante, las temperaturas elevadas aumentan la absorción de agua.

En ocasiones antes de la siembra se remojan las semillas para acelerar su germinación y superar ciertos problemas de letargo; el exceso de agua puede ser atrapado entre los cotiledones y sofocar al embrión, los resultados más perjudiciales se han atribuido a los efectos de microorganismos y a una reducción de la provisión de oxígeno (Hartmann y Kester, 1999).

Aireación: Un buen intercambio de gases entre el medio de germinación y el embrión, es básico para una germinación rápida y uniforme, el oxígeno es esencial para el proceso de respiración de la semilla en germinación; la provisión de oxígeno puede estar limitada por la condición del medio de germinación o por restricciones impuestas por las cubiertas de la

semilla, la provisión de oxígeno es escasa donde hay un exceso de agua en el medio de germinación, pueden tener los espacios porosos llenos de agua por lo tanto hay poco oxígeno disponible para las semillas, la cantidad de oxígeno presente en el medio de germinación es afectado por su baja solubilidad en el agua y lenta difusión a un medio (Hartmann y Kester, 1999).

Evaluación de Plántulas y Semillas no Germinadas.

La evaluación de las semillas germinadas es importante; el analista de germinación reporta como normales sólo las plántulas que continuarán desarrollándose a formar plantas fuertes en condiciones de campo favorables, todas las plántulas débiles y mal formadas, se les considera como anormales y no se incluyen en el reporte de germinación.

Las semillas germinadas no se deben contar como normales y descartarse, sino hasta que han crecido lo suficiente para que el analista pueda observar si se encuentra presente las partes esenciales de las plántulas. (Vera, *et al.*, 1980).

Plántulas normales

Son plántulas normales, aquellas que poseen las estructuras esenciales que son indicativas de su habilidad para producir plantas normales bajo condiciones favorables:

- a) Se consideran plántulas normales aquellas que presentan las siguientes estructuras esenciales, siempre y cuando la prueba de germinación haya sido hecha en substrato artificial.
- b) Sistema radical bien desarrollado, incluyendo raíz primaria, excepto para aquellas plantas, que presentan normalmente raíces seminales, de las cuales deben estar presentes por lo menos dos.
- c) Hipocótilo bien desarrollado y sin daño en el tejido conductor.
- d) Plúmula intacta, presentando una hoja verde bien desarrollada dentro o emergiendo del coleóptilo, o un epicótilo entero y con la yema plumular normal.
- e) Un cotiledón en monocotiledóneas y dos cotiledones en dicotiledóneas.

2) Se consideran plántulas normales aquellas que presentan los siguientes defectos ligeros, siempre y cuando la plántula presente un desarrollo vigoroso y balanceado del resto de las estructuras vitales.

- a) Plántulas, que presente una raíz primaria dañada, pero con raíces secundarias lo suficientemente largas y vigorosas para sostener la plántula en el suelo.
- b) Plántulas con daño superficial o deterioro en el hipocótilo, epicótilo o cotiledones, siempre y cuando dicho daño no afecte los tejidos conductores.
- c) Plántulas dicotiledóneas presentando solamente un cotiledón sano.

3) Se consideran plántulas normales aquellas que se encuentren invadidas por hongos o bacterias, siempre y cuando sea evidente que la fuente de infección no es la misma semilla, y que las estructuras esenciales se encuentren presentes (ISTA, 1979).

Plántulas anormales

1) Se consideran anormales a todas las plántulas que no pueden ser clasificadas como normales, por tener alguna deficiencia en el desarrollo de sus estructuras esenciales.

2) Se consideran como plántulas anormales aquellas plántulas que presentan los siguientes defectos:

a) Plántulas dañadas sin cotiledones, con fisuras o lesiones que dañen el tejido conductor del hipocótilo, epicótilo o raíz; sin raíz primaria en aquellas especies donde esta raíz es una estructura esencial; excepto en las que se han desarrollado raíces secundarias vigorosas que sostienen la plántula en el suelo.

b) Plántulas deformes, plántulas con desarrollo débil o desequilibrado de las estructuras primordiales: plúmulas retorcidas en espiral; plúmulas, hipocótilo y epicótilo poco desarrollados, talluelos hinchados y raíces sin desarrollo, plúmulas hendidas o coleóptilos sin hojas verdes; plantas acuosas o bien plántulas que no presentan desarrollo después de haber salido de los cotiledones.

c) Plántulas con estructuras esenciales deterioradas por hongos o bacterias, de tal manera que su desarrollo está alterado, excepto en el caso que se determine que dicha infección no proviene de la semilla.

d) Plántulas mostrando desarrollo del cotiledón en el punto del micrópilo, o bien desarrollo de raíces en otra parte de la semilla que no sea el micrópilo. (ISTA, 1979).

Semillas no germinadas

Son aquellas semillas que no han germinado al concluir el período de una prueba ordinaria de germinación (Warham, *et al.*, S/A).

Al final del ensayo de germinación, las semillas que no han germinado se separan en las siguientes categorías:

Semillas duras, que son aquellas que no han absorbido agua como consecuencia de la impermeabilidad de sus cubiertas (Besnier, 1989; Moreno 1976).

