

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Desarrollo de Un Protocolo de Germinación de las Semillas de *Cecis canadensis*
L. para su Conservación *Ex Situ*

Por:

SAGRARIO CASTILLO GUTIÉRREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Desarrollo de Un Protocolo de Germinación de las Semillas de *Cercis canadensis*
L. para su Conservación *Ex Situ*

Por:

SAGRARIO CASTILLO GUTIÉRREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada por el Comité Asesoría:



Dra. Aida Isabel Leal Robles
Asesor Principal



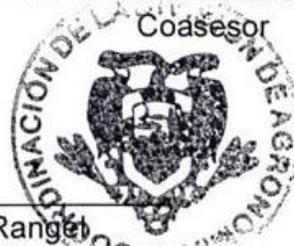
Dr. Alonso Méndez López
Coasesor



M. C. Laura María González Méndez
Coasesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Coordinador de la División de Agronomía.



Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2025

Derechos de Autor y Declaración de no plagio

Todo material contenido en estas memorias de experiencias profesionales está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

Autor principal

Asesor principal

Sagrario Castillo Gutierrez



Firma y Nombre



Firma y Nombre

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la vida, la salud y por permitirme terminar mi carrera con esfuerzos y sacrificios.

A mis padres Pedro Castillo Galicia y Cristina Gutiérrez Valle por su amor incondicional y por siempre haberme apoyado en cada etapa de mi vida y por cada esfuerzo que hicieron para poder yo terminar mis estudios, muchísimas gracias papas.

A mi hermano Néstor Castillo Gutiérrez por haber confiado en mí e inspirarme a estudiar y apoyarme cuando lo necesite.

A mi hermana Viridiana Castillo Gutiérrez y su esposo por brindarme su ayuda y sus consejos.

A mi hermano Víctor Daniel Castillo Gutiérrez por su apoyo incondicional, por cada consejo y por cada momento que estuvo presente.

A mi hermano Aldo Castillo Gutiérrez gracias hermano por estar siempre presente cuando te he necesitado.

A mi hermosa Universidad por abrirme las puertas para estudiar.

A mis abuelitos Ramón y Fausta por esos sabios consejos que siempre recibí.

A mis amigos de la universidad Olí Adela Gatica Sánchez, Nanglis López Domínguez, Edgar David Gonzales Hernández, Jose Rodolfo Simental de la paz por estar conmigo en esta etapa de mi vida.

A mis maestros por contribuir con lo que aprendí en su clase

A la Dra. Aida Isabel Leal Robles por la paciencia y por darme la confianza para realizar esta tesis.

A mi esposo Jose Alejandro Estrada Morales por inspirarme a terminar mi tesis y apoyarme en estos momentos.

DEDICATORIAS

A mi hijo Fabián Matías Estrada Castillo.

A mis padres Pedro y Cristina.

Índice de contenido

AGRADECIMIENTOS	
DEDICATORIAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo general	4
3.2 Objetivos específicos	4
4. HIPÓTESIS	5
5. REVISIÓN DE LITERATURA	6
5.1 Aspectos generales de las categorías taxonómicas de la Clase Magnoliopsida y Familia Fabaceae	6
5.2 Descripción taxonómica de la especie <i>Cercis canadensis</i> L.	7
5.3 Características botánicas <i>Cercis canadensis</i> L.	8
5.4 Aprovechamiento cultural de <i>Cercis canadensis</i> L.	9
5.6 Latencia de semillas	11
5.7 Fundamento de la técnica de cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	12
5.8 Cultivo <i>in vitro</i> de especies nativas	13
6. MATERIALES Y METODOS	16
6.1 Establecimiento del experimento	16
6.2 Material biológico	16
6.3 Tratamientos pregerminativo	16
6.4 Desinfección de semillas	17
6.5 Elaboración y siembra de semillas en medio de cultivo Murashige and Skoog	17
6.6 Preparación y siembra de semillas en sustrato orgánico	19
6.7 Variables evaluadas, diseño experimental y análisis estadístico	19
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
7.1 Geminación de semillas en condiciones <i>in vitro</i>	21

7.2 Geminación de semillas en condiciones <i>ex vitro</i> (sustrato).....	24
8. CONCLUSIONES.....	27
9. LITERATURA CITADA	28

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo MS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen representativa del árbol, hojas, flores y frutos de *Cercis canadensis* L

Figura 2. Preparación del medio de cultivo en condiciones asépticas.

Figura 3. Semillas germinadas en sustrato después de pasar por los tratamientos.

Figura 4. Porcentaje de semillas germinadas en cultivo in vitro

Figura 5. Registro del día del comienzo de la germinación, en cada tratamiento y su respectiva repetición.

Figura 6. Semillas germinadas en sustrato después de pasar por los tratamientos

RESUMEN

La especie *Cercis canadensis* L. conocida comúnmente como duraznillo, es un árbol caducifolio que crece ampliamente y florece en primavera con flores de color rosa, sus frutos son legumbres o vainas de color café oscuro. Se distribuye geográficamente desde el norte y centro de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el este de México, en donde se ubica en las zonas templadas de la Sierra Madre Oriental como en los estados de Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Puebla. Al ser una especie establecida en el área geográfica del Desierto Chihuahuense su propagación *ex situ*, favorece el incremento de individuos sin dañar las poblaciones naturales *in situ*, además, el duraznillo, se considera potencial para fines de reforestación e introducción en áreas urbanas, por lo que, el objetivo de este trabajo fue germinar semillas de *C. canadensis* L. utilizando diferentes protocolos para romper la latencia, desarrollar plántulas y el posterior establecimiento de las mismas en viveros. Previo al ensayo de germinación, las semillas de *C. canadensis* L. se almacenaron en frío (2° C) por 57 días, posteriormente se separaron en tres grupos, las semillas de dos grupos se sumergieron en agua con dos diferentes temperaturas (80 ° C y 25° C) seguido de un remojo en agua a 25° C por 24 h, el tercer grupo, denominado testigo, no recibió ningún tratamiento de hidratación previa. Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento, en cada uno se sembraron cincuenta semillas en medios MS de cultivo *in vitro* y en sustrato de peat moss:agrolita:vermiculita, y se registró el número de semillas germinadas, así como porcentaje de contaminación para el cultivo *in vitro*. Las semillas que presentaron un mayor porcentaje de germinación fueron las sembradas en el sustrato y las que recibieron el tratamiento pregerminativo de choque térmico a 80° C. Por lo anterior, podemos concluir que para la germinación de las semillas de *C. canadensis* L. es necesario aplicar un tratamiento pregerminativo de choque térmico y es necesario romper la latencia para estimular la germinación.

Palabras clave: germinación, *in vitro*, latencia, tratamiento pregerminativo, *Cercis canadensis*.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha demostrado que las especies forestales introducidas, no son la mejor alternativa para programas de arbolado en las ciudades o reforestación de áreas naturales, por el contrario, identificar a las especies nativas como plantas que pueden tener una mejor adaptación al medio, desarrollarse y proveer una opción viable para los programas mencionados, es actualmente una tendencia.

En el estado de Coahuila, específicamente la Sierra de Zapalinamé, se encuentra registrada como un área protegida, distinguiéndose por su diversidad y alto número de especies endémicas, también es un espacio que abastece de recursos a los pobladores que habitan en sus cercanías pues colectan plantas con fines alimenticios, medicinales, forestales o bien utilizan espacios de la Sierra para desarrollar actividades agrícolas y ganaderas (Encina-Domínguez *et al.*, 2007).

