



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Propagación generativa de especies en categoría de
riesgo de extinción para fines de conservación.**

Tesis para obtener el título de
Licenciado en Biología

P R E S E N T A

Nadia Coral Flores López

Director de tesis

M. C. Michelle Xicotencatl Lozano

Codirector de tesis

M. C. Itzel Paulina Sandoval Morales



Diciembre 2025

Dedicatoria

Con todo mi amor y gratitud, dedico esta tesis a ti mamá. Tu amor incondicional, apoyo y sacrificios han hecho posible este logro. Tu ejemplo de fortaleza y determinación me ha inspirado a perseverar en momentos difíciles.

Gracias por creer en mí, por animarme a seguir mis sueños y por estar siempre a mi lado. Tu influencia en mi vida ha sido invaluable y esta tesis es solo un reflejo de tu legado en mí.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

- A mi mamá Teresa, a mi hermana Evelyn y a mis mascotas Kyra y Squishi por ser mi motivación y por brindarme su amor y apoyo incondicional.
- A mi perrita Cory por ser mi compañera en mis noches de desvelo, por tu amor incondicional y por alegrarme todos los días. Gracias por enseñarme el significado de la lealtad, amistad y amor.
- A mis abuelos y familia por todo el apoyo brindado durante y a lo largo de mi vida y durante mi preparación profesional.
- A la Mtra. en C. Michelle Xicotencatl Lozano, por su confianza, guía y orientación para llevar a cabo este trabajo.
- A la Mtra. en C. Itzel Paulina Sandoval Morales, por compartir sus conocimientos sobre la técnica de cultivo.
- Al laboratorio de investigación del Jardín Botánico- BUAP por la donación de semillas de la colección del Banco de Germoplasma.
- A Juan, Ariadna y Michelle por su compañía, apoyo, risas y buenos momentos dentro del laboratorio.
- A mis amigos Mario, Alo, Luis, que me han acompañado en cada paso de esta aventura, gracias por las risas, platicas, apoyo y cariño.
- A todos aquellos que han contribuido a mi crecimiento profesional y personal.

“No hay que temer a nada en la vida, solo hay que comprender.”
-Marie Curie.

Resumen

La propagación generativa (reproducción sexual a partir de semillas) en condiciones de cultivo *in vitro*, representa una alternativa prometedora para la conservación *ex situ* de especies en riesgo, al permitir el desarrollo de protocolos de propagación masiva y el rescate de germoplasma de difícil regeneración natural. En este contexto, la sobreexplotación, la pérdida de hábitat y el lento ritmo de regeneración natural han contribuido a que *Guaiaacum unijugum* (Zygophyllaceae) y *Pseudosmodingium barkleyi* (Anacardiaceae) sean incluidas en la lista de especies amenazadas de la UICN. Ante la ausencia de protocolos específicos de germinación para ambas especies, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la eficiencia de germinación bajo la aplicación de diferentes tratamientos pre-germinativos, medios de cultivo y concentraciones hormonales, así como analizar el comportamiento de aclimatación y supervivencia de las plántulas en sustrato.

Se empleó un diseño experimental factorial. En *P. barkleyi* se probaron los medios Agar-agua (A.A.), Agar-agua con ANA (A.A/ANA), Murashige & Skoog (MS) y Murashige & Skoog con ANA (MS/ANA), combinados con tratamientos pre-germinativos de humo y control. En *G. unijugum* se evaluaron los medios Agar-agua (A.A.) y Murashige & Skoog (MS), con y sin escarificación. Las semillas fueron incubadas en cámara de crecimiento a 25 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad.

Aunque el estudio de *G. unijugum* no contó con réplicas ni análisis estadístico formal, los resultados aportan información relevante sobre su comportamiento germinativo, alcanzando un 100 % de germinación a los 23 días en el medio Agar-agua con tratamiento de escarificación, y un índice de velocidad de germinación (IVG) de 0.15, sin obtención de plántulas para la etapa de aclimatación. En *P. barkleyi*, se registró un 75 % de germinación a los 16 días en el medio Agar-agua con el tratamiento pre-germinativo de humo, con un IVG de 0.63. Durante la fase de aclimatación, las plántulas de *P. barkleyi* provenientes del medio MS con tratamiento de humo mostraron el mayor crecimiento, con una altura promedio de 8.8 cm y el mayor porcentaje de supervivencia (20 %).

Abstract

Generative propagation (sexual reproduction from seeds) under in vitro culture conditions represents a promising alternative for the ex-situ conservation of endangered species, enabling the development of mass propagation protocols and the rescue of germplasm that is difficult to regenerate naturally. In this context, overexploitation, habitat loss, and the slow rate of natural regeneration have contributed to the inclusion of *Guaiaacum unijugum* (Zygophyllaceae) and *Pseudosmodingium barkleyi* (Anacardiaceae) on the IUCN Red List of Threatened Species. Given the lack of specific germination protocols for both species, this study aimed to evaluate germination efficiency under different pre-germination treatments, culture media, and hormone concentrations, as well as to analyze the acclimatization and survival behavior of the seedlings in the substrate. A factorial experimental design was used. In *P. barkleyi*, the following media were tested: Water agar (WA), Water agar with NAA (WA/NAA), Murashige & Skoog (MS), and Murashige & Skoog with NAA (MS/NAA), combined with pre-germination smoke treatments and a control. In *G. unijugum*, Water agar (WA) and Murashige & Skoog (MS) media were evaluated, with and without scarification. Seeds were incubated in a growth chamber at 25 °C, with a photoperiod of 12 h light/12 h dark.

Although the study of *G. unijugum* lacked replicates and formal statistical analysis, the results provide relevant information on its germination behavior, achieving 100% germination at 23 days on water agar with scarification treatment, and a germination rate index (GRI) of 0.15, without obtaining plantlets for the acclimatization stage. In *P. barkleyi*, 75% germination was recorded at 16 days on water agar with the pre-germination smoke treatment, with a GRI of 0.63. During the acclimatization phase, the *P. barkleyi* plantlets from the MS medium with smoke treatment showed the greatest growth, with an average height of 8.8 cm and the highest survival rate (20%).

Índice

Dedicatoria	2
Agradecimientos.....	3
Resumen	5
Abstract	6
Lista de Figuras.....	9
Lista de tablas	10
I Introducción.....	11
II Antecedentes.....	12
2.1 Semillas	12
2.2 Propagación generativa	15
2.3 Germinación.....	15
2.4 Tratamientos pre-germinativos.....	17
2.5 Medios de cultivo	21
2.6 Reguladores de crecimiento (RC)	23
2.7 Amenazas	24
III Justificación.....	25
IV Hipótesis	25
V Objetivos.....	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos particulares.....	26
VI Materiales y métodos	27
6.1 Caso A: Ensayo de Germinación de <i>Guaiaicum unijugum</i> Brandegees	27
6.1.1 Descripción biológica de <i>G. unijugum</i>	27
6.1.2 Tratamientos pre-germinativos y medios en las semillas de <i>G. unijugum</i>	27