Semillas firmes son aquellas que se embebieron pero no germinaron, ni tienen signos evidentes de descomposición, estas semillas a pesar del tratamiento aplicado permanecen durmientes (Camacho, 1994).

Semilla muertas, que son las que presentan un aspecto descolorido y están blandas y frecuentemente se encuentran invadidas por mohos (Besnier, 1989 ; Moreno 1976).

Almacenamiento de la Semilla

El almacenamiento comprende desde la maduración fisiológica hasta la siembra, durante este período, la humedad y la temperatura son los principales factores que afectan la calidad de la semilla, la aireación se utiliza tanto para enfriar como para reducir entre 1 y 3 % la humedad de la semilla, en las regiones con temperatura diaria superior a 30 °C se recomienda realizar la aireación preferentemente durante la noche y reducir la humedad durante un período máximo de 15 días. Para envasar se puede utilizar distintos materiales, como yute, papel multifoliado, aluminio y polietileno de diferente espesor (Silmar, 1985).

El almacenamiento ha de hacerse en condiciones tales que la capacidad germinativa de las semillas se conserven en un buen nivel durante el mayor tiempo posible (Besnier,1989).

SEP, (1982) menciona que antes de almacenar las semillas, se deben fumigar o espolvorear éstas con insecticidas, como fungicida se emplea generalmente un fungicida orgánico.

Como envase para semillas pequeñas, se utilizan bolsas plásticas, jarros de vidrio o cajas de hojalata, las semillas grandes se almacenan en sacos de lona o en cajas de hojalata.

Las semillas deben ser almacenadas en condiciones de baja humedad y temperatura. Para semillas de coníferas se recomienda un contenido de humedad de 10 por ciento y una temperatura de 5°C.

Semillas forestales

Camacho (1994). Menciona que los factores principales que determinan la duración de la semilla en el almacén son su contenido de humedad y su temperatura.

Muchas clases de semillas – quizá la mayoría – de plantas silvestres de la zona templada se conservan, mejor si son desecadas completa y cuidadosamente, colocadas en recipientes perfectamente cerrados y almacenados en refrigeración, las semillas de plantas enfermas o de otras poco vigorosas, generalmente tienen menos longevidad que la mayoría de las plantas normales, la longevidad de las semillas oleaginosas de los pinos está íntimamente ligada a la clase y cantidad de los ácidos grasos no saturados en ellas, otra sugestión es que la ranciedad de las grasas de las semillas de pino y de otras semillas varían inversamente con su viabilidad (Quick, 1984).

Camacho (1994) menciona que la mayoría de las semillas forestales son ortodoxas, son liberadas por la planta madre con contenidos de humedad menores al 20% y toleran ser

secadas hasta un 5% sin que mueran, la escasa cantidad de agua presente les permite mantenerse en frío a temperaturas de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ incluso hasta $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$, las circunstancias y la duración del almacenamiento depende de las especies de que se trate.

Besnier (1989) menciona que las semillas forestales pueden desecarse hasta bajos contenidos de humedad, de 4 al 8% y mantenerse en frío a temperaturas de 10 a 20°C bajo cero.

Camacho (1994) cita que el secado de las semillas forestales se hace de forma variable, según el volumen, su producción, localización y características, lo habitual es meter en los secadores las piñas cerradas y someterlas a temperaturas cada vez más altas, lo que hace que las piñas se vayan abriendo y que la semilla se vaya secando; en México para las necesidades de la reforestación, se han empleado con éxito envases cuadrangulares de hojalata (lata galleteras), donde las tapas se sellan con cera de campeche.

El almacenamiento en seco con humedad constante y sin control de temperatura, consiste en secar las semillas hasta su punto crítico, para posteriormente guardarlas dentro de un recipiente hermético, el cual tiene la función de impedir los cambios en el contenido de humedad, se recomienda el secado a temperaturas de 35 a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Camacho, 2000).

Aunque no ha sido comprobado, se cree que una cierta cantidad de semillas mueren debido a su sobre calentamiento, es probable que las semillas que retienen todo o parte de su revestimiento negro (epispermo) sobre la testa, absorban mucho calor y pueden calentarse a más de $50 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, y parece casi seguro que la semilla pierde por lo menos vigor, si no muere (Robins y Ochoa , 1983).

El efecto del contenido de humedad sobre la viabilidad y plagas de semillas almacenadas, se puede observar continuación (Camacho, 1994).

Contenido de humedad	Daño potencial
Menor de 5%	En algunas tolerantes al secado, pérdida de viabilidad por auto-oxidación líquida
De 5 a 10%	Ideal para una longevidad prolongada en las tolerantes al secado
Mayor de 10%	En semillas con actividad metabólica, tolerantes al secado, se reduce la viabilidad, más susceptibles al ataque de insectos y de hongos, con temperaturas mayor de 0°C.
Mayor de 18%	Se facilita el ataque de hongos, daños por calentamiento debido a una activa respiración de las semilla, puede haber daños por temperaturas inferiores a las de congelamiento.
Entre 20 y 30%	Es posible mantener la viabilidad de semillas no tolerantes al secado, con contenidos menores al límite inferior estas semillas mueren
Mayor de 30%	Ocurre la germinación, si las semillas no son durmientes, o si la temperatura lo permite, es prácticamente inevitable la muerte por congelamiento.