Por lo anterior, se puede vincular el conocimiento generado sobre la diversidad de las especies vegetales nativas en Coahuila con su potencial para ser incluidas en los programas de reforestación, aunque antes de seleccionarlás, es necesario conocer aspectos sobre su biología, germinación de semillas y desarrollo vegetativo bajo condiciones *ex situ*.

Cercis canadensis L es una especie nativa del Este de América y es considerada como un componente esencial en el ecosistema y para la reforestación de sotobosque, en la literatura la información acerca de su biología, incluidos aspectos de su germinación son limitados, por lo tanto, el presente trabajo contribuye de manera puntual en proporcionar información clave para la propagación de la especie a través de semillas y su desarrollo inicial en vivero.

La presente investigación de manera escrita, se organiza en apartados que de manera general se describen a continuación, en primer lugar se establece el objetivo general planteando el desarrollo de un protocolo para obtener la respuesta de germinación de la especie en estudio, los objetivos específicos hacen referencia a las actividades puntuales para la desinfección de semillas, establecimiento de los tratamientos pregerminativos, siembra de semillas en dos diferentes sustratos y el desarrollo de las plántulas obtenidas previamente.

Como justificación, se establece que es necesario reconocer que, la generación de mayor conocimiento sobre esta especie puede aportar herramientas para la producción de especies con fines de reforestación, así como para la conservación del germoplasma, debido a la multiplicación de la especie a través de semillas. La revisión bibliográfica permitió identificar que la biología y taxonomía descrita para *C. canadensis* L. es suficiente, sin embargo aspectos como la germinación son un área de oportunidad para la investigación como la que se desarrolla en el presente trabajo.

Posteriormente se describió la metodología de trabajo así como los materiales que se utilizaron para los tratamientos pregerminativos y el cultivo de semillas bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*; los resultados más contundentes fueron que, el mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el tratamiento denominado R80 tanto en cultivo *in vitro* como en sustrato, pero en la última condición aún fue mayor (59%). Para finalizar se concluye con resaltar la importancia en la aplicación de tratamientos germinativos para romper la latencia de las semillas y se promueva la germinación.

2. JUSTIFICACIÓN

La protección a la biodiversidad, en términos de vegetación local, es una tarea que obliga a diferentes actores de la población. En particular, los agrobiólogos, juegan un papel clave en desarrollo de proyectos y diseño de estrategias que contribuyan a la conservación de especies vegetales nativas.

El presente trabajo desarrollado por una futura ingeniera en Agrobiología, se centra en reconocer a la especie *Cercis canadensis* L. como elemento de las poblaciones naturales de vegetación establecidas en la Sierra de Zapalinamé, además de contribuir en la generación de conocimiento respecto a su reproducción,

Además, este proyecto surgió en colaboración con los guardaparques de PROFAUNA, quienes observaron que en la propagación de la especie en estudio se tenían muy bajas tasas de germinación y solicitaron el apoyo para el desarrollo de un protocolo que aumentara o asegurara dicha respuesta, por lo tanto se decidió proponer un ensayo para la aplicación de tratamientos pregerminativos que favorecieran el rompimiento de latencia, aunado al análisis de la germinación de semillas en condiciones *in* y *ex vitro* y el establecimiento de plántulas en condiciones *ex situ*.

Por lo anterior, es importante resaltar que la propagación de la especie a través de semillas es una forma de mantener la variabilidad genética y si fuese el caso, al reintroducir las plantas obtenidas en su hábitat natural, se mantendría el equilibrio genético, la respuesta efectiva a depredadores (herbívoros) así como evitar erosión genética de sus poblaciones.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Establecer una estrategia de conservación *ex situ* para la especie de *Cercis canadensis* L. ubicada en la Sierra de Zapalinamé, utilizando la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer un protocolo de desinfección para las semillas de *Cercis canadensis* L. que serán establecidas en el cultivo *in vitro* y sustrato.
- Establecer un protocolo pregerminativo para la promoción de la germinación de semillas de la especie en estudio.
- Establecer plántulas en el vivero para su posterior uso con fines de reforestación.

4. HIPÓTESIS

El uso de tratamientos pregerminativos, en específico, el choque térmico (frío-calor-remojo en agua) es necesario para romper la latencia en semillas de *Cercis canadensis* L. y posteriormente se dé paso al proceso de germinación bajo condiciones controladas *in vitro* y *ex vitro*.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Aspectos generales de las categorías taxonómicas de la Clase Magnoliopsida y Familia Fabaceae

Desde hace millones de años atrás, las plantas que desarrollan estructuras florales, denominadas Angiospermas (o Magnoliophyta), han implementado una gran variedad ecológica y taxonómica, en particular para la flora de México se han registrado 53 órdenes, 247 familias, 2685 géneros, y 21 841 especies. Esta clase ha sido una de las que dominan el ecosistema y es uno de los grupos más diversificados que cualquier otro, se distingue por la presencia de tejidos de conducción en su estructura interna así como por la formación de semillas, que para el grupo de las dicotiledóneas se caracteriza por tener dos cotiledones en sus semillas y un cotiledón en las monocotiledóneas. Actualmente se considera un número aproximado de 250,000 especies y uno de los grupos más amplios que existen en nuestro planeta (SAS, 2008).

En el territorio mexicano se cuenta con un patrimonio forestal extenso y es uno de los países con mayor biodiversidad, especies forestales como los pinos tienen un alto porcentaje de representatividad, seguido de los magueyes, cactáceas y encinos como en ningún otro país. Recientemente, se ha considerado que nuestro país ocupa el quinto lugar a nivel mundial en cuanto a la riqueza de diversidad, el clima y el relieve montañoso son factores fundamentales que dan como resultado dicha condición, la complejidad fisiográfica de geología y clima dan lugar a especies de origen tropical en condiciones variadas dirigiéndose hacia el sur y al norte especies neárticas, al paso del tiempo se han registrado ampliamente grupos taxonómicos en las zonas continentales, oceánicas y costeras a base de su topografía y su ubicación (Rout, 2005).

De la diversidad anteriormente descrita, las especies que pertenecen a la familia botánica Fabaceae, poseen una gran variedad de formas biológicas, es el segundo grupo de plantas más diverso en México y se encuentran ampliamente distribuidas en todo el territorio nacional (Castillon *et al.*, 2004) dentro de esta familia ubicamos

a la especie *Cercis canadensis* L. la cual está distribuida a través desde las zonas cálidas del norte de América, en específico en la costa este de los Estados Unidos, Nebraska, Texas y al sur de Estados Unidos, hasta el noreste de México. En estos lugares se reconocen cuatro especies (*Cercis canadensis* L., *C. occidentalis*, *C. chinensis* y *C. siliquastrum*) y en México es donde se localiza *Cercis canadensis* L. (Fritsch *et al.*, 2009).

Las leguminosas o legumbres son un componente esencial de los ecosistemas ya que cuentan con una gran capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico, tienen un papel importante en aseguramiento de la nutrición, ya que proveen una fuente rica en proteínas y tiene una resistencia a los cambios climáticos (Garduza-Acosta *et al.*, 2019).

5.2 Descripción taxonómica de la especie *Cercis canadensis* L.

De acuerdo con la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2019) la clasificación taxonómica de la planta denominada “duraznillo” es la siguiente:

Plantas Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabale

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Cercidoideae

Género: *Cercis*

Especie: *canadensis* L.

5.3 Características botánicas *Cercis canadensis* L.

La especie de *Cercis canadensis* L. es un pequeño árbol de ornato que exhibe una diversidad morfológica considerable, incluida la variación de las plantas en tamaño de área vegetativa, así como los colores de flores y hojas (Roberts *et al.*, 2015).