6.1.3 Análisis de datos de la Germinación de <i>G. unijugum</i>	30
6.1.4 Aclimatación de las plántulas de <i>G. unijugum</i>	30
6.2 Caso B: Ensayo de Germinación de <i>Pseudosmodingium barkleyi</i> Miranda.	31
6.2.1 Descripción biológica de <i>P. barkleyi</i>	31
6.2.2 Tratamientos pre-germinativos y medios en las semillas de <i>P. barkleyi</i> .	31
6.2.3 Aclimatación de las plántulas de <i>P. barkleyi</i>	34
6.2.4 Análisis de datos de la Germinación de <i>P. barkleyi</i>	34
VII Resultados	35
7.1 Resultados del Ensayo de Germinación de <i>Guaiaicum unijugum</i>	35
7.1.1 Germinación de <i>G. unijugum</i>	35
7.1.2 Aclimatación de las plántulas de <i>G. unijugum</i>	37
7.1.3 Discusión del ensayo de germinación y aclimatación de <i>Guaiaicum unijugum</i>	38
7.1.4 Conclusión del ensayo de germinación y aclimatación de <i>Guaiaicum unijugum</i>	39
7.2 Resultados Caso B: Ensayo de germinación de <i>P. barkleyi</i>	40
7.2.1 Germinación de <i>P. barkleyi</i>	40
7.2.2 Evaluación del crecimiento de las plántulas de <i>P. barkleyi</i>	43
7.2.3 Supervivencia de plántulas de <i>P. barkleyi</i>	46
7.2.4 Discusión del ensayo de germinación y aclimatación en <i>P. barkleyi</i>	47
7.2.5Conclusión del ensayo de germinación y aclimatación de <i>P. barkleyi</i>	52
VIII Conclusión general	52
IX Referencias.....	1

¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**Lista de Figuras**

Figura 1. Partes de la semilla	13
Figura 2. Prueba de humo: hojas y ramas secas dentro del ahumador , se prendió fuego, se prendio el fuego: a) humo colectado del ahumador, b) frasco con las semillas con el humo colectado.....	33
Figura 3. Semillas germinadas al 4to día después de la siembra de <i>Guaiacum unijugum</i> a: Agar-agua, b: Murashige & Skoog (Ms)	35
Figura 4. Semillas germinadas al 4to día después de la siembra de <i>Guaiacum unijugum</i> a: Agar-agua, b: Murashige & Skoog (Ms)	35
Figura 5. Desarrollo de síntomas de enfermedad en <i>Guaiacum unijugum</i> : a) puntos negros en cotiledones, b) puntos negros en hojas, c) hoja desprendida del tallo perdiendo color hasta secarse.	38
Figura 6. Germinación para el medio Agar-Agua de <i>Pseudosmodinium barkleyi</i> .40	
Figura 7. Germinación para el medio Murashige & Skoog (MS) de <i>Pseudosmodinium barkleyi</i>	41
Figura 8. Porcentaje de germinación de <i>Pseudosmodinium barkleyi</i> : A. A/C 73 %, MS/C 40 %, A. A/ANA/C 35 %, MS/ANA/C 16 %. A.A/H 75 %, MS/H 44 %, A. A/ANA/H 37 %, MS/ANA/H 5 %.	42
Figura 9. Medida inicial y final en el crecimiento de altura en plántulas de <i>Pseudosmodinium barkleyi</i> , provenientes de los diferentes tratamientos.	44
Figura 10. Crecimiento de diámetro en plántulas de <i>Pseudosmodinium barkleyi</i> , provenientes de los diferentes tratamientos.	45
Figura 11. Porcentaje de supervivencia de plántulas de <i>Pseudosmodinium barkleyi</i> aclimatizadas en sustrato en los diferentes medios, MS/H 42 %, A.A/C 11%, MS/C 25 %, A.A/H 7 %.....	46

Lista de tablas

Tabla 1. Diseño experiemtal para evaluar el tratamiento pre-germinativo y el medio de cultivo de <i>Guaiaacum unijugum</i>	28
Tabla 2. Componentes (Fe: stock de hierro, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: cloruro de calcio di hidratado), concentración y cantidad para la preparación del medio Murashige & Skoog (MS).	29
Tabla 3. Diseño experimental para evaluar el medio de cultivo y tratamiento pregerminativo de <i>Pseudosmodingium barkleyi</i> para ensayo de germinación.	32
Tabla 4. Altura máxima y mínima, desviación estándar y prueba Tukey confianza de 95 %, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Aplicada al crecimiento en altura de <i>Pseudosmodingium barkleyi</i>	43
Tabla 5. Diámetro máximo y mínimo, desviación estándar y prueba Tukey confianza de 95 %, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Aplicada al crecimiento en diámetro de <i>Pseudosmodingium barkleyi</i>	45

I Introducción

La propagación de plantas por medio de la germinación de semillas es de gran importancia debido a que interviene en gran parte en el mantenimiento de la diversidad genética de las especies, contrario a lo que ocurre con los métodos de propagación asexual o vegetativa (Amador-Alfárez et al., 2013). La propagación generativa (reproducción sexual a partir de semillas) en cultivo *in vitro* da la posibilidad de desarrollar nuevas alternativas para la conservación *ex situ* de la diversidad biológica, obteniendo protocolos de propagación masiva de especies en peligro de extinción, que presentan poblaciones extremadamente pequeñas o con limitaciones para su reproducción al permitir disponer de individuos en periodos de tiempo relativamente cortos y facilitar la manipulación del material vegetal (Bohórquez-Quintero et al. 2016, García-Aguila et al., 2007).

Esta necesidad se torna aún más crítica debido a la pérdida de biodiversidad causada por actividades humanas, que afecta de manera irreversible los ecosistemas y, en última instancia, a la propia especie humana. Factores como la degradación ambiental, la fragmentación de hábitats y el cambio climático han reducido la abundancia de numerosas especies, como lo evidencian las Listas Rojas de Especies Amenazadas, subrayando la urgencia de implementar estrategias efectivas de conservación y restauración ecológica (Llano et al., 2017).

En este contexto la sobreexplotación, junto con la pérdida de hábitat y un lento ritmo de regeneración, son las amenazas que han llevado a la inclusión en la lista de especies amenazadas a *Guaiaicum unijugum*, de la familia Zygophyllaceae endémica de la Región del Cabo de Baja California y debido a su rareza se sabe poco sobre la biología básica de la especie (McCauley et al., 2010).

Así mismo, *Pseudosmodingium barkleyi* de la familia Anacardiaceae está presente en Guerrero y Puebla. Es endémica del municipio de Eduardo Neri en el estado de Guerrero (Jiménez-Ramírez et al., 2003; Aguilar-Ortigoza et al., 2004). En hábitats

donde el deterioro está sujeto a las actividades mineras y los incendios naturales o provocados (Martínez-Salas et al., 2020).

No existen protocolos de germinación específicos para *Guaiaacum unijugum* y *Pseudosmodingium barkleyi*, por lo tanto, el presente trabajo buscó establecer la técnica de propagación generativa, después de 2 meses y 6 años de almacenamiento respectivamente en el banco de germoplasma del Herbario y Jardín Botánico Universitario-BUAP, evaluando la respuesta de germinación en distintos tratamientos en el medio de cultivo, así como conocer el proceso de aclimatación de estas especies que es un punto crítico para la supervivencia de ambas especies.

II Antecedentes

2.1 Semillas

Las semillas son la unidad de reproducción sexual de las plantas y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen, siendo uno de los elementos más eficaces para que esta se disperse en tiempo y espacio. Ésta desempeña una función fundamental en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas, además de la regeneración de los bosques y sucesión ecológica (Doria , 2010).

La diversidad en estructura interna y externa de las semillas se relacionan en gran parte, con una amplia gama de formas de dispersión y germinación. Estas variaciones morfológicas incluyen diferencias de tamaño, forma, color y textura de la testa (Pérez-Rozo, 2006).

La morfología de la semilla consta de diferentes partes, donde cada una cumple una función especializada (Figura 1):

- El embrión es la nueva planta contenida en la semilla, está formado por un eje embrionario (de la Cuadra , 1992).

- La radícula, es la parte del embrión que emerge primero, se convertirá en la raíz de la planta (Varela & Arana, 2010).
- La plúmula, yema embrionaria que se desarrolla para formar el brote, incluye al tallo y las hojas de la planta (Courtis, 2013).
- El hipocótilo, es la zona intermedia de los cotiledones y radícula, esta estructura dará origen al tallo de la planta que emergerá a la superficie (de la Cuadra , 1992).
- Epicótilo, tejido que se ubica entre los cotiledones y la radícula este dará origen a la parte aérea de la plántula (Osuna-Fernández, et al. 2016; Zevallos-Pollito, et al. 2003).
- El cotiledón, es una estructura que se encuentra unida al eje embrionario y consta de una o dos hojas unidas (de la Cuadra, 1992).
- Testa, capa protectora que envuelve y protege al embrión (Osuna-Fernández et al., 2016).