MALES Y METODOS

Ubicación del Area de Trabajo

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología, de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Material Utilizado

Cuadro2. Material utilizado en la detección de microorganismos, que corresponden a tres especies de semillas forestales con diferente año de colecta y lugar de procedencia.

Muestra	Especie	Año de colecta	Procedencia
1	<i>Pinus cembroides</i>	1998	Jaguey de Ferniza, Arteaga, Coah.
2	<i>Pinus greggii</i>	1998	Jaguey de Ferniza, Arteaga, Coah.
3	<i>Cupressus sempervirens</i>	1985	UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah.
4	<i>Pinus cembroides</i>	1998	Jaguey de Ferniza, Arteaga, Coah.
5	<i>Pinus greggii</i>	1999	Jaguey de Ferniza, Arteaga, Coah.
6	<i>Cupressus sempervirens</i>	1999	UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah.

Detección de Hongos y Bacterias.

Para la detección de microorganismos se incubaron las semillas por el método del papel secante, se tomaron 25 semillas de cada especie, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 por ciento durante tres minutos se enjuagaron con agua destilada estéril para retirar el exceso de hipoclorito de sodio; a 10 semillas de *Pinus cembroides* se les quito la

testa, se colocaron las semillas en cajas petri de vidrio con dos capas de papel filtro previamente esterilizados; el papel se humedeció con agua destilada estéril; posteriormente se colocaron cinco semillas por caja, con cinco repeticiones, realizándose en una cámara de transferencia.

Después de ser colocadas las semillas se sellaron las cajas con Kleen pack, las cajas se colocaron en una estufa, para su incubación, a una temperatura de 28 °C; por un período de aproximadamente 15 días, realizándose constantemente evaluaciones para la detección de hongos y bacterias.

Identificación de hongos

Para la identificación de hongos, se utilizó una aguja de disección para realizar montas semipermanentes en porta objetos con azul de metileno y lactofenol; apoyándose con un Microscopio compuesto y con las claves de Barnett y Hunter (1989), para Deuteromycetes; Pitt y Hocking (1985), para los Mucorales.

Identificación de bacterias

Para la identificación de bacterias se utilizaron los medios nutritivos o diferenciales y las pruebas bioquímicas, realizando siembras en medio de Agar Nutritivo (AN), apoyándose con una asa bacteriana la cual se deslizó por los exudados de diferente color que se presentaban en la superficie de las semillas de *Pinus cembroides* escarificadas, en *Pinus greggii* los exudados se presentaron en el ápice de la semilla y en la superficie de la misma; formando estrías en el medio, la siembra se realizó en una cámara de transferencia, se sellaron las cajas con Kleen pack, se incubaron por 24 hrs a 28 °C.

Debido a la presencia de diferentes crecimientos en el medio se separaron las colonias por el método de la estría seriada, una vez separadas las colonias, se tomó crecimiento de las mismas y se sembraron en AN.

Después de incubarse por 24 horas se les realizó la tinción de Gram, solo se tomaron las cepas que presentaron una tinción negativa que corresponde principalmente a las bacterias fitopatógenas por ser las de interés, se prosiguió a sembrarlas en los medios diferenciales KB, YDC, D3K, D1M y CVP propuesto por Schaad (1994) para llegar a género; para llegar a especie se realizaron las pruebas bioquímicas de LOPAT (Levana, Oxidasa, Pudrición de papa, Arginina e Hipersensibilidad a tabaco) propuesto por Lelliott y Stead (1987), el cual se aplica a las bacterias del género *Pseudomonas* del grupo fluorescentes, se compones de las siguientes pruebas:

Medio levana	gr/l
Agar nutritivo	23
Sucrosa	50
Agua destilada	1000 ml

Se siembra la bacteria por el método de punción en placas sólificadas de medio de levana y se lleva a incubación por espacio de 24 hrs. La prueba es positiva cuando el crecimiento bacterial se presenta en forma de colonias domadas de color claro y redondas.

Prueba de oxida:

Para la prueba de oxida se usan cultivos de 24 hrs de crecimiento. Se toma un poco de crecimiento bacteriano con un palillo de dientes y se deposita en papel filtro impregnado con solución de tetramethyl-p-phenylene diamane dihydro chloride al 1% cuando se desarrolla un color azul púrpura después de 10 segundos y antes de 30 segundos, la prueba es positiva.

Arginina:

El sistema enzimático de hidrolasa de arginina permite que ciertas *Pseudomonas* crezcan bajo condiciones de anaerobiosis. El medio que se utiliza para esta prueba es el de Thornleg's

Medio Thornleg's

Peptina	1 gr
NaCl	5 gr
K ₂ HPO ₄	0.3 gr
Agar	3 gr
Rojo fenol	0.01 gr
Arginina HCl	10 gr

Se ajusta el pH a 7.2 (debe de quedar el medio de color rosa). Se inoculan los tubos con la bacteria y se sellan con 0.5 ml de aceite mineral estéril se incuba hasta por siete días a 28 ° C. La observación de un cambio de color de rosa a rojo indica que la prueba es positiva.