Es una especie nativa del este de América y se encuentra distribuida en la zona norte y centro de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el este de México, en territorio mexicano se ubica en las zonas templadas de la Sierra Madre Oriental como en los estados de Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Puebla. Presenta flores de colores llamativos, principalmente las estaciones primavera y verano. El árbol por lo general crece 20 m. de alto y se extiende de 10 a 15m de ancho, tiene una corona de forma redonda con contorno irregular y su crecimiento puede ser rápido (Sierra *et al.*, 2014). Se sabe que numerosos grupos de plantas se distribuyen discontinuamente entre dos o más de las regiones templadas mesófitas boscosas del Norte (Davis *et al.*, 2002).

Las poblaciones de *Cercis canadensis* L. exhiben una extensa variación en la forma de la hoja y color de sus flores, las plantas superiores tienen una serie de características deseables (figura 1) que incluyen hojas brillantes con márgenes ondulados, colores florales más oscuros y resistencia a algunos insectos de alimentación foliar (Mackay *et al.*, 1995).

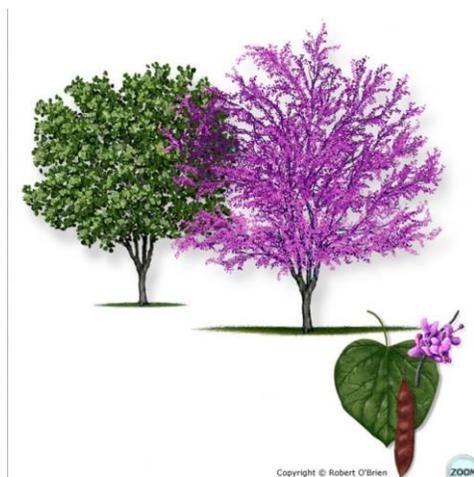


Figura 1. Imagen representativa del árbol, hojas, flores y frutos de *Cercis canadensis* L. (Tomada de Robert O'Brien)

De acuerdo con la descripción de Aguilar-Alcántara *et al.* (2014) las hojas de *C. canadensis* son de color verde, conforme maduran su color se vuelve verde oscuro y en las estaciones de otoño presentan un color amarillo y brillante, así como sus ramas varían sus colores como rojizos, castaños, marrón y negro, otra característica es su tallo en forma de zigzag.

La semilla, considerada como órgano reproductivo, en las leguminosas presenta una variación en el color, pueden ser canela claro, marrón oscuro y se compone de pequeñas células de paredes gruesas (Afanasiev, 1994). En específico para *C. canadensis*, sus frutos se distinguen por ser vainas alargadas y delgadas de color café oscuro por lo que adentro contiene la semilla, ésta presenta una cubierta muy delgada con una cantidad considerable de tejido, cuando llega al punto de madurez su embrión se encuentra ya desarrollado (Aguilar-Alcántara *et al.* 2014).

5.4 Aprovechamiento cultural de *Cercis canadensis* L.

De años atrás se ha reconocido la gran importancia de conservar la variedad de los ecosistemas forestales, el comportamiento ecológico se basa en el conjunto de estrategias de producción, cabe desatacar que a partir del conocimiento del sitio en el que se desarrolla y permanece una especie es posible inferir si se trata de una especie arbórea así como la información de su ecología y adaptación dentro de un área determinada, los elementos para obtener un índice de valor ecológico, incluyen los elementos ambientales físicos y bióticos a través valores relativos de abundancia, dominancia y frecuencia (Rivas *et al.*, 2002).

El uso etnobotánico de *Cercis canadensis* L. data desde las primeras formas de vida de los pueblos americanos, quienes aprovecharon sus flores como alimentos (crudas o hervidas) así como las semillas de las vainas que las consumían tostadas, se ha documentado que en algunas poblaciones más al sur usaron como condimento las ramas verdes. Existen reportes de los metabolitos secundarios producidos en las flores de *Cercis canadensis* L. destacando las antocianinas, en las semillas verdes se identificó la producción de proantocianidinas y ácidos linoleicos, alfa-linoleico, oleico y palmítico. Sus hábitos de crecimiento se describen como una especie tolerante a pleno sol en la parte norte de su rango, pero se

beneficia de sombra en las zonas del sur, particularmente en el medio oeste, donde los veranos son calurosos. Este árbol es adecuado y atractivo para sotobosque o plantación de ejemplares, el hábito de baja ramificación lo hace ideal para la siembra de espécimen. El mejor crecimiento ocurre en un suelo ligero, rico y húmedo se adapta bien a una variedad de suelos, incluyendo arena, arcilla o alcalina. Los árboles se ven mejor cuando reciben riego en los períodos secos de verano, especialmente si el árbol se planta en un área donde las raíces están confinadas (Edward *et al.*, 1993).

El medio ambiente se ha ido deteriorando por la explotación exhaustiva del hombre, pero también se ha visto afectado por factores bióticos y abióticos que contribuyen a la degradación de este, algunos de los factores son incendios forestales, plagas, enfermedades y fenómenos naturales, sin dejar atrás las actividades antropogénicas, para avivar la reforestación en los medios rurales y urbanos se debe implementar cultivos de especies nativas y endémicas para su rápida adaptación al medio natural y lograr una proliferación efectiva y rápido progreso en el restablecimiento, de esta manera seguir aprovechando los diferentes servicios que ofrecen los ecosistemas naturales (Moreno-Casasola *et al.*, 2015).

5.5 Tratamientos pregerminativo

Se denominan tratamientos pregerminativos a los procedimientos aplicados a las semillas para romper la latencia, ya que las condiciones metabólicas en que se encuentran, limitan la respuesta de germinación, aunado a la relación que hay con los factores ambientales adecuados como temperatura, humedad relativa, intercambio de gases (CO₂/O₂).

Existen diversos métodos pregerminativos, los más frecuentes reportados por Patiño *et al.* (1983) son clasificados de acuerdo al tipo de rompimiento de latencia, considerando los siguientes, a) estratificación, procedimiento para romper la latencia fisiológica y se basa en colocar las semillas ya sean en condiciones de frío o calor intentando dar condiciones semejantes a invierno, b) escarificación, es un

procedimiento que altere, ablande o fragmente las cubiertas de las semillas y estas puedan ser penetrables al agua y a los gases, c) lixiviación, es el remojo de las semillas en agua corriente a fin de remover las moléculas que se encuentran en la cubierta o bien ablandar la testa, d) Fitohormonas y otros estimulantes químicos como los son el nitrato de potasio, tiourea, etileno y ácido giberélico, son compuestos que ayudan a la estimulación de la germinación, e) flotación se basa en la división de semillas vacías (sin embrión) de las semillas llenas, en este paso se debe colocar las semillas en un vaso con agua durante 24 horas y este da a conocer que la semillas vacía son las que flotan en la superficie, además la hidratación prolongada, ablanda las testas de las semillas y las que se sumergen son las llenas, en donde se favoreció la entrada de agua al tejido del endospermo para activar las enzimas hidrolíticas.

Ruiz-Carranza *et al.*, (2024) Hacen mención en su investigación donde evaluaron tratamientos pregerminativo tanto químicos como físicos aplicados a cinco especies de la familia Fabaceae (*Havardia pallens*, *Parkinsonia aculeata*, *Prosopis laevigata*, *Vachellia farnesiana*, *Ebenopsis ebano*) donde destaca que en la mayoría de las especies funcionaron con tratamientos de escarificación con ácido sulfúrico durante 25 minutos y con este se obtuvo un porcentaje del 91% de germinación entre los 4 y 6 días después de la siembra.