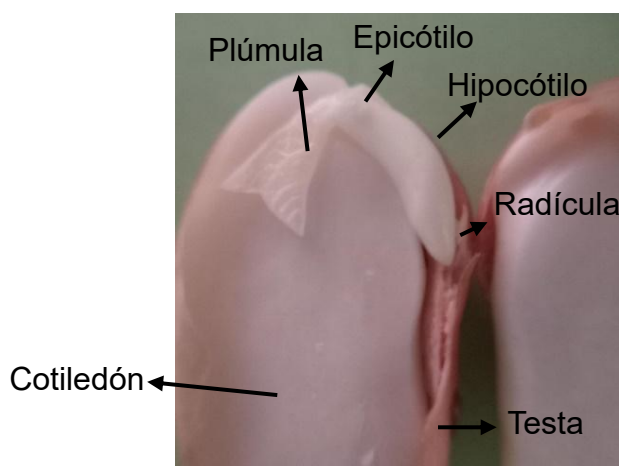


Figura 1. Partes de la semilla

Las semillas se clasifican en función de su tolerancia a la desecación para el almacenamiento. De acuerdo con el deterioro que las semillas, se han clasificado en semillas ortodoxas y recalcitrantes:

- Las semillas ortodoxas pueden deshidratarse a bajos contenidos de humedad (5% o menos) sin sufrir daño; su longevidad se incrementa al disminuir el contenido de humedad y la temperatura de la semilla almacenada (Osuna-Fernández et al. 2016), se dispersan y se conservan luego de alcanzar un bajo porcentaje de humedad (Doria , 2010).
- Semillas recalcitrantes: son sensibles a la desecación, se deben mantener entre un 15% y 50% de humedad en condiciones de almacenamiento (INAB, 2021), se dispersan junto con los tejidos del fruto (carnoso) con altos contenidos de humedad (Osuna-Fernández et al., 2016).

No existe registro sobre la clasificación de la tolerancia a la desecación de *Guaiaacum unijugum* y *Pseudosmodingium barkleyi*. No obstante, en la familia *Anacardiaceae*, muchas especies presentan semillas con capacidad ortodoxa (Baskin & Baskin , 2022), es decir, toleran la desecación y mantienen viabilidad bajo almacenamiento seco y frío, ejemplo de esto es *Tapirira obtusa*, las semillas fueron sometidas a secado con cloruro de magnesio (secado lento) o gel de sílice (secado rápido), en un ambiente cerrado, hasta alcanzar contenidos de humedad del 40%, 30%, 20% y 10%. El proceso de secado lento no influye en la germinación de las semillas de *Tapirira obtusa*, independientemente del entorno en el que se produjeron. El proceso de secado rápido resulta en una pequeña reducción de la germinación de las semillas de *Tapirira obtusa*. Las semillas de *Tapirira obtusa* no presentan sensibilidad a la desecación (Souza Pereira et al., 2012).

En *Anacardium othonianum* (Anacardiaceae), los achenios se recolectaron con un contenido de agua del 12 % (peso fresco) y se secaron en gel de sílice hasta alcanzar 10, 8, 6 y 4 %. La desecación en gel de sílice hasta el 4% no dañó las estructuras internas de los achenios, y no se observaron reducciones en el volumen ocupado por el embrión ni en el rendimiento fisiológico de los achenios sometidos a desecación, se considera a esta especie como ortodoxa (Abadia da Silva et al., 2017).

2.2 Propagación generativa

La propagación de plantas por medio de la germinación de semillas es de gran importancia debido a que interviene en gran parte en el mantenimiento de la diversidad genética de las especies, contrario a lo que ocurre con los métodos de propagación asexual o vegetativa (Amador-Alfárez et al., 2013).

La propagación generativa, entendida como la reproducción de plantas mediante semillas, representa un proceso esencial para la conservación de la diversidad genética, especialmente en especies nativas. Este método genera individuos genéticamente diferentes, lo que favorece la variabilidad y la capacidad de adaptación de las poblaciones vegetales frente a cambios ambientales (Hartmann et al., 2011). Sin embargo, en muchas especies nativas, particularmente aquellas con alto valor ecológico o en riesgo de extinción, la propagación generativa enfrenta importantes limitaciones. Estas incluyen la baja viabilidad o longevidad de las semillas, la presencia de latencia (dormancia) fisiológica o física, y condiciones ambientales poco favorables para la germinación natural (Baskin & Baskin, 2014). En este contexto, se han explorado estrategias complementarias, como la propagación in vitro, el uso de reguladores de crecimiento y la modificación de condiciones fisicoquímicas del medio para superar las barreras germinativas y facilitar la conservación ex situ de estas especies (George et al., 2008).

2.3 Germinación

La germinación es un conjunto de procesos que se llevan a cabo en la semilla, consiste en el desarrollo del embrión hasta formar una plántula, que sea capaz de valerse por sí misma y finalmente convertirse en una planta adulta (de la Cuadra, 1992, Doria , 2010). Se llevan a cabo tres etapas para la germinación: Primera es la de imbibición, en esta se produce la absorción de agua causando que la semilla se hinche y la testa se rompa (Doria , 2010) Segunda es el inicio de la actividad metabólica y enzimática. Tercera etapa es la de crecimiento y división celular, en esta etapa se provoca la emergencia de la radícula, esta fase continúa con el desarrollo de la plántula (Osuna-Fernández et al., 2016; Doria, 2010).

La germinación de las semillas se divide en dos tipos:

- La germinación epígea, esta se presenta cuando los cotiledones quedan expuestos sobre la superficie del suelo por la elongación del hipocótilo (Baskin et al., 2014).
- La germinación hiópgea es cuando el hipocótilo no se alarga por encima de la superficie, por lo que los cotilodones permanecen por debajo de la superficie (Osuna-Fernández et al., 2016; Baskin et al., 2014).

Para lograr una germinación exitosa es necesario tomar en cuenta los principales factores (Osuna-Fernández et al., 2016):

- La absorción de agua es la más importante, para ello es importante que la semilla cuente con disponibilidad de agua para poder germinar. Sin embargo, el exceso de agua puede inhibir la germinación y la falta de agua puede provocar un déficit hídrico (Osuna-Fernández et al., 2016).
- La temperatura, cabe destacar que para cada especie existe un rango, este queda definido por una temperatura mínima y máxima, considerando la temperatura óptima la idónea para la germinación (Pita-Villamil & Perez-García, 1998).
- El efecto de la luz es también un factor importante, este dependerá de la intensidad y duración de la luz, ya que en muchos casos las semillas germinan bajo la luz o en la oscuridad (Osuna-Fernández et al., 2016; de la Cuadra, 1992).

Sin embargo, muchas especies no logran germinar, aun cuando se presentan condiciones favorables, esto se debe a que las semillas se encuentran en estado de latencia o no son viables (Doria , 2010).

2.4 Tratamientos pre-germinativos.

La mayoría de las semillas no germinan inmediatamente después de la maduración, debido a que entran en un estado de latencia de duración (semanas, meses, años) variada según la especie; el cual incapacita a la semilla a germinar, necesitando condiciones específicas de temperatura, humedad y concentración de gases que serían adecuadas para la germinación (Baskin & Baskin, 2014). La latencia se establece durante la formación de la semilla, y posee una importante función que consiste en restringir la germinación en la planta madre antes de su dispersión en el campo. Además, se considera que la latencia es una adaptación que contribuye a la supervivencia del individuo, ya que restringe la germinación cuando los factores ambientales (falta o exceso de agua, altas o bajas temperaturas, exposición a la luz u oscuridad inadecuada, falta de oxígeno) son desfavorables para el desarrollo de la plántula (Varela & Arana, 2010).