Hipersensibilidad a tabaco:

Algunas bacterias del género *Pseudomonas* del grupo *Pseudomonas syringae*, *P. viridiflava* y *P. cichorri*, inducen cierta reacción en hojas de tabaco (*Nicotiana glauca*). La prueba consiste en una infiltración de solución bacteriana (a una concentración de 10^8 - 10^9 (unidad formadora de colonias) ufc/ml), en la nervadura principal de una hoja de tabaco con la ayuda de una jeringa de insulina, como testigo se realiza el mismo procedimiento en otra hoja de la misma planta pero infiltrada con agua estéril la reacción es positiva cuando la hoja infiltrada presenta cierta sintomatología de daño que puede ir desde amarillamiento, arrugamiento hasta necrosis en un tiempo de 24 – 48 hrs.

Pruebas rápidas de patogenicidad en rodajas de papa y zanahoria

Una vez identificado el género de acuerdo a los medios diferenciales, se realizaron las pruebas rápidas de patogenicidad, con alcohol se flameó una papa y una zanahoria previamente lavadas cuidadosamente, se cortaron en rebanadas, se colocaron en cajas petri de vidrio esterilizadas, con dos capas de papel filtro humedecidos con agua estéril; con una asa bacteriana, se tomo crecimiento bacteriano de los medios diferenciales y se colocó en una incisión que se les hizo a las rebanadas, se sellaron con Kleen pack y se metieron a la incubadora a 28°C.

Germinación

La semilla se separó con el fin de obtener semilla pura, las semillas de *Pinus greggii* y *Cupressus sempervirens* se llevaron al Departamento de Semillas a separarlas en el soplador, el proceso consistió en colocar aproximadamente 20 gr de semilla en el tubo, regulándose la ráfaga de aire con la calibración de la tapa; las semillas de *Pinus cembroides* se separaron por flotación con acetato de etilo, (Flores, 1999) para la utilización de esta sustancia se utilizó equipo especial ya que debe manejarse con mucho cuidado por que es altamente peligrosa.

Antes de colocar las semillas a germinar; se tomaron 100 semillas al azar de las muestras 1,2 y 3, se colocaron en un matraz con agua estéril durante 24 horas para que se embebieran, la germinación se realizó en papel germinador, se etiqueto, posteriormente se humedeció con agua destilada estéril mezclada con Captan (1 gr/l) se colocaron 100 semillas en forma equidistante y luego se colocó otra lamina de papel encima, para después envolverla y formar tacos, se hizo un taco para *Pinus greggii* y *Cupressus sempervirens*; para *Pinus cembroides* se realizaron dos tacos de 50 semillas cada uno, se colocaron en una bolsa de polietileno para llevarlos a la cámara germinadora a una temperatura de 21°C, se evaluó durante tres semanas, regándolas periódicamente evaluando plántulas normales, anormales, semillas no germinadas y vigor de las plántulas.

Se realizó una segunda prueba comparativa de germinación la cual corresponde a las muestras 4,5 y 6 realizándose el mismo procedimiento de la primera prueba de germinación, las semillas se colocaron en papel filtro para hacer los tacos y se regaron periódicamente con agua destilada estéril mezclada con Captan (1gr/l); se evaluó durante tres semanas.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los microorganismos encontrados en las semillas corresponden a hongos y bacterias, afectando principalmente a las muestras 1, 2 y 4 (ver Cuadro 3.), ya que algunos hongos se presentaron con mayor incidencia que otros, los hongos presentes en las semillas son reportados como hongos de almacén.

Cuadro 3. Número de semillas con microorganismos, encontrados en las semillas de *Pinus cembroides*, *P. greggii* y *Cupressus sempervirens*.

Hongos	M1	M2	M3	M4	M5	M6
<i>Penicillium expansum</i>	18	0	0	16	0	0
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0	11	0	0	0	0
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	0	4	0	0	0	0
<i>Ascochyta sp</i>	0	0	0	0	0	3
Bacterias	28	40	0	0	0	0
<i>Xanthomonas sp</i>	X	0	0	0	0	0
<i>Erwinia sp</i>	X	0	0	0	0	0
<i>Agrobacterium sp</i>	0	X	0	0	0	0
<i>Pseudomonas agaricae</i>	0	X	0	0	0	0

M1 = *Pinus cembroides*

M4 = *P. cembroides*

M2 = *Pinus greggii*

M5 = *P. greggii*

M3 = *Cupressus sempervirens*

M6 = *C. sempervirens*

X = Presencia de exudado bacteriano en las semillas

En la M1 al igual que en la M4 (*P. cembroides*) se aisló de las semillas el hongo *Penicillium expansum*, (Cuadro 3.), el cual se reporta dentro del grupo de hongos de almacén (Moreno, 1978), afectando comúnmente la viabilidad de las semillas al

invadirlas; esta especie produce toxinas como son la patulina y la citrinina (Moreno, 1988), estas toxinas pueden afectar la salud del hombre así como a sus animales domésticos (Agrios, 1986), la importancia de esto es que esta semilla es destinada al consumo humano (Rezdowski, 1983).