Con este estudio se sustenta que podemos aplicar tratamientos pregerminativo a las semillas de la especie *Cercis canadensis* L. esperando que se rompa la latencia y se promueva la germinación.

5.6 Latencia de semillas

La latencia, es considerada como la incapacidad que tiene una semilla de germinar, aun cuando las condiciones sean favorables o la semilla este intacta. Para que una semilla germine se requiere de ambientes con temperatura, humedad y concentración de gases adecuados, sin embargo si aún bajo esas condiciones no germina, se considera la latencia como un problema para poder germinar plántulas en viveros, ya que su función de la latencia es hacer limitar que la semilla germinen en el momento que la planta madre las distribuye en al momento de caer.

Se cuenta con un amplio rango de intensidades de latencia como puede ser la latencia absoluta; donde se considera que las semillas logran germinar a un rango de circunstancias ambientales o hasta considerar que las semillas no presentan latencia y pueden germinar en las condiciones que se encuentran.

La latencia puede ser manipulada por factores como temperatura, humedad y el ambiente gaseoso y dependiendo del grado de latencia aumentará o disminuirá su posterior germinación o puede ser eliminada por escarificación térmica, química o mecánica (Halliday y Nakao, 1984).

En las semillas se pueden apreciar embriones rudimentarios o inmaduros debido a la latencia que determina la dormición y hacen que las semillas tarden en procesar sus condiciones en las que se encuentren y posteriormente estas germinen (Doria, 2010).

5.7 Fundamento de la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Se define un medio de cultivo a la formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos que se requieren para la nutrición y manipulación de cultivos vegetales bajo condiciones *in vitro*.

El primer intento de cultivar células vegetales *in vitro* fue hace casi un siglo, el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y sus componentes en condiciones físicas y químicas *in vitro*, se ha convertido en una herramienta importante tanto en ciencias básicas y aplicadas, así como en aplicaciones comerciales (Chandra *et al.*, 2013).

El medio de cultivo requiere una composición específica a las necesidades nutrimentales de las plantas y al manejo de los cultivos. Un medio de cultivo esta formulado entre 6 y 40 compuestos, son compuestos que proveen una fuente de sustancias vitaminas, nutrimentos minerales, carbono, sustancias reguladoras de crecimiento y agente gelificante, la incubación las cuales favorecen la germinación u otros procesos de propagación vegetativa. La incubación de los cultivos puede ser manipulado mínimo la temperatura, fotoperiodo, humedad atmosférica calidad e intensidad de luz e higiene. Las condiciones en las que se llevan a cabo la

incubación son por medio de incubadoras de germinación o cuartos adaptados (frío-calor) con buena y circulación uniforme de aire en el interior (Echenique *et al.*, 2004).

Un aspecto importante de los cultivos *in vitro*, es la incubación, en la cual es necesario su resguardo en cuartos o cámaras de crecimiento que cumplen con diversas características una de ellas es la luz artificial, temperatura promedio de 25°C, a una luminosidad de 25 a 35° $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ con un fotoperiodo de 12 a 16 horas de iluminación. En el mercado encontramos una variedad de medios de cultivo, la mayoría comparte minerales similares por ejemplo macro y micro elementos, vitamina y sacarosa, en los diferentes tipos de cultivo existe una variedad de la composición del medio ya que estos dependerán de la especie vegetal y del tipo de cultivo con el que se trabajara (Araujo *et al.*, 2017).

En el cultivo *in vitro* la germinación de semillas, propagación vegetativa y los métodos de aclimatación contribuyen a la producción de plántulas, tanto para la conservación como para la translocación o proyectos de reintroducción de vegetales. Las técnicas de cultivo *in vitro* sirven para estudiar los hábitos de crecimiento de las plantas, así como los factores ecológicos que influyen en su crecimiento y desarrollo (Barney *et al.*, 2007).

El cultivo *in vitro* en variedades de plantas se desarrolla en un recipiente de vidrio y con un ambiente controlado, las características para germinar las semillas u otros tejidos, son esenciales, como lo es la asepsia (ausencia de gérmenes,) y el control de los elementos que dirigen el desarrollo delo explante. En los últimos años el avance por parte de la ciencias biológicas ha permitido el estudio preciso de las especies tanto a nivel celular como molecular, y en situaciones de laboratorio es posible el crecimiento y desarrollo de las especies (Castillo, 2017).

5.8 Cultivo *in vitro* de especies nativas

El cultivo *in vitro* se basa en la conservación *ex situ* y se pueden utilizar métodos básicos de cultivo de tejidos para propagar plantas en peligro de extinción cuando las semillas o esquejes no son adecuados. La propagación depende de varios pasos, incluyendo iniciación de cultivos libres de bacterias contaminantes y hongos,

establecimiento de brotes o embriogénicos, cultivos, enraizamiento de brotes o crecimiento de embriones (Reed *et al.*, 2011).

La propagación *in vitro* podría ser una alternativa para resolver estos problemas y para permitir la rápida multiplicación de especies. La propagación *in vitro*, vía axilar proliferación de brotes restringe y permite la producción continua de propágulos que se ha destacado en la micropropagación para *Cercis canadensis* L. a partir de semillas (Rodríguez *et al.*, 2004).

La germinación *in vitro* de especies vegetales se enfoca en la modificación de ambientes naturales debido a que puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, otra de las ventajas es desarrollar el aumento del número de semillas a germinar, disminuir el tiempo y momento de la germinación. En especies de importancia forestal es posible llevar a cabo la clonación con los tejidos vegetales utilizando ciertas partes de la especie como son semillas, raíces, embriones, tallos, hojas, frutos, anteras, microsporas, células, protoplastos, etc. El fin de la germinación es de obtener su propagación masiva, su mejoramiento genético o simplemente recuperarlos si se encuentran dentro de alguna categoría de riesgo (Villaseñor y Ortiz., 2014).

El medio que se ha utilizado en los trabajos de cultivo *in vitro* se denomina Murashige-Skoog (MS) en referencia a los autores que lo elaboraron, de acuerdo a su composición nutricional tiene los elementos esenciales como sales minerales, micronutrientes y macronutrientes requeridos para la germinación y el desarrollo de un sin número de especies vegetales, Rodríguez *et al.*, (2004) mencionan que el medio de cultivo MS cuenta con los requerimientos adecuados para una mayor germinación y una respuesta de los tejidos en menor tiempo permitiendo tener resultados favorables para la especie, en este caso para *Cercis canadensis* L.

Minchala-Patiño *et al.*, (2014) realizaron un experimento de germinación *in vitro* de *Prosopis limensis*, especie de la familia Fabaceae, determinando el porcentaje de germinación de semillas. Sus explantes (semillas) se seleccionando de los frutos con mejores características, por su forma, tamaño, peso y condición fitosanitaria, luego se retiraron las semillas, se almacenaron en frío a 10° C. Los autores

propusieron una prueba de escarificación por diferentes métodos como: físico, con agua caliente (50 – 70° C) con permanencia hasta alcanzar temperatura ambiente; la escarificación química con HCl 36,5% durante 5 min y el mecánico, con papel abrasivo (lija), lijándolas en el extremo dorsal. Posteriormente colocaron conjuntos de 50 semillas en frascos para su desinfección, en cámara de flujo laminar. Las semillas que sirvieron de testigo no fueron escarificadas. El proceso de desinfección incluyó lavados con alcohol etílico 70% durante 1 min y cloro comercial (Clorox® 5.5% de hipoclorito de sodio) durante 15 min. Ambos desinfectantes se removieron con tres enjuagues de agua destilada esterilizada con permanencia del agua durante 1 min, utilizando el agua del último enjuague para la imbibición durante 24 h. El medio de cultivo incluyó las sales minerales MS suplementadas con las vitaminas, sacarosa 2%, agar-agar 0,6% y ácido giberélico. Este medio de cultivo fue vertido en frascos de vidrio de 10 cm de altura y 5 cm de diámetro, cultivándose tres semillas por frasco con un total de 15 semillas por tratamiento, al final del trabajo obtuvieron resultados del 100 % de germinación de semillas bajo cultivo *in vitro* y previamente tratadas con el tratamiento escarificación física y química.