La salida del estado de latencia requiere, en determinados casos, algunos estímulos ambientales, tales como luz o bajas temperaturas. En otros casos, la testa de las semillas constituye una barrera impermeable al agua y a los gases o ejercen una resistencia física a la expansión de la radícula, que impide la germinación (Doria , 2010).

Por lo tanto, los tratamientos pre-germinativos, son todos aquellos procedimientos necesarios para romper la latencia de las semillas; esto es, el estado en el que encuentran algunas semillas, que no son capaces de germinar sino hasta que las condiciones del medio sean las adecuadas. Entre los métodos más empleados en especies pertenecientes a la familia Anacardiaceae y en especies del género *Guaiaacum* se encuentran: (Varela & Arana, 2010):

- Estratificación: Este tratamiento se utiliza para romper la latencia fisiológica, y consiste en colocar las semillas entre estratos que conservan la humedad, comúnmente arena o bien turba o vermiculita, en frío o calor.

- Escarificación: es cualquier proceso que rompa, raye, altere mecánicamente o ablande las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases. Esta a su vez se clasifica en dos tipos:
 - Escarificación mecánica: Consiste en raspar la cubierta de las semillas con lijas, limas o quebrarlas con un martillo o pinzas.
 - Escarificación química: es un proceso artificial que consiste en remojar las semillas por períodos breves de tiempo en compuestos ácidos, como el ácido sulfúrico o ácido clorhídrico (Sánchez-Soto et al., 2017).
- Hormonas de crecimiento vegetal: Existen compuestos químicos orgánicos naturales que estimulan la germinación, entre los más usados están: nitrato de potasio, tiourea, etileno, ácido giberélico (GA3), citoquininas, entre otros. Estos compuestos se emplean a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, dependiendo de cada especie.
- Tratamiento pre-germinativo de humo: es una técnica que consiste en exponer a las semillas a compuestos derivados de la combustión, de manera que se estimula la germinación de las semillas. (Cuello-Revetria et al., 2019).
- Imbibición: es el proceso de toma de agua por parte de la semilla, esta se da mediante la inmersión de las semillas en soluciones osmóticas o en cantidades determinadas de agua durante cierto periodo de tiempo (Aguilar-Ortigoza & Sosa, 2004) (Pérez Mendoza et al., 2016).

Este tipo de tratamientos pre-germinativos son muy importantes en estudios de germinación de semillas ya que de esta manera se logra obtener y aumentar los porcentajes de germinación, no hay un único tratamiento pre-germinativo universalmente empleado, ya que la elección de la técnica más adecuada depende de las características morfológicas y fisiológicas de cada especie (Varela & Arana, 2010).

Los estudios de germinación en especies del género *Guaiaicum* muestran la aplicación de tratamientos pre-germinativos, ejemplo es el aplicado en *Guaiaicum*

sanctum, donde se demostró que esta especie presenta latencia física provocada por la testa y el arilo que contienen los compuestos inhibidores de la germinación, por lo que se empleó el tratamiento pre-germinativo de escarificación mecánica y química para remover estas estructuras, una vez retiradas se alcanzaron porcentajes de hasta el 100% de semillas germinadas, cabe aclarar que las semillas utilizadas en este estudio eran semillas recién recolectadas (Taylor , 1966). En *Guaiaicum coulteri* se utilizaron semillas de frutos maduros cosechados y almacenados a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa menor a 50%, utilizaron tres tratamientos pre-germinativos: 1) escarificación con lija para madera donde se obtuvo un 86.7% semillas germinadas, 2) inmersión en ácido sulfúrico (H_2SO_4) por periodos de tiempo 1 min donde se obtuvo 75% semillas germinadas, 5 min 80% semillas germinadas y 10 min 85% semillas germinadas 3) imbibición en agua caliente a una temperatura de 60°C por 10 min obteniendo un 51.1% semillas germinadas (Sánchez-Soto et al., 2017).

En *Guaiaicum angustifolium*, con el tratamiento pre-germinativo de estratificación, se evaluó el efecto de la temperatura siendo el porcentaje de germinación obtenido del 87 %y 92 % con temperaturas de 25°C y 30°C (Everith , 1983). Las semillas de *G. sanctum* logran germinar cerca del 80% en temperaturas de 20°C o 25°C (González-Rivas, et al. 2009). Con las semillas de *Guaiaicum officinale*, se utilizó el tratamiento pre-germinativo de inmersión en ácido sulfúrico (H_2SO_4) por un periodo de 7 min y la imbibición en agua por 24 hrs, estos tratamientos fueron eficientes en un 90% de germinación (Pérez, 1996).

En lo que respecta a los tratamientos pre-germinativos utilizados en especies de la familia Anacardiaceae, como es el caso de *Schinus areira* son los siguientes: (1) y (2) Testigos con y sin exocarpo respectivamente; (3) y (4) Agua a 80°C y enfriamiento gradual por tres días, con y sin exocarpo respectivamente; (5) Lijado; (6) Lijado e inmersión en agua a temperatura ambiente por tres días; y (7) Escarificación con mortero y agua a 80°C por tres días. El tratamiento con mayor porcentaje de germinación (35%) fue la aplicación de agua caliente a 80°C sin

exocarpo e imbibición durante tres días, este mismo tratamiento con exocarpo muestra un valor muy bajo de porcentaje de germinación (4%). La aplicación de lijado sobre el mesocarpo resultó ineficiente con un bajo porcentaje de germinación (10%) debido a que no eliminó la cubierta pastosa tornando ineficiente el tratamiento. (Zapater et al., 2018). Otro estudio realizado con esta especie es el de métodos de escarificación donde los tratamientos utilizados fueron: 1) testigo; 2) escarificación mecánica, 3) escarificación física (agua a temperatura de ebullición); 4) escarificación química (ácido sulfúrico). Las semillas se incubaron en cajas de Petri sobre papel de filtro. Se registraron los siguientes porcentajes de germinación para los diferentes tratamientos: 1) 12 %, 2) 22 %, 3) 18 % y 4) 36 %. Se observa que los mayores porcentajes de germinación se obtienen cuando las semillas son tratadas con ácido sulfúrico (Tapia et al., 2011).

En *Schinus johnstonii* se utilizaron los siguientes tratamientos pre-germinativos: 1) semillas sin exocarpo este se retiró de manera manual, se obtuvo un porcentaje del 15% de semillas germinadas, 2) semillas desnudas con escarificación mecánica con un 22% de semillas germinadas, 3) semillas desnudas con escarificación química mediante la inmersión de las semillas en ácido sulfúrico al 10% durante 5 min con un 5% de semillas germinadas, 4) semillas desnudas(sin exocarpo) en remojo en agua a temperatura ambiente (24°C) durante 4 días se obtuvo un 7% de semillas germinadas y 5) semillas desnudas con exposición al humo, realizó con un ahumador, con material vegetal seco encendido en su interior, y una bolsa plástica como receptáculo del mismo. Las semillas se introdujeron en la bolsa y se mantuvieron por 5 minutos bajo condiciones de saturación donde se obtuvo un 12% semillas germinadas (Díaz-Arias et al., 2020).

Otra especie que ha sido sometida a tratamientos pre-germinativos es *Anacardium excelsum* (familia Anacardiaceae) donde las semillas fueron sometidas a diferentes tratamientos, como lo son: escarificación mecánica con lija, escarificación mecánica con bisturí, escarificación química con HCl por 5 y 10 minutos, además de eso se contó con un testigo, se obtuvo un mayor porcentaje de semillas germinadas mediante el tratamiento de escarificación con bisturí (60%), seguido del tratamiento de sumergir en solución de HCl por 5 minutos (40%). En los tratamientos donde

hubo un menor número de semillas germinadas fueron el testigo y la escarificación con lija, mostrando no tener un efecto apreciable sobre el rompimiento de la dormancia en las semillas. El agua destilada en conjunto con el agua caliente y la solución de HCl por 10 minutos, presentaron similares porcentajes en cuanto a la germinación (20%).