El hongo *Rhizopus stolonifer* y *Syncephalastrum racemosum*, aislados de las semillas de la M2 (*P.greggii*), el primero se considera dentro del grupo de deterioro avanzado, invadiendo granos en pésimas condiciones de almacenamiento (De la Garza, 1996), el segundo se ha aislado de alimentos en fermentación, (Pitt y Hocking, 1985), se consideran como degradadores de la materia orgánica (De la Garza, 1996), su incidencia en las semillas no es muy relevante.

Las bacterias presentes en las semillas *Agrobacterium*, *Xanthomonas* y *Erwinia*, no fué posible, identificarlas hasta especie por el extravió de las sepas en el laboratorio de Fitopatología al igual que las pruebas rápidas de patogenicidad realizadas. En *Pseudomonas* se identificó la especie por el método de LOPAT (- + - - -), propuesto por Lelliott y Stead, 1987, dando como resultado las reacciones siguientes:

Levana (negativa)

Oxidasa (positiva)

Pudrición de papa (negativa)

Deshidrolasa de Arginina (negativa)

Hipersensibilidad a tabaco (negativa)

Esto dio como resultado a la especie *Pseudomonas agaricae*, la cual ha sido reportada afectado hongos comestibles, carece de importancia económica (Lelliott y Stead, 1987).

Los microorganismos pueden afectar la viabilidad y la calidad de la semilla, si el manejo y almacenamiento de los conos y semillas no es el adecuado, pero no son la causa principal de la baja germinación, en este caso, de las semillas ya que están influyendo otros factores en la misma, principalmente en *P. greggii* y *Cupressus sempervirens*.

Los microorganismos encontrados en las muestras de semillas se clasificaron de acuerdo a Vázquez y Pineda (1989), como endobióticos los que se encuentran dentro de la testa y epibióticos los que se encuentran en la superficie de la testa (Cuadro 4.) los microorganismos endobióticos encontrados fueron principalmente bacterias y los epibióticos a hongos a excepción de la bacterias *Pseudomonas agaricae*

Cuadro 4. Microorganismos encontrados en las semillas clasificados como endobióticos y epibióticos de acuerdo a Vázquez y Pineda, (1989).

Endobióticos	Epibióticos
<i>Erwinia sp</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>Agrobacterium sp</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
<i>Xanthomonas sp</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
	<i>Ascochyta sp</i>
	<i>Pseudomonas agaricae</i>

Las bacterias presentes en las semillas, se encontraron principalmente dentro de la testa de la semilla (endobióticos), siendo estas las que causaron mayores estragos en las mismas, debido a que las degradaban completamente.

El número de plántulas normales corresponde al número de semillas consideradas como germinadas, esto es de acuerdo al concepto de germinación (ISTA, 1985); (ver Cuadro 5.), no se considera como porcentaje de germinación por que la muestra utilizada no es representativa para una prueba de germinación.

Cuadro 5. Número de plántulas normales (germinación) y anormales, semillas duras, semillas firmes y semillas infectadas.

Variables evaluadas	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Plántulas normales	37	13	0	80	28	0
Plántulas anormales	4	5	0	4	0	0
Semillas no germinadas:						
- Semillas duras	8	9	100	0	7	97
- Semillas firmes	5	18	0	0	65	0
- Semillas infectadas	46	55	0	16	0	3
Sumatoria	100	100	100	100	100	100

M1 = *Pinus cembroides*

M4 = *P. cembroides*

M2 = *Pinus greggii*

M5 = *P. greggii*

M3 = *Cupressus sempervirens*

M6 = *C. sempervirens*

En la germinación se observó que, la M1 y la M2 (*Pinus cembroides* y *P. greggii*), presentaron de 100 semillas, germinaron 37 y 13 respectivamente, el resto en su mayoría estaba infectada por hongos y bacterias presentándose una mayor incidencia de bacterias, los hongos detectados en las semillas afectan la viabilidad de las mismas durante su almacenamiento si este no es el adecuado (Morenos, 1982), las bacterias también afectan a la semilla ya que la pudren (Neergaard, 1979).

En la M3 y la M6 (*Cupressus sempervirens*), las semillas no germinaron, esto tal vez debido a que la cubierta de la semilla es impermeable ya que las semillas no presentaban un aspecto hinchado o aguanoso por lo tanto se reportaron como semillas duras de acuerdo a Moreno (1976) y Besnier (1989); o el tratamiento para romper dormancia no fue el adecuado (Camacho, 1994), la dormancia puede ser hereditaria y puede deberse al bloqueo de la imbibición de agua (Krugman, *et al*, 1974).

En la M4 (*P. cembroides*) a pesar de ser colectada en el mismo año y localidad que la M1, presentó un mayor número de semillas germinadas, dando origen a 80 plántulas

normales, esto es por que la muestra cuatro estaba en diferentes condiciones de almacenamiento por lo tanto la viabilidad de la semilla no fue visualmente afectada por microorganismos, principalmente bacterias.