El antecedente del trabajo previamente descrito, permite destacar que el cultivo *in vitro* es una estrategia viable para la germinación de la especie *Cercis canadensis* L.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Establecimiento del experimento

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de botánica del departamento de Botánica que se encuentra en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) ubicado geográficamente a 25° 23'42" latitud norte y 100° 50' 57" longitud oeste y a una altitud de 1743 msnm en Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

6.2 Material biológico

Se utilizaron semillas de *Cercis canadensis* L. las cuales fueron proporcionadas por el personal de Protección de la Fauna Mexicana A. C. (PROFAUNA).

6.3 Tratamientos pregerminativo

Se realizó la limpieza de las semillas, contenidas en una vaina, procurando eliminar todos los restos, después de haber retirado las semillas, se colocaron en un sobre de papel dentro de una caja Petri, marcando la fecha y nombre de la especie. Posteriormente, se almacenaron dentro de una caja Petri y colocaron en refrigeración durante 57 días a una temperatura de 2-8 °C.

Una vez pasando el período de almacenamiento en frío, se prepararon dos vasos de precipitados con 200 ml de agua caliente, uno se mantuvo a 80° C (R80) y el segundo a 25° C (R25), en cada recipiente se vertieron 50 semillas, se agitaron por 10 min y ya en reposo se mantuvieron a 25°C por 24 h. Un tercer grupo de 50 semillas sin colocar en remojo (SRT) se consideró como testigo.

6.4 Desinfección de semillas

Después transcurrido el tiempo del remojo, los tres grupos de semillas R80, R25 Y STR, se desinfectaron en un área aséptica bajo el siguiente protocolo, en tres vasos de precipitados estériles se colocaron las semillas y se les agregó 100 ml de agua estéril más 2 gotas de solución de Tween 20 al 2 %, se agitaron manualmente durante 10 minutos, se descartó la solución y se añadieron 30 ml de agua destilada estéril para enjuagar las semillas, repitiendo esta acción 3 veces.

Posteriormente, se realizó el lavado de las semillas en una solución de alcohol al 70% por 3 min, se descartó la solución y se añadió 50 ml de agua destilada estéril para enjuagar las semillas y se repitió esta acción 3 veces.

Después del último enjuague del paso anterior se vertieron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 40%, se descartó la solución y se añadió 50 ml de agua destilada estéril para enjuagar las semillas y se repitió esta acción 3 veces.

6.5 Elaboración y siembra de semillas en medio de cultivo Murashige and Skoog

El medio nutritivo para el cultivo *in vitro* fue basado en la formulación de medio Murashige and Skoog (Tabla 1). Se prepararon 400 ml de medio, para lo cual se pesaron 1.77 g de medio (MS) y 12 g de sacarosa, ambos reactivos se disolvieron en 400 mililitros, se midió el pH con un potenciómetro eléctrico (Hanna instrumen/H198107) y se ajustó el pH en un valor de 5.7 usando HCL o NaOH según el nivel de basicidad o acidez, por último, se pesaron 2.8 g de agar bacteriológico (Bioxon), se añadió a la solución previamente preparada y fue colocada sobre la parrilla de calentamiento y agitación (Corning PC/320) hasta la integración completa del agar y llegar al punto de ebullición. Una vez terminada la preparación del medio, se vertieron 25 mililitros del medio en 16 frascos que a su vez se taparon con papel aluminio y se esterilizaron en autoclave (Presto) a 120 libras de presión por 15

minutos, una vez esterilizados se dejaron enfriar y almacenaron en refrigeración hasta su uso.

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo MS (Egas, 2019).

Macronutrientes		Concentración
	NH ₄ NO ₃	1,650 mg/l
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440 mg/l
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370 mg/l
	KH ₂ PO ₄	170 mg/l
	KNO ₃	1,900 mg/l
Micronutrientes		Concentración
	H ₃ BO ₃	6.2 mg/l
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025 mg/l
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 mg/l
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8 mg/l
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3 mg/l
	KI	0.83 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25 mg/l
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6 mg/l
	2H ₂ O	37.2 mg/l
Vitaminas		Concentración
	i-Inositol	100 mg/l
	Niacina	0.5 mg/l
	Piridoxina · HCl	0.5 mg/l
	Tiamina · HCl	0.1 mg/l
	Glicinas	2 mg/l
Fuente de carbono		Concentración
	Sacarosa	30.0 mg /l



Figura 2. Preparación del medio de cultivo en condiciones asépticas.

En las mismas condiciones de asepsia (área de cultivo y medios) y con las semillas desinfectadas, se procedió a realizar la siembra de 10 semillas por frasco de medio, siempre evitando la exposición del medio al área no estéril, colocadas las semillas se cubrieron los recipientes, se sellaron con plástico autoadherible y se colocó una etiqueta con la fecha de siembra e identificación de la especie.

6.6 Preparación y siembra de semillas en sustrato orgánico

Para esta actividad, se requirió de peat moss, agrolita y vermiculita y se realizó una mezcla de los sustratos en las siguientes proporciones 8:1:1, se hidrató la mezcla hasta punto de saturación y se vació en bolsas de polipapel para posteriormente esterilizar la mezcla en autoclave (Presto) a 120 libras de presión por 15 minutos. Una vez esterilizado el sustrato, se vertió en charolas plásticas, previamente desinfectadas con un paño humedecido con solución de cloro comercial; en un área aséptica y con semillas previamente desinfectadas (bajo el protocolo previamente descrito) se colocaron 50 semillas por charola, realizando repeticiones de siembra por cada tratamiento.

6.7 Variables evaluadas, diseño experimental y análisis estadístico

Para verificar la efectividad de los protocolos pregerminativos se evaluó la respuesta de germinación durante 30 días, considerando una respuesta positiva a la formación de radículas en cada semilla sembrada en los medios, también se registró la

contaminación de semillas en los cultivos *in vitro* y los días después de la siembra para ambas condiciones, *in vitro* y sustratos. Para cada tratamiento y condición de cultivo utilizada, se realizaron tres repeticiones. Los datos obtenidos se procesaron en hojas de Excel y se realizó un análisis de estadística descriptiva.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Geminación de semillas en condiciones *in vitro*.

La respuesta de germinación fue considerada cuando después de la imbibición se formó la radícula que salía desde el micropilo. El registro del comienzo de la germinación fue al día 15 después de la siembra para las semillas del tratamiento R80, a los 17 días en el tratamiento R25 y sin germinación en las semillas de grupo testigo (figura 3). En cuanto al porcentaje de germinación de semillas (figura 4), se obtuvo el mayor porcentaje en el grupo R80 registrando un 6.6% de germinación, seguido del 2.6% para el grupo R25 y sin registro de semillas germinadas para el grupo testigo.