De acuerdo con la revisión de los pre-tratamientos de germinación de la especie *Guaiaacum unijugum* y *Pseudosmodingium barkleyi* es nula.

2.5 Medios de cultivo

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se define como el crecimiento aséptico de plantas, o partes de estas, en recipientes de vidrio o plásticos, con medios de cultivos artificiales y mantenidas en condiciones controladas de luz y temperatura (Suárez-Padrón, 2020). Para el desarrollo de un medio de cultivo es necesario seleccionar adecuadamente los componentes a usar (Gómez & Batista, 2006). Lo ideal de la siembra de cultivos vegetales es promover la total potencialidad de las células no diferenciadas, este procedimiento es posible gracias a la preparación específica de un medio de cultivo que contenga los macronutrientes (N, P, K, S, Ca, Mg, Si), micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B, Na) vitaminas y sacarosa, necesarios para el desarrollo de la planta (Alcántara-Cortes et al., 2017).

Se han empleado diversos medios de cultivo para la propagación de especies vegetales, por ejemplo: Knudson C; este medio es rico en azúcares y nutrientes (Otero-Ospina & Bayman, 2009), White es un medio que contiene menos sales inorgánicas y menor concentración de nitrógeno, medio de cultivo Vacin y Went; es un medio que se utiliza para el cultivo *in vitro* de orquídeas, el Agar- Agua (AA) es un medio sólido que no contiene nutrientes, cuya función principal es proporcionar una superficie estable para la germinación de semillas sin influencia de nutrientes externos. Aunque, sin lugar a duda uno de los medios de cultivo más recomendado para la siembra de tejidos vegetales con fines de investigación científica es el medio Murashige & Skoog (MS) este medio contiene una mayor cantidad de sales

inorgánicas incluyendo nitratos y amonio, además de vitaminas (Starling & Dodds, 1983; Roca & Mroginsky, 1993).

Hasta la fecha, no se han reportado estudios sobre la germinación en medios de cultivo *in vitro* para *Pseudosmodium barkleyi* y *Guaiaacum unijugum*. No obstante, se ha trabajado en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado, con semillas de *Guaiaacum sanctum* donde se obtuvo un 13% de semillas germinadas (Orantes-García et al., 2023).

Los medios de cultivo han sido utilizados en especies de la familia Anacardiaceae, como es el caso de *Schinus fasciculata*, las semillas se sembraron en medio agar-agua. El porcentaje de germinación a los 3 días de la siembra fue de 40% y a los 7 días alcanzó el 84%. A los 20 días las plántulas se trasplantaron a medio MS en dos diluciones: un cuarto (MS $\frac{1}{4}$) y un medio (MS $\frac{1}{2}$). En las plántulas cultivadas en ambas diluciones de MS se observó la regeneración de un brote por explanto. El 94% de los brotes en MS $\frac{1}{4}$, en el medio con mayor concentración de sales (MS $\frac{1}{2}$) el número de brotes con hojas alcanzó el 100 % (Freire et al., 2014).

En *Pistacia terebinthus* (Anacardiaceae), se pusieron a germinar las semillas en tres medios diferentes de germinación: WP (Lloyd y McCown, 1980), MS (Murashige y Skoog, 1962) y C2D (Cheé y Pool, 1987) en oscuridad a 5°C. Se obtuvo una germinación muy alta en los diferentes medios, llegando al 100% en el medio MS, WP 58% y C2D 83% (García et al., 2010).

En *Schinopsis balansae* las semillas se sembraron en un medio de agar-agua (medio AA). Se obtuvo un 69 % de germinación en medio agar-agua a los siete días de la siembra, las plántulas obtenidas se trasplantaron a dos diluciones del medio MS (100 y 50 %), no se observaron diferencias significativas entre las diluciones del medio MS en el número de hojas, la longitud de vástago y la longitud de la raíz primaria (Alzugaray et al., 2013).

En este contexto, el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) ha demostrado ser particularmente eficaz, debido a su alta concentración de nutrientes. Además, al ser

suplementado con reguladores de crecimiento, dicho medio favorece significativamente los porcentajes de germinación (Orantes-García et al., 2023).

2.6 Reguladores de crecimiento (RC)

Los reguladores de crecimiento (RC) son compuestos de origen natural o sintético que, incluso en bajas concentraciones, desempeñan un papel fundamental en la regulación de diversos procesos metabólicos y fisiológicos en las plantas. Estos compuestos intervienen en múltiples etapas del desarrollo vegetal, tales como la germinación de semillas, enraizamiento, movimientos y elongación celular, floración, maduración de frutos, senescencia, así como en la respuesta y adaptación a condiciones de estrés biótico y abiótico. Hasta la fecha, se han identificado diez principales tipos de reguladores de crecimiento: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, ácido salicílico, poliaminas, ácido jasmónico, brasinoesteroides y estrigolactonas. Cada uno de estos compuestos cumple funciones específicas (Méndez-Delgado, 2023; Borjas-Ventura et al., 2020).

En trabajos previos en el Banco de Germoplasma de Semillas del HJBU-BUAP, como el de Melissa Gómez Islas, sobre Germinación de *Croton rosarianus* y *Pseudosmodium barkleyi* dos especies endémicas en estado decreciente pertenecientes al estado de Puebla tesis que se encuentra en proceso, se observó el problema del desarrollo del sistema radicular en *P. barkleyi* por tal razón se decidió en este trabajo utilizar una hormona de crecimiento vegetal (Auxinas) en alguno de los medios para estimularla, y poder evaluar el efecto de este durante la germinación.

Las auxinas son reguladores del crecimiento que pueden promover el alargamiento y división celular in vivo a concentraciones tan bajas como 0.01 $\mu\text{mol/L}$ (Amador-Alfárez et al., 2013). El Ácido 1-naftalenacético (ANA), es una auxina sintética cuya aplicación tanto en viveros como en la producción a campo, ha mostrado la capacidad de inducir el proceso de enraizamiento en diferentes cultivos, tales como

forestales, frutales y ornamentales (Burgos et al., 2009; Amador-Alfárez et al., 2013).

2.7 Amenazas

Los factores que se han identificado como amenazas para la biodiversidad y causales directos de la extinción de especies varían según el grupo taxonómico, pero entre ellos se cuentan: la destrucción de sus hábitats (por incendios, cambios de uso de suelo), la contaminación, la sobreexplotación, la introducción de especies exóticas, el cambio climático (Martínez-Meyer, et al., 2014). Además de la minería de cielo abierto (o de tajo abierto) la cual es una actividad industrial de alto impacto ambiental, social y cultural, esta consiste en remover la capa superficial del suelo para hacer accesibles los extensos yacimientos de mineral de baja calidad (Sánchez-Salinas et al., 2014).

Guaiaicum unijugum es una especie de la familia Zygophyllaceae endémica de México, que se localiza en Baja California Sur con solo 3 poblaciones las cuales son: 1ª. Boca de la Vinorama, 2ª. Bahía los Frailes, 3ª Costa Azul, siendo esta última la más afectada debido a que está cerca del arroyo el cual sirve de calzada y que está sujeto a la remoción de grava, siendo un ejemplo de las especies cuyas poblaciones al no tener un uso antropogénico han sido afectadas por la destrucción del hábitat, colocándola en categoría de peligro crítico de extinción (CR, por sus siglas en inglés) de acuerdo con la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) (IUCN, 2018).

Cabe resaltar, por el uso maderable que tienen algunas especies como *Guaiaicum sanctum*, entre otras, todas las especies de *Guaiaicum* están incluidas en la lista del 2003 en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) debido a la incapacidad de diferenciar la madera entre diferentes especies (McCauley et al., 2010).