La M5 (*P. greggii*), presenta 28 un número de semillas germinadas muy bajo, la mayor parte de las semillas estaban embebidas, no presentaban un aspecto aguanoso, considerándose como semillas firmes de acuerdo a Camacho (1994), las semillas se colocaron en agua durante 24 hrs, para que se embebieran utilizándose este proceso como un tratamiento para romper latencia, algunas veces el exceso de agua puede ser atrapado en los cotiledones y sofocar al embrión por la reducción del oxígeno (Hartmann y Kester, 1999)

Las plántulas reportadas como anormales, presentaban sus estructuras esenciales afectadas por microorganismos presentes en las semillas (ISTA; 1979).

Las semillas una vez invadidas por bacterias no germinan, así sea interna o externamente la infección, sin embargo en algunos casos las semillas estaban invadidas externamente (testa) por hongos y llegaban a germinar, originándose de ellas una plántula normal, esto tal vez debido a que el hongo a un no invadía los cotiledones de la semilla.

CONCLUSIONES

1.- Los microorganismos detectados en las semillas y durante su germinación de *Pinus cembroides* fueron *Penicillium expansum*, *Erwinia sp* y *Xanthomonas sp*; en *Pinus greggii* se detectaron *Rhizopus stolonifer*, *Syncephalastrum racemosum*, *Agrobacterium sp* y *Pseudomonas agaricae* y en *Cupressus sempervirens*, solo se aisló *Ascochyta sp* .

2.- Dentro de los hongos el de mayor importancia es *Penicillium expansum*, ya que este tiene una gran facilidad para desarrollarse con una baja humedad en las semillas, y es considerado como uno de los causantes de la pérdida de viabilidad de la mayoría de las mismas, aunado a esto produce toxinas como son la patulina y la citrinina, las cuales en ciertas cantidades causan enfermedades, a los animales domésticos y al hombre; el de menor importancia es *Ascochyta sp*, ya que no se ha reportado que ha sido aislada de granos o se considere que afecte la viabilidad de las semillas.

3.- Los géneros de bacterias identificados en las semillas son de gran importancia dentro de la Fitopatología, las bacterias que se detectaron en las semillas tanto saprofitas como patógenas degradaron completamente a la semillas, considerándose más severo el daño por ellas, que por hongos.

4.- Los microorganismos pueden afectar la viabilidad y la calidad de la semilla si esta no es almacenada adecuadamente, pero también puede influir la dormancia de las semillas, entre otros factores de tipo genético.

RECOMENDACIONES

1.- El método de incubación en papel secante para la detección de hongos y bacterias es el más sencillo y económico, pero este puede tener la desventaja de que los hongos y bacterias saprófitos se desarrollen más rápido que los microorganismos de interés fitopatógeno.

2.- En las pruebas de germinación a veces se presentan problemas de infección en las semillas por hongos o bacterias ya sea que procedan de las semillas o que sean contaminantes, para ello se recomienda que una vez detectada una semilla infectada con hongos o bacterias se debe retirar de las demás semillas para evitar el contacto entre ellas o que el agua sea un factor de dispersión y contamine a las demás semillas.

3.- Para la identificación de bacterias se utilizaron los medios selectivos y posteriormente las pruebas bioquímicas, estas pruebas son las más acertadas, la desventaja de estas es que algunas reacciones tardan mucho para manifestarse prolongándose así el tiempo del diagnóstico, en la actualidad existen otras pruebas más rápidas para el diagnóstico de las bacterias como pueden ser el PCR, el método serológico y otros.

4.- Los microorganismos detectados en el presente trabajo, principalmente los hongos son reportados como hongos que afectan la viabilidad de los granos durante su almacenamiento, es por ellos que se hacen las siguientes recomendaciones:

a) Las semillas a almacenar deben de secarse, con un contenido de humedad del 6 al 8 %, ya que estas semillas están clasificadas como ortodoxas, toleran ser secadas hasta un 5%, sin perder su viabilidad, el secado debe de ser de preferencia en estufa, ya que algunas investigaciones realizadas en Honduras, mencionan que el secado al sol ocasiona pérdida en la viabilidad de las semillas por calentamiento de la misma.

b) Una vez, ya secas las semillas se pueden almacenarse a bajas temperaturas, a 3°C o menos ya que debido al secado de la semilla, toleran ser almacenadas a temperaturas de – 18°C o más. Se debe evitar lo más posible abrir constantemente los envases ya que se puede alterar la humedad del grano.

c) Cuando no se tiene la posibilidad de almacenar las semillas en cuartos frío o refrigerador, se pueden almacenar en un cuarto con una buena ventilación, sin control de temperatura y con humedad constante, los envases más utilizados en México son principalmente latas galleteras con tapa, y se sellan con cera de campeche para evitar los cambios de contenido de humedad de la semilla, las semillas pueden ser protegidas con algún fungicida como el Captan o el Metalaxil.

BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G.N. 1986. Fitopatología. Segunda edición. Editorial UTEHA. México. 838 pp.
- Alexopoulos, C.J., C. W. Mims. y M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. 4ta edición. John Wiley and Sons. Inc. USA. 869 pp.
- Andersen, M. A. y Ch. M. Leach. 1984. Semillas. Anuario de Agricultura. The United States Department of Agriculture. Novena reimpression. Editorial Continental. p 17, 42.
- Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1986. Illustrated genera of imperfect fungi. Cuarta edición Editorial Mcmillan. New York, USA. 218 pp.
- Braham, S. S. 1999. Comunicación personal. Maestro investigador del Departamento de Forestal. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Besnier, R. F. 1989. Semillas, Biología y Tecnología. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 627pp.
- Bloomberg. 1969. Diseases of Douglas fir seed during cone storage. Forest Science. Vol. 15. No. 2. pp 176-181.
- Brumm, F. y O. Burchards. 1970. La multiplicación de las frondosas y de las coníferas. Primera edición. Editorial Blume, Barcelona, España. pp.
- Camacho, M. F. 1994. Semillas forestales. Pruebas de germinación y viabilidad. Publicación especial. Bol. divulgativo No. 2. INIFAP. 137 pp
- Camacho, M. F. 2000. Dormición y quiescencia en el manejo de las semillas forestales. En: Gaceta de la Red Mexicana de Germoplasma Forestal. No. 4. 100 pp
- Chávez, R. R. 1994. Fisiología y morfología de plántulas en diez procedencias de *Pinus greggii*, en invernadero. Tesis de Licenciatura. UAAA, Buenavista, Saltillo, Coah, Méx., 66 pp.
- Christensen, Cl. M. y H. H. Kasumann. 1980. Semillas. Anuario de Agricultura. The United States Department of Agriculture. Séptima reimpression. Editorial Continental. p 17, 42.
- Cibrian, T. D. 1986. Insectos de conos y semillas de las coníferas de México. Publicado por la Estación Experimental Forestal del Sureste Asheville, Carolina del Norte; p1.

- Copeland, L. O. y M. B. McDonald. 1985. Principles of seed science and technology. Second edition. Macmillan Publishing Company. USA. 321 pp.
- Cuisance, P. 1988. La multiplicación de las plantas y el vivero. Ediciones Mundi-Prensa. p 25, 27.
- De la Garza, G., J. L. 1996. Fitopatología general. UANL, Facultad de agronomía, Marín, N.L., Méx., 556 pp.
- Dhingran O. y J. B. Sinclair. 1995. Basic Pathology Methods. Second edition. Lewis Publishers. USA. 434 pp.
- Escobar, B. 1966. Empleo de hormonas en la multiplicación de *Salix babylonica*, *Ulmus pumilla* y *Cupressus sempervirens* por el sistema de acodado. Tesis de Licenciatura. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila. P 3.
- Espejel, C.O. 1993. Efectos de diferentes regímenes de fertilización sobre el crecimiento de *Pinus greggii* en etapas de vivero. Tesis. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah, Méx., 81 pp.
- FAO. 1968. Notas sobre semillas forestales. Cuaderno de fomento forestal. No. 5. Segunda impresión. Yugoslavia. p 79,136.
- Flores, L. C. 1999. Comunicación personal. Maestro Investigador del Departamento de Forestal. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Fonseca, V. S. y R., Meza. 1995. Epoca de siembra de 12 especies Forestales de Baja California Sur. Revista Ciencia Forestal en México. 20 (78): 60-61.
- García, M. A. 1971. Patología vegetal práctica. Editorial Limusa. México. p 49.
- García, A. A. y M. S. E. González. 1998. Pináceas de Durango. Instituto de Ecología. Dgo, México. 179 pp.
- Hansen, M. E. y J. K. Lewis. 1997. Compendium of conifer diseases. The American Phytopathological Society. USA. 101 pp.
- Hartmann, H.T. y D.E. Kester. 1999. Propagación de plantas principios y prácticas. Séptima reimpresión. CECSA, México. 733 pp.
- Henderson, L. S. y M. Cl. Christensen. 1980. Semillas. Anuario de Agricultura. The United States Department of Agriculture. Séptima reimpresión. Editorial Continental. 626 pp
- ISTA. 1964. Reglas Internacionales para el ensayo de semillas. Vol. 24. No 3. Cuarta edición en español. Editorial Rabasa. México, D.F. p 57.