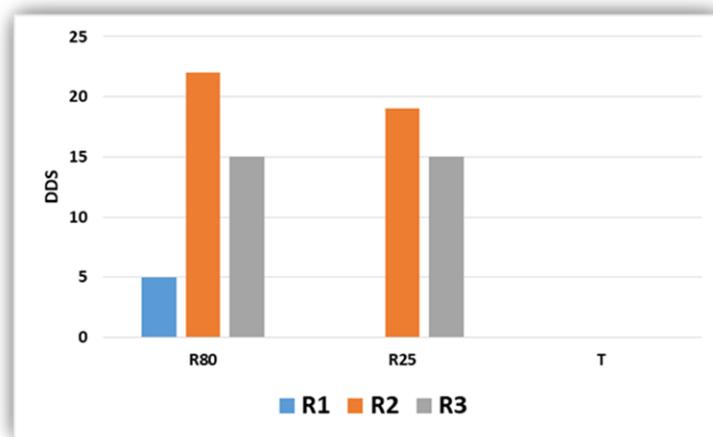


Figura 3. Gráfica del registro de germinación después de la siembra en cultivo *in vitro*

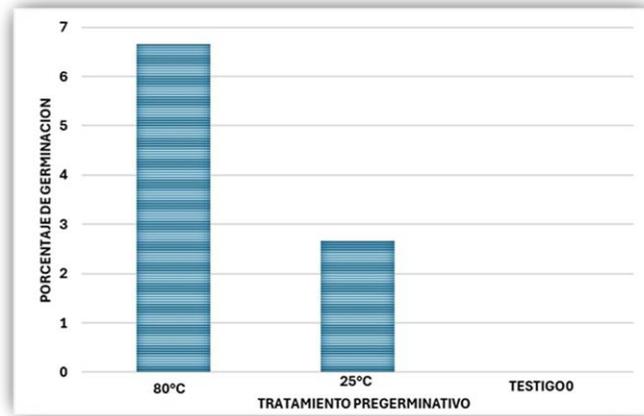


Figura 4. Porcentaje de semillas germinadas en cultivo *in vitro*.

Una de las características de las semillas, es que entran en un período de latencia común en especies que crecen en climas templados (Figueroa *et al.*, 1996) como lo es *C. canadensis* L, la latencia es definida como la incapacidad y viabilidad que tiene una semilla para germinar, ésta condición fisiológica es posible “romperla”, es decir, activar los procesos metabólicos internos de las células de las semillas para dar inicio a la formación de estructuras propias de la planta y comenzar la germinación, aplicando sustancias químicas o ejerciendo acciones mecánicas que simulen las condiciones ambientales naturales en las que se da la germinación en las plantas en estado silvestre como lo afirma De La Cruz *et al.* (2013) al considerar que la estratificación fría “imita” las condiciones climáticas del invierno a las que están sometidas las semillas de latitudes altas.

Por lo anterior y ante la nula respuesta de germinación de las semillas de *C. canadensis* L. al sembrarlas *in vitro* después de su colecta, se decidió aplicar un tratamiento de estratificación, es decir crear un choque térmico, al almacenar las semillas en condición de frío por un período de casi dos meses, seguido del remojo en agua caliente (80° C y 25° C) por 24 horas; como se ha descrito previamente, el tratamiento que promovió el mayor porcentaje de germinación en menor tiempo fue en el denominado R80 (57 días a 2° C + 10 min en agua a 80° C + 24 h en agua a 25° C) al respecto Zurita-Valencia *et al.* (2014) mencionan que el cultivo *in vitro* puede ser una alternativa aplicada a especies en la cual puede aumentarse el

porcentaje de la germinación aunado a las aplicación de las diferentes técnicas pregerminativo como la escarificación.

Otros trabajos en los que se reporta exitosamente el uso de técnicas pregerminativo y la posterior germinación *in vitro*, es el desarrollado por Gómez-Merino *et al.* (2010) quienes aplicaron tres procedimientos de escarificación a semillas de heliconias, los tratamientos consistieron en la remoción con bisturí la testa de las semillas, remoción del opérculo y extracción de embriones eliminando la testa y el endospermo. Sus resultados permitieron evidenciar que al utilizar el proceso de eliminación de testa y endospermo se alcanzó un 90% de germinación, sugiriendo que si las semillas no llevan un tratamiento de escarificación su germinación puede ser nula.

De acuerdo con Rodríguez *et al.* (2017) quienes también en su experimento trabajaron con semillas de la especie *Aristotila chilensis* y aplicaron cuatro tratamientos pregerminativos, el primero fue haciendo un corte con un bisturí en la región contraria a la cicatriz de la testa caruncular, para el segundo tratamiento, las semillas previamente desinfectadas se recibieron tratamientos de estratificación fría en 2, 4, 6 y 8 semanas a 4°C en oscuridad; en sus resultados observaron la respuesta de germinación bajo condiciones de escarificación mecánica y obtuvieron un porcentaje del 92% donde en la mayoría de las semillas se inició el proceso entre el día 33 al 40 después de la siembra, al comparar con las semillas del grupo testigo la germinación se registró hasta los 40-50 días, en cuanto a porcentaje de respuesta, entre ambos tratamientos hubo una diferencia del 56%.

Como se puede evidenciar, diversos trabajos han implementado tratamientos pregerminativos en semillas que presentan latencia, para su posterior germinación bajo las condiciones controladas (humedad, temperatura, fotoperiodo e iluminación) que provee el cultivo *in vitro*; si bien el porcentaje de germinación de *C. canadensis* no fue tan alto en comparación con los trabajos descritos, sí podemos considerar que los factores ambientales son determinantes en la respuesta de germinación, sobre todo la temperatura aplicada en el tratamiento pregerminativo como la del ambiente en el momento de la incubación de las semillas.

7.2 Geminación de semillas en condiciones *ex vitro* (sustrato).

Para analizar la respuesta de germinación de las semillas de *Cercis canadensis* L en el sustrato de siembra como peat most, perlita y vermiculita se utilizaron los mismos tratamientos pregerminativos y se registró el día del comienzo de la germinación (figura 5) para la primera repetición del tratamiento denominado R80 ocurrió después de los tres días, en el tratamiento R25 su germinación fue después de los siete días y en el último tratamiento denominado como testigo no se obtuvo germinación. Los resultados del porcentaje de germinación (figura 6) en promedio para las tres repeticiones de cada uno de los tratamientos, fueron para el R80 de 59.3 %, en R25 fue de 4 % y en el de testigo fue de nula.

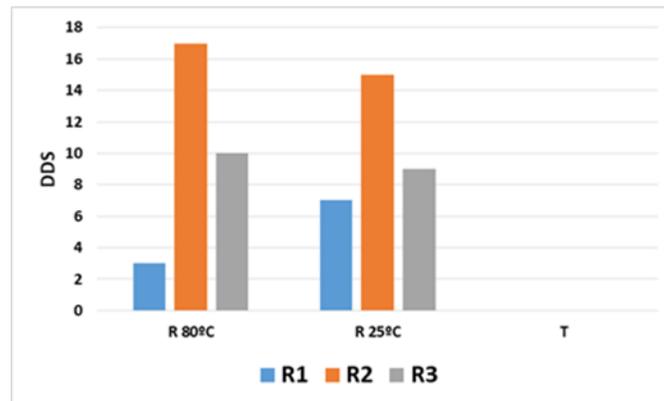


Figura 5. Registro del día del comienzo de la germinación, en cada tratamiento y su respectiva repetición.