Otro ejemplo de especies que se ven afectadas por la destrucción del hábitat y por falta de tener un uso antropogénico es *Pseudosmodium barkleyi* de la familia Anacardiaceae, la cual también es una especie endémica a México que se distribuye en Guerrero y Puebla contando con alrededor de menos de 2 500 individuos los cuales están experimentando un declive continuo debido a las amenazas del hábitat como son el cambio de uso del suelo, la fragmentación de los ecosistemas por actividades mineras e incendios frecuentes, por lo que se prevé que en el futuro se produzca una reducción de individuos maduros de al menos el 20%, colocándola en peligro de extinción (EN) de acuerdo con la IUCN (Martínez-Salas et al., 2020).

Por el, creciente deterioro del que han sido objeto las especies vegetales, surge la necesidad de crear estrategias enfocadas en la conservación y recuperación de especies (Rodríguez-González, 2006).

III Justificación

La acelerada erosión de los recursos fitogenéticos representa una amenaza crítica para la biodiversidad, especialmente en regiones mega diversas como México. En respuesta, se han optimizado estrategias de conservación *ex situ*, destacando entre ellas el uso de técnicas biotecnológicas como el cultivo *in vitro*, que permite la propagación generativa bajo condiciones ambientales controladas, favoreciendo la germinación y establecimiento de especies con altos niveles de riesgo como son *Guaiaacum unijugum* y *Pseudosmodium barkleyi*.

IV Hipótesis

La evaluación de la propagación generativa mediante semillas en especies clasificadas en categoría de riesgo de extinción, bajo condiciones ambientales controladas, permitirá incrementar significativamente su tasa de germinación y establecimiento, esperando que *Guaiaacum unijugum* alcance su mayor porcentaje de germinación cuando las semillas sean sometidas al tratamiento de escarificación siendo colocadas en medio Murashige & Skoog (MS). De manera similar, se espera que *Pseudosmodium barkleyi* presente la máxima germinación cuando las

semillas sean sometidas al tratamiento de humo siendo colocadas en medio con Auxina, obteniendo el mayor número de plantas aclimatadas, para su posterior resguardo en los bancos de germoplasma en condiciones *in vitro* como *ex vitro* del Herbario y Jardín Botánico Universitario

V Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la eficiencia de germinación de *Guaiaacum unijugum* y *Pseudosmodingium barkleyi*, especies en categoría de riesgo, bajo la aplicación de diferentes tratamientos pre-germinativos, medios de cultivo y concentración hormonal, con el fin de obtener información básica sobre su biología germinativa

4.2 Objetivos particulares

- Comparar el éxito de germinación de las especies amenazadas *Guaiaacum unijugum* y *Pseudosmodingium barkleyi* en dos medios de cultivo distintos (Murashige & Skoog y Agar-agua).
- Evaluar el éxito de germinación de las especies amenazadas *Guaiaacum unijugum* y *Pseudosmodingium barkleyi* mediante la aplicación de tratamientos pre-germinativos específicos. Evaluar la viabilidad de las semillas de *Guaiaacum unijugum* y *Pseudosmodingium barkleyi* después de un periodo de almacenamiento, con el propósito de determinar el efecto del tiempo de conservación sobre su capacidad germinativa .
- Conocer el comportamiento de aclimatación de plántulas de *Guaiaacum unijugum* y *Pseudosmodingium barkleyi* en sustrato, con el fin de evaluar su adaptación y supervivencia en condiciones *ex vitro*.

VI Materiales y métodos

6.1 Caso A: Ensayo de Germinación de *Guaiaicum unijugum* Brandege

6.1.1 Descripción biológica de *G. unijugum*

Guaiaicum unijugum es una especie endémica y rara de México, perteneciente a la Familia Zygophyllaceae, localizada en Baja California Sur, cuenta con 3 poblaciones las cuales son: 1ª. Boca de la Vinorama, 2ª. Bahía los Frailes, 3ª Costa Azul; habita en matorrales espinosos xerófilos-sarcocauléscentes; *G. unijugum* es un arbusto de ramificación divaricada que crece hasta unos 2 m de altura en dunas costeras y lavados arenosos, tiene pequeñas hojas pinnadas compuestas con generalmente uno o raramente 2 pares de folíolos, produce flores de cinco meras con pétalos de color azul claro a mediados del verano, los cuales maduran hasta convertirse en una cápsula de color marrón amarillento, una semilla arilada de color naranja rojizo (McCauley et al., 2010; IUCN, 2018).

La actividad humana (tala clandestina, construcción de infraestructura hotelera y residencial, la agricultura y ganadería) parece ser la principal amenaza de la pérdida de individuos en sus sitios de distribución, por lo tanto, la especie ahora se encuentra en el apéndice II de CITES y en la Red List de la IUCN en categoría de Peligro Crítico (PC) además de su naturaleza micro endémica debido al pequeño número de individuos y poblaciones, la lenta tasa de crecimiento y regeneración, y los bajos niveles de diversidad genética, a pesar de esta situación no ha sido evaluada en la NOM-059 (SEMARNAT, 2010, Fuentes y Samain, 2018)

Se utilizaron semillas de *Guaiaicum unijugum*, de 2 accesos (20230128 y 20230129) almacenadas durante 2 meses, a 5 °C en el Banco de Germoplasma de Semillas (BGC) del HJBU-BUAP.

6.1.2 Tratamientos pre-germinativos y medios en las semillas de *G. unijugum*

Con la finalidad de evaluar el tratamiento pre-germinativo y el medio de cultivo se llevó a cabo un diseño factorial. Por lo tanto, como tratamiento pre-germinativo fue:

escarificación física (ESC), antes de efectuar la escarificación se retiró el arilo de manera manual con pinzas, con un Dremel modelo 3000, se lijo la semilla con la intensidad mínima hasta observar un cambio de color en la testa y un testigo/control (C), como medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) y Agar-agua (A.A).. La unidad experimental de cada tratamiento contó con 15 semillas por tratamiento (Tabla 1). Se utilizó esta cantidad porque fue la recolectada y donada. Se consideró germinada la semilla cuando tuvo una longitud de 0.5 cm.

Tabla 1. Diseño experimental para evaluar el tratamiento pre-germinativo y el medio de cultivo de *Guaíacum unijugum*

Agar-agua (A.A)	Control	• Porcentaje de germinación (PG). • Índice de velocidad de germinación (IVG). •
	Escarificación	
Murashige & Skoog (MS)	Control	
	Escarificación	

Previo a la preparación del medio MS, se hicieron los cálculos para la concentración de la solución requerida (Tabla 2). En un vaso de precipitado, se colocaron todos los componentes y con una bala magnética se mezcló todo. Se afora la solución con agua destilada a la cantidad requerida. Se ajusta el pH del medio a 5.7 ± 0.1 con ayuda de un potenciómetro, se calibra con buffers de 4 y de 7 para una medición óptima del medio. Se vierte el agar y se agita hasta que se disuelva.

Tabla 2. Componentes (Fe: stock de hierro, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: cloruro de calcio dihidratado), concentración y cantidad para la preparación del medio Murashige & Skoog (MS).

Componente	Concentración	Cantidad 1L
Macroelementos	10 x	100 mL
Microelementos	100 x	10 mL
Fe-EDTA	100 x	10 mL
Vitaminas		10 mL
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 x	100 mL
Sacarosa		30 gr
Agar		9 gr
pH		5.7

Para la preparación del medio Agar-agua 1 % se afora la cantidad requerida con agua destilada.

Finalmente, en cada frasco tipo Gerber, previamente esterilizados se colocan 25 mL de medio de cultivo, se tapan y etiquetan. Posteriormente se esterilizan en la autoclave a 121°C por 15 min. Una vez pasado el tiempo se dejan enfriar y se espera 3 días para verificar que no presente algún microorganismo previamente a la siembra.