- ISTA. 1979. Internacional Seed Testing Asociation. Handbook for Seedling Evaluation. Zurich, Switzerland. 129 pp.
- ISTA. 1985. Internacional Seed Testing Asociation. Internacional Rules for Seed Testing, Seed , Sci and Technol, 13(2):366-520.
- Krugman, S. L., W. I. Stain y D. M. Schmitt. 1974. Seed biology. Agriculture Handbook. No. 450. USA. Forest Service. Editorial Washington, D.C. p 21-34.
- Lelliott, R. A. and D. E Stead. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Vol. 2. British Society for Plant Patology. 211 pp.
- Lemus, S., J.L. 1999. Maduración de conos, producción y viabilidad de la semilla de *Pinus catarinae*. Tesis de Licenciatura. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah, Méx. 125 pp.
- Manners, J. G. 1986. Introducción a la Fitopatología. Primera edición. Editorial Limusa. 277 pp.
- Martínez, M. 1948. Los pinos mexicanos. Segunda edición. Ediciones, Botas; 337 pp.
- Martínez, R. S. 1989. Propuesta para el uso múltiple de los bosques de *Pinus cembroides* Zucc. En: Memoria Congreso Forestal Mexicano, Tomo I. 564 pp.
- Masao, G. 1992. Fundamentals of bacterial plant pathology. Academic Press.Inc, San Diego, California, USA. 342 pp.
- Moreno, M. E. 1976. Manual para el análisis de semillas. Instituto de Biología. UNAM. México, D. F. pp 72 – 75.
- Moreno, M. E. y J. Zamora. 1978. Guía para evitar problemas causados por hongos en semillas y granos almacenados. UNAM. México, D.F. 47 pp
- Moreno, M. E. 1982. Curso actualización sobre tecnología de semillas. Memoria. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah, México. pp 50-57
- Moreno, M. E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. UNAM, México, D.F. 109 pp
- Navarrete, M. R. 1995. Patología de semillas. I curso: Taller Internacional de métodos para la detección de patógenos en semillas. Memoria. Buenavista, Saltillo, Coah, Méx. pp
- Neergaard, P. 1979. Seed pathology. Editoria Macmillan. London, England. 1025 pp.
- Niembro, R. A. 1980. Estructura y clasificación de semillas de especies forestales mexicanas. UACH. Texcoco, México. p 13.

- Niembro, R. A. 1986. Mecanismos de reproducción sexual en pinos. Editorial Limusa. México. p 100-101.
- Patiño, V. F., L.M. Garza., A. Y. Villagómez., A. I. Talavera. y M. F. Camacho. 1993. Guía para la recolección y manejo de semillas. INIFAP. Bol. divulgativo No. 63. México. 181 p.
- Perry, J. P. 1991. The pine of México and Central América. Timber Press, Portland, Oregon, USA. 231 pp.
- Pitt y Hocking. 1985. Fungi and food spoilage. Academic Press. New York, USA. pp 143-167.
- Quick, Cl. R. 1984. Semillas. Anuario de Agricultura. The United States Department of Agriculture. Novena reimpression. Editorial Continental. pp 181, 182, 185.
- Robins J. A. M. y M. O. Ochoa. 1983. En: Reunión sobre problemas en semillas forestales tropicales. Tomo III. SARH. p 45-51.
- Rodríguez, M., Ma. L. 1994. Manual de identificación de bacterias fitopatógenas. UACH, Texcoco, México. 114 pp.
- Rodríguez, S. H y F. M. Navarro. 1975. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semilla. Sría de Agricultura y Ganadería Dirección General, México. 112 pp.
- Rudolf P.O. 1980. Semillas. Anuario de Agricultura. The United States Department of Agriculture. Séptima reimpression. Editorial Continental. p 407.
- Rzedowski, J. 1983. Vegetación de México. Editorial Limusa. México, D.F. 397 pp.
- SEP. 1982. Producción Forestal. Manuales para la educación agropecuaria. 5ª reimpression. Editorial Trillas. p 68-69.
- Schaad, N. W. 1994. Plant pathogenic bacteria. Laboratory guide for identification. Segunda edición. Editorial APS Press. 159 pp.
- Silmar T. P. 1985. Revisión de la investigación sobre acondicionamiento de semilla en América Latina. Memorias de Investigación y Capacitación en Producción y Tecnología de semillas. CIAT. Cali, Colombia. p 67
- Sinclair, J. B. 1978. Seed pathology. Seed Technology Laboratory. Mississippi, USA. Vol 21. P 7.
- Toole, E. H. y T. V. Kearns. 1984. Semillas. Anuario de Agricultura. The United States Department of Agriculture. Novena reimpression. Editorial Continental. p 192.

- Vázquez, C. I. y A.M. Pineda. 1989. Microorganismos asociados a la semilla de tres especies de pinos y formas de desinfección. V Simposio sobre Parasitología Forestal. Cd. Juarez, Chihuahua, México. pp
- Vera L. C., T. F. Swofford. y R. P. Moore. 1980. Semillas. Anuario de Agricultura. The United States. Departament of Agriculture. Séptima reimpresión. Editorial Continental. p 771.
- www.guiaverde.com/arboles. S/A
Last modified on: 18-Apr-1999 – 10K bytes – in Spanish (Win-1252)
- Wang, B. S. P. y T. Beardmore. 2000. Almacenamiento y manejo de Germoplasma. En: La Gaceta de la Red Mexicana de Germoplasma Forestal. No. 4. 100 pp.
- Warham, E. J., **Butler.**, y S/A. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo, manual de laboratorio. CIMMYT. 84 pp.
- Warham, E. J. 1984. III Curso de actualización de semillas. Memoria. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. pp 120-133.
- Zavala Ch. F. y M de J. Camacho. R. 1995. Fenología y crecimiento de acículas de *Pinus greggii* Engelm. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales. Vol. I. No 1. Chapingo, Texcoco, México. 149 pp.