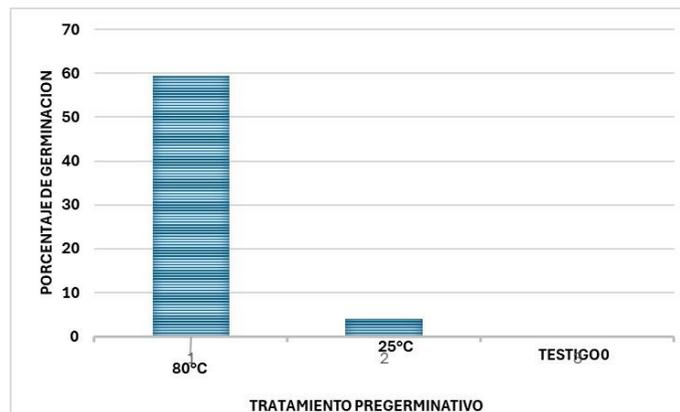


Figura 6. Porcentaje de semillas germinadas en el sustrato peat moss, agrolita y vermiculita.

Reino *et al.* (2011) trabajaron con las especies de leguminosas *Indigofera* sp., *Desmanthus virgatus*, *Clitoria ternatea*, *Crotalaria* sp. y *Capsicum pubescens*, las cuales recibieron cuatro tratamientos pre germinativos: semillas intactas (grupo control); semillas sumergidas durante 2 min. en agua a 80°C; H₂SO₄ al 96% durante 5 min. y H₂SO₄ al 96% durante 10 min, y la variación de temperatura 25/30°C, 25/35°C y 25/40°C, a una elevación de temperatura de ocho horas y 12 horas para 25°C, y una estabilización de cuatro horas, concluyendo que el tratamiento de 25 / 30°C y el de 80°C 2 min resultaron ser mejores ya que se obtuvieron los mayores porcentajes de germinación.

Por otra parte, Villareal *et al.*,(2013) en su trabajo de germinación utilizaron diferentes tratamientos de escarificación para las semillas de huizache y mezquite (también leguminosas) establecieron diferentes tratamientos que consistieron en la inmersión en ácido clorhídrico concentrado grado comercial durante 10 minutos, el segundo tratamiento fue inmersión en agua caliente a 65°C por 15 minutos otro fue agua caliente a 80°C por 15 minutos y por último en ácido sulfúrico concentrado durante 20 minutos, así como un grupo testigo sin tratamiento. El tratamiento más adecuado para la germinación de semillas fue con ácido sulfúrico concentrado por 20 minutos con una germinación del 80 y 96%.

Los resultados obtenidos por Widrlechner y Kovach (2000) para *C. viscosissima* demostraron que al emplear el proceso de almacenar las semillas durante 16 a 24 semanas a 4°C y en presencia de luz se para logra obtener el 80% de germinación; en nuestro experimente los niveles de germinación obtenidos fueron del 59% y las semillas almacenadas durante 8 semanas de frío. La rápida respuesta al pretratamiento de 2-8°C para la germinación de *C. canadensis* L muestra claramente la efectividad para desencadenar el proceso de germinación en sustrato.

De acuerdo los resultados obtenidos en nuestros ensayos y comparados con las investigaciones de otros autores, podemos considerar que, en general la mayoría de las semillas de especies de leguminosas silvestres entran en latencia tienen (en algunas consideradas como dormancia exógena) y requirieron de tratamientos pre germinativos (estratificación térmica o escarificación acida) para incrementar y

acelerar la germinación; sin embargo si es evidente una respuesta de geminación mayor, 52% más para las semillas del tratamiento R80 cultivadas en sustrato respecto a las sembradas *in vitro*.



Figura 7. Semillas germinadas en sustrato después de pasar por los tratamientos.

En nuestro estudio la respuesta de germinación en la primera repetición pudo estar afectada debido a las bajas temperaturas del ambiente, ya que se inició la siembra en febrero, mes en el que las temperaturas diurnas aún son bajas (aproximadamente 15° C en promedio), las siguientes dos repeticiones la siembra se realizó en el mes de mayo en donde la temperatura diurna promedio es de 28° C observando un porcentaje de germinación mayor en ambas respecto a la primer repetición (figura 7). Comparando con nuestros resultados, Fang *et al.* (2016) concluyen que la estratificación de semillas al 5° C durante 170 días es un método eficaz para romper la latencia en semillas *D. giraldii*. Otro efecto que menciona e importante es considerar la estación del año (primavera) para el cultivo, ya que la temperatura en el suelo aumenta de 5°C a 9°C y en invierno al ser más baja es un periodo para la liberación de la latencia de las semillas.

8. CONCLUSIONES

Las semillas de *Cercis canadensis* L. presentan latencia y es necesario aplicar un tratamiento pregerminativo para promover la germinación de las semillas.

El almacenamiento de las semillas de *C. canadensis* L. bajo condiciones de frío simula el período de invierno y tras la posterior adición de agua caliente (80° C por 10 min), se rompió la latencia fisiológica de las mismas.

Es necesario establecer un protocolo de desinfección de las semillas para sembrarlas bajo condiciones del cultivo *in vitro*.

Por otra parte, para esta especie, la germinación en un sustrato de peat moss:perlita:vermiculita (8:1:1) tuvo mejor respuesta, en comparación con el cultivo *in vitro*, ya que superó por más del 50% por ciento de germinación.

La germinación *ex situ* y el posterior desarrollo de las plántulas en viveros puede ser una alternativa para incrementar el número de individuos y que sean aprovechados en programas de reforestación o arbolado de espacios verdes en ciudades donde de manera natural se establece dicha especie.

9. LITERATURA CITADA

- Afanasiev, M. (1944). A study of dormancy and germination of seeds of *Cercis canadensis*. *Journal of Agricultural Research*, 69(10): 405-420.
- Aguilar-Alcántara M., Aguilar-Rodríguez, S. y Terrazas, T. (2014). Anatomía de la madera de doce especies de un bosque mesófilo de montaña de Tamaulipas, México. *Madera y bosques*, 20(3): 69-86.
- Alanís-Rodríguez, E., Jiménez-Pérez, J. (2012) Composición y diversidad de la regeneración natural en comunidades de *Pinus Quercus* sometidas a una alta recurrencia de incendios en el noreste de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 1208-1214
- Araujo, M. E. R., Pérez, D. R. y Bonvissuto, G. L. (2017). Seed germination of five *Prosopis* shrub species (Fabaceae-Mimosoideae) from the Monte and Patagonia phytogeographic provinces of Argentina. *Journal of Arid Environments*, 147: 159-162.
- Barney, D. L., Lopez, O. A., y King, E. (2007). Micropropagation of cascade huckleberry, mountain huckleberry, and oval-leaf bilberry using woody plant medium and Murashige and Skoog medium formulations. *HortTechnology*, 17(3): 279-284.
- Castillo, A. (2017). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de biotecnología, INIA, Las brujas*. 1-8 p.
- Castillón, E. E., Méndez, C. Y., Salinas, A. D. y Quintanilla, J. A. V. (2004). Leguminosas del centro del estado de Nuevo León. México. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*. 75(1): 73-85.
- Chandra, S., Lata, H., Khan, I. A., y ElSohly, M. A. (2013). The role of biotechnology in *cannabis sativa* propagation for the production of phytocannabinoids. In *Biotechnology for Medicinal Plants*. 123-148 p.