Antes de sembrar las semillas en los medios estas se sometieron a un protocolo de desinfección que consistió en un lavado durante 10 min con agua y jabón, tallando con un cepillo, seguido de una solución antifúngica Captán al 1 % durante 20 min. En una campana de flujo laminar se colocaron en Etanol 70 % durante 15 min, seguido de Hipoclorito de sodio al 15 % con 1 gota de Tween 20 durante 15 min, se realizaron dos lavados con agua destilada estéril, posteriormente se colocaron en Cloruro de mercurio 1 % durante 5 min y finalmente tres lavados con agua destilada estéril. Todos los enjuagues se realizaron en agitación constante. En condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, las semillas fueron colocadas, dos por frasco y una semilla en un frasco en medio MS y A.A. Todos los frascos fueron rotulados y colocados en una cámara de germinación a $25^\circ\text{C} \pm 1$ y fotoperiodo de 12 hr luz/oscuridad por un periodo de 34 días. El monitoreo de la germinación se realizó de manera periódica tres veces por semana, específicamente los lunes,

miércoles y viernes. En cada una de las evaluaciones se registró el número de semillas germinadas, considerando como semilla germinada aquella en la que se observó la emergencia de la radícula. Evaluando el porcentaje de germinación y velocidad de germinación.

6.1.3 Análisis de datos de la Germinación de *G. unijugum*

Se realizó un análisis descriptivo de las variables porcentaje de germinación (PG) e índice de velocidad de germinación (IVG) con el propósito de caracterizar el comportamiento germinativo de *Guaiaicum unijugum*. Cabe mencionar que no existieron repeticiones por el número limitado de semillas, por lo que la gráfica obtenida no pudo interpretarse estadísticamente.

El porcentaje de germinación (PG) se calculó mediante la suma de las semillas germinadas divididas entre el número total de semillas puestas a germinar y el resultado se multiplicó por 100 (Caroca et al., 2016).

$$\text{Ecuación 1. } PG = \frac{\Sigma \text{ semillas germinadas}}{\text{Total de semillas}} \times 100$$

Índice de velocidad de germinación (IVG). Determinado según Ecuación 2 donde: n_i es el número de semillas germinadas en el intervalo de tiempo t_i y Σt_i es el período en días desde la siembra hasta el día final del experimento (Ranal & Santana, 2006).

$$\text{Ecuación 2: } IVG = \frac{\Sigma [n_i / (\Sigma t_i)]}{\Sigma t_i}$$

6.1.4 Aclimatación de las plántulas de *G. unijugum*

Una vez germinadas las semillas, sin importar el pretratamiento y medio de cultivo se retiraron del medio con pinzas y con delicadeza para evitar dañar la plántula. La raíz se lavó con cuidado esto con la finalidad de evitar que quedaran residuos del medio, se trasplantó con la mano y guantes 1 plántula por cavidad en charola de 50

cavidades con sustrato en proporción 1:1:1 de perlita, cacahuatillo y Peat Moss, las plántulas fueron marcadas con una etiqueta, se taparon con domo y fueron ingresadas a un cuarto de crecimiento con temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ y fotoperiodo de 12 hr luz/oscuridad. Por un periodo de 20 días, se evaluó la altura, diámetro del tallo, este dato fue tomado con un Vernier digital de la marca Truper de cada plántula.

6.2 Caso B: Ensayo de Germinación de *Pseudosmodingium barkleyi* Miranda

6.2.1 Descripción biológica de *P. barkleyi*

Pseudosmodingium barkleyi es una especie endémica de México perteneciente a la Familia Anacardiaceae, localizada en el estado de Guerrero, en el área del Cañón del zopilote y en el estado Puebla en el municipio de Jolalpan. Habita en bosques tropicales caducifolios con suelos cársticos en un rango de altitud de 600 a 1 000 m; *P. barkleyi* es un arbusto o árbol pequeño, glabro o mínimamente pubescente, ramas engrosadas de color oscuro, con frecuencia provistas de cicatrices foliares semejantes a tubérculos. Las hojas son alternas, imparipinnadas a menudo aglomeradas en los ápices de las ramillas. Presenta flores pequeñas y numerosas sostenidas por pedicelos delgados, agrupadas en fascículos a modo de inflorescencias pseudoracemosas o paniculadas; las semillas son reniformes, comprimidas (Rzedowski et al., 1999; Martínez Salas et al., 2020).

La minería y los incendios frecuentes ocurren en toda su zona de distribución, lo que ha reducido su área de ocupación (AOO), además el número total de individuos maduros se estima en menos de 2,500, los cuales están experimentando un declive continuo, por lo tanto, esta especie se cataloga en la Lista Roja de la IUCN en peligro de extinción (EN) (Martínez Salas, et. al, 2020, Red de Herbarios Mexicanos, 2025)

6.2.2 Tratamientos pre-germinativos y medios en las semillas de *P. barkleyi*

Se estableció un diseño experimental factorial completo 2^4 , debido a que se evaluó el medio de cultivo y el tratamiento pre-germinativo de humo (H) y un control (C),

además de 4 medios de cultivo los cuales fueron: 1) agar con agua (AA), 2) agar agua con auxina en cantidad de 0.0005 mg/L (AA/ANA), 3) Murashige & Skoog (MS); 4) Murashige & Skoog con auxina en cantidad de 0.0005 mg/L (MS/ANA), la unidad experimental de cada tratamiento fue de 30 semillas, con cuatro repeticiones, por lo tanto, se usaron 120 semillas por repetición, dando un total de 960 semillas usadas por todo el experimento (Tabla 3).

Los medios fueron colocados en una cámara a temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ y fotoperiodo de 12 hr luz- oscuridad. Por un periodo de 43 días, evaluando el porcentaje de germinación y velocidad de germinación tres veces por semana, específicamente los lunes, miércoles y viernes.

Tabla 3. Diseño experimental para evaluar el medio de cultivo y tratamiento pregerminativo de *Pseudosmodingium barkleyi* para ensayo de germinación.

Medio	Tratamiento	Variables evaluadas
Agar-Agua	Control (AA/C)	• Porcentaje de germinación (PG) % • índice de velocidad de germinación (IVG) • Altura de la plántula • Diámetro de la plántula • Supervivencia
	Humo (AA/H)	
Agar-Agua + ANA	Control	
	Humo	
Murashige & Skoog	Control (MS/C)	
	Humo (MS/H)	
Murashige & Skoog +ANA	Control	
	Humo	

Finalmente, en cada frasco previamente esterilizados se colocan 25 mL de medio de cultivo se tapan y etiquetan. Posteriormente se esterilizan en la autoclave a

121°C por 15 min. Una vez pasado el tiempo se dejan enfriar y se espera 3 días para verificar que no presente algún microorganismo previamente a la siembra.

Previo a colocar las semillas en los medios de cultivo, se llevó a cabo el tratamiento pre-germinativo de humo, este consistió en recolectar hojas (50g) y ramas secas (50 g), se colocaron en un ahumador de acero, con un trozo de ocote se prendió fuego, una vez prendido el fuego se tapó el ahumador, se bombeo hasta que empezó a salir humo, se colocó en la boquilla del ahumador el frasco que contenía solo las semillas, se cerró el frasco y se dejaron reposar por 40 min (Figura 2).



Figura 2. Prueba de humo: hojas y ramas secas dentro del ahumador , se prendió fuego, se prendió el fuego: a) humo colectado del ahumador, b) frasco con las semillas con el humo colectado.

Antes de efectuar los ensayos, las semillas se sometieron a un protocolo de desinfección después de haberlas sometido a la prueba de humo, este protocolo consistió en un lavado durante 45 min con agua y jabón, seguido de agua destilada con dos gotas de Tween 80 durante 30 min, Captan al 1 % más dos gotas de Tween 20 durante 30 min, pasado el tiempo se da un lavado con agua destilada. En una campana de flujo laminar se colocaron en Cloruro de mercurio 1% durante 8 min y finalmente tres lavados con agua destilada estéril. Todos los enjuagues se realizaron con un agitador orbital a 150 rpm. En condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar fueron colocadas 5 semillas por frasco en cada uno de los medio Murashige & Skoog (MS) y Agar-agua.

Con el objetivo de estimular el crecimiento radicular de las semillas germinadas de los medios que no tenían ANA (AA/C, AA/H, MS/C y MS/H) cuando la radícula tuvo una longitud promedio de 1 cm, fueron colocadas en medio MS con la auxina ANA (0.0005 mg/L), pasado 15 días de haber sido colocadas fueron trasplantadas a suelo para la fase de aclimatación.

6.2.3 Aclimatación de las plántulas de *P. barkleyi*

Después de que la radícula de las semillas alcanzó alrededor de 2 cm de longitud, se consideraron aptas para el trasplante a suelo en charolas de 50 cavidades, se trasplantaron 34 plántulas del tratamiento Agar-agua/Control, 29 plántulas del tratamiento Agar-agua/Humo, 16 plántulas del tratamiento MS/Control y 14 plántulas del tratamiento MS/Humo colocando una plántula por cavidad, con sustrato relación 1:1:1 de perlita, cacahuatillo y Peat Moss los cuales se colocaron dentro de un cuarto de crecimiento con temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ y fotoperiodo de 12 hr luz/oscuridad. Por un periodo de 10 semanas, considerando la altura, este dato fue tomado a partir de la base del tallo (en el suelo) hasta el punto más alto de la planta y el diámetro del tallo, estos datos fueron tomados con un Vernier digital de la marca Truper. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar el efecto del medio, el tratamiento y su interacción para altura, diámetro con el programa Minitab y Excel.

La supervivencia se tomó la proporción de plántulas vivas respecto al total inicial sembrado en el medio de cultivo, expresado en porcentaje (%). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar el efecto del medio, el tratamiento y su interacción para altura, diámetro con el programa Minitab y Excel.

6.2.4 Análisis de datos de la Germinación de *P. barkleyi*

El porcentaje de germinación (PG) por tratamiento se calculó mediante la suma de las semillas germinadas/divididas entre el número total de semillas puestas a germinar y el resultado se multiplicó por 100 (Caroca et al., 2016).

¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.

$$\text{Ecuación 3. } PG = \frac{\sum \text{semillas germinadas}}{\text{Total de semillas}} \times 100$$

Índice de velocidad de germinación (IVG). Determinado según Ecuación 2 donde: n_i es el número de semillas germinadas en el intervalo de tiempo t_i y $\sum t_i$ es el período en días desde la siembra hasta el día final del experimento (Ranal & Santana, 2006).

$$\text{Ecuación 4: } IVG = \frac{\sum [n_i / (\sum t_i)]}{n}$$

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar el efecto del medio, el tratamiento y su interacción para IVG y PG con el programa Minitab y Excel.

VII Resultados

7.1 Resultados del Ensayo de Germinación de *Guaiaicum unijugum*

7.1.1 Germinación de *G. unijugum*

De los ensayos que se llevaron a cabo en los medios de cultivo Agar-agua (AA) y Murashige & Skoog (MS) con el tratamiento pre-germinativo de escarificación se consideró como semilla germinada cuando la radícula emergió (Figura 3).

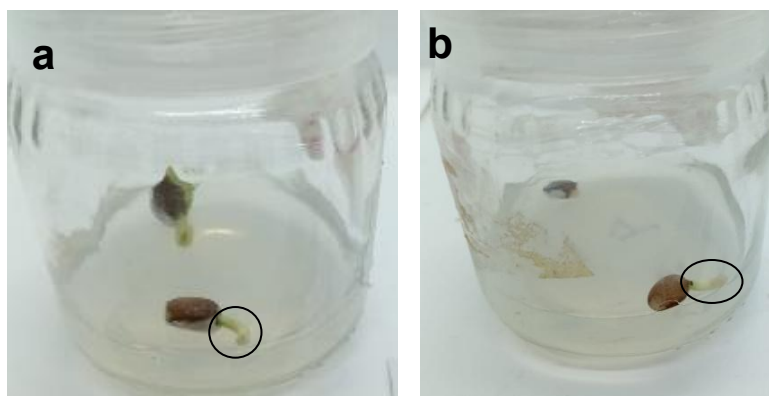


Figura 3. Semillas germinadas al 4to día después de la siembra de *Guaiaicum unijugum* a: Agar-agua, b: Murashige & Skoog (Ms)

Las semillas de Agar-agua/control y Agar-agua/escarificación empezaron a germinar al cuarto día de haber sido colocadas, observando una germinación de tipo epígea. Siendo el medio Agar-agua/control el que obtuvo el mayor porcentaje de germinación con un 100 % de semillas germinadas en el día 23. Por otro lado, las semillas de Agar-agua/escarificación obtuvo un porcentaje del 93 % en el día 31. Las semillas de Murashige & Skoog (MS)/control y Murashige & Skoog (MS)/escarificación empezaron a germinar al cuarto día de haber sido colocadas. Siendo el medio Murashige & Skoog (MS)/escarificación el que obtuvo un porcentaje de germinación del 86 % en el día 19. Por último, el Murashige & Skoog (MS)/control obtuvo un 80 % de semillas germinadas en el día 16 siendo el valor máximo de germinación en este tratamiento (figura 4).

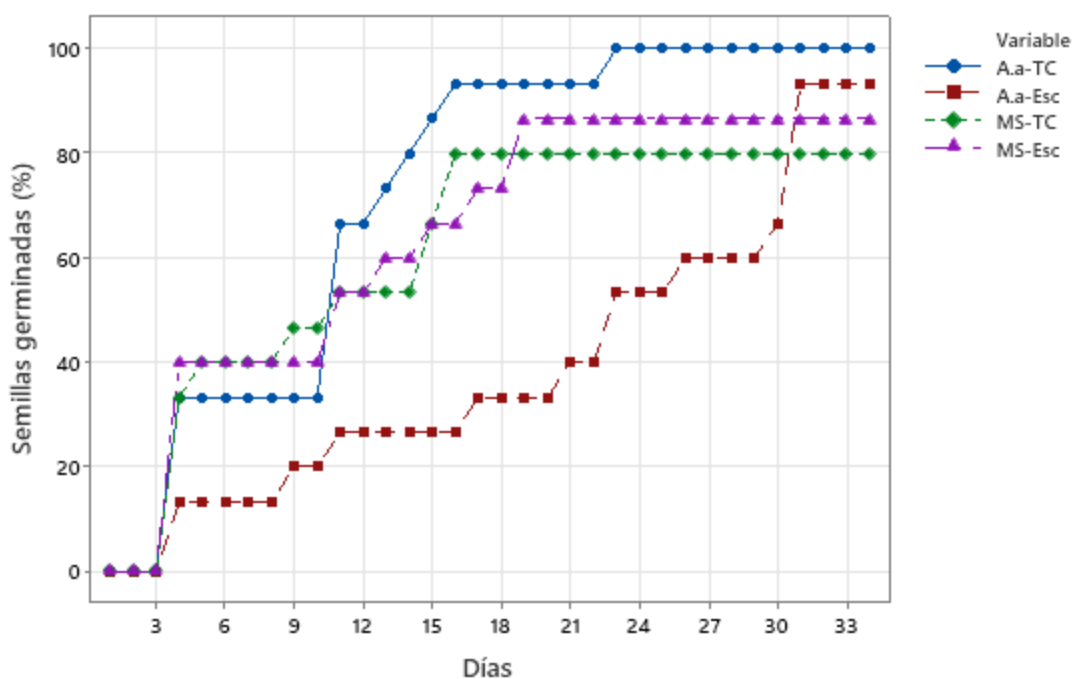


Figura 4. Porcentaje de germinación de *Guaiacum unijugum* de los tratamientos A.A/C 100 %, A.A/ESC 93 %, MS/