CONABIO (2019). *Cercis canadensis*. Categoría taxonómica. Comisión Nacional para el Conocimiento Y uso de la Biodiversidad. México. <http://bdi.conabio.gob.mx/fotoweb/archives/5023Plantas/Plantas/3285%20Cercis%20canadensis.jpg.info>

Davis, C. C., Fritsch, P. W. y Donoghue, M. J. (2002). Phylogeny and biogeography of *Cercis* (Fabaceae): evidence from nuclear ribosomal ITS and chloroplast ndhF sequence data. *Systematic Botany*, 27(2): 289-303.

De La Cruz C. J., López, M. E, Zavaleta, S. C., Mendoza, M. W. y González, C. A. (2013) Efecto de la estratificación en la germinación de semillas del ciruelo europeo, *Prunus domestica*. *REBIOLEST* 1(1): 49-53.

Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*, 31(1): 74-85.

Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L., Levitus, G. y Hopp, E. (2004). *Biotechnología y mejoramiento vegetal II*. Argentina: Ediciones INTA. 4-8 p.

Edward F. Gilman y Watson D. G. (1993) *Cercis canadensis* 'forest pansy' 'forest pansy' *Eastern Redbud*1. *Fact Sheet* ST-147: 1-3.

Egas Castro, F. X. (2019). Evaluación de la callogenesis como alternativa de propagación in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* kunth) (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2019).

Fang, Y., Enhe, Z., Qinli, W. y Zhuhong, M. (2016). Germinación y ruptura de latencia en semillas de *Daphne giraldii* Nitsche (Thymelaeaceae) provenientes del noroeste de China. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 22(1): 99-113.

- Figueroa, J., Armesto, J.J. y Hernández, J. (1996). Estrategias de germinación y latencia de semillas en especies del bosque templado de Chiloé, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*. 69: 243-251.
- Fritsch, P. W., Schiller, A. M., y Larson, K. W. (2009). Taxonomic implications of morphological variation in *Cercis canadensis* (Fabaceae) from Mexico and adjacent parts of Texas. *Systematic Botany*, 34(3): 510-520.
- Garduza-Acosta, B., Lagunes-Espinoza, L. C., Bautista-Muñoz, C. C., García-de-Los-Santos, G., Zaldívar-Cruz, J. M., y Hernández-Flores, A. (2019). Germination of crotalaria and lupinus (Fabaceae) seeds submitted to different pre-germination treatments and their effect on enzymatic activity during early germination. *Brazilian Journal of Biology*, AHEAD (10): 1-7.
- Gómez-Merino, F. C., Vidal-Morales, B., Trejo-Téllez, L. I., y Silva, C. (2010). Escarificación y germinación *in vitro* de semillas de heliconias. *Universidad y Ciencia*, 26(3): 293-297.
- Halliday, J., y Nakao, P. (2014). Nota preliminar sobre quebra de dormência em sementes de leguminosas arbóreas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 19(13), 231–234. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab1984.v19.17536>.
- Mackay, W. A., Tipton, J. L., y Thompson, G. A. (1995). Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis canadensis* var. *mexicana*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 43(3), 295-299.
- Minchala-Patiño, J., Poma-Angamarca, R., Muñoz-Chamba, L., Yaguana-Arévalo, M., González-Zaruma, D., Eras-Guamán y Delgado-Paredes, G. E. (2014). Propagación *in vitro* de *Prosopis limensis* Benth. in Hook.(Fabaceae-Mimosoideae). *Quebracho (Santiago del Estero)*, 22(2): 88-99.

- Moreno-Casasola, P. D. Infante-Mata, Laborde D. J., Madero-Vega C. y Travieso A.C. (2015). Reforestación y enriquecimiento de especies arbóreas en los médanos. *Guía práctica*. INECOL- OIMT. 50-54 p.
- Patiño, F., de la Garza, P., Villagomez, Y., Talavera, I. y Camacho, F. 1983. Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales. México D.F. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Subsecretaría Forestal. Boletín Divulgativo* N° 63. 181 pp.
- Reed, B. M., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., y Pence, V. C. (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1): 1-4.
- Reino, J., Sánchez, J. A., Muñoz, B., González, Y., Montejo, L. (2011). Efecto combinado de la escarificación y la temperatura en la germinación de semillas de leguminosas herbáceas. *Pastos y Forrajes*, 34(2): 179-184.
- Rivas, J. C., Calderón, O. A., Pérez, J. J., y Chaidez, J. D. J. N. (2002). Muestreo de diversidad y observaciones ecológicas del estrato arbóreo del bosque mesófilo de montaña. El Cielo, Tamaulipas, México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias forestales y del ambiente*, 8(2): 125-131.
- Roberts, D. J., Werner, D. J., Wadl, P. A. y Trigiano, R. N. (2015). Inheritance and allelism of morphological traits in eastern redbud (*Cercis canadensis*). *Horticulture Research*, 2: 1504. doi:10.1038/hortres.2015.49
- Rodríguez Beraud, M., Tampe Pérez, J., Hormazábal Vásquez, N., Araneda Durán, X., Tighe Neira, R., y Cárcamo-Fincheira, P. (2017). Efecto de la escarificación y estratificación sobre la germinación *in vitro* de *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz. *Gayana. Botánica*, 74(2): 282-287.

- Rodríguez, A. J., Quibtero, S., Torres, M. D. y Fundadora, Z., (2004) influencia de los medios de testigo de la micropropagación de plátano. *Cultivos Tropicales*, 25(1): 23-26.
- Rout, G. R. (2005). Micropropagation of *Clitoria ternatea* Linn. (Fabaceae)—An important medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(4): 516-519.
- Ruiz-Carranza, L. D., Sigala-Rodríguez, J. Á., Alanís-Rodríguez, E., Molina-Guerra, V. M., y Basave-Villalobos, E. (2024). Tratamientos que promueven la germinación de semillas de cinco especies leñosas del Matorral Espinoso Tamaulipeco con latencia física. *Polibotánica*, (58): 159-170.
- SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. <http://support.sas.com/documentation/cdl/en/statugstatmodel/61751/PDF/default/statugstatmodel.pdf>
- Sierra, C. L. J., Ramírez, J. S., Cortés-Calva, P., Cámara, A. B. S., Dávalos, L. I. Í., y Ortega-Rubio, A. (2014). México país megadiverso y la relevancia de las áreas naturales protegidas. *Investigación y ciencia*, 22(60): 16-22.
- Varela, S. A., y Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Sistemas Forestales Integrados*, 3: 1-10.
- Villarreal Garza, J. A., Rocha Estrada, A., Cárdenas-Ávila, M. L., Moreno Limón, S., González Álvarez, M., y Vargas López, V. (2013). Caracterización morfométrica, viabilidad y germinación de semillas de mezquite y huizache en el noreste de México. *Phyton* (Buenos Aires), 82(2): 169-174.
- Villaseñor, J. L., y Ortiz, E. (2014). Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 134-142.

WIDRLECHNER, M. P. & D. A. KOVACH. 2000. Dormancy-breaking protocols for Cuphea seed. *Seed Science Technol.* 28: 1-27

Zurita-Valencia, Wendy, Gómez-Cruz, J. Elmar, Atrián-Mendoza, Esteban, Hernández-García, Alejandra, Granados-García, María Elena, García-Magaña, J. Jesús, Salgado-Garciglia, Rafael, y Sánchez-Vargas, N. M. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación in vitro y micropropagación del cirimo (*tilia mexicana schlecht.*) (*tiliaceae*). *Polibotánica*, (38), 129-144. Recuperado en 25 de marzo de 2025, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682014000200007&lng=es&tlng=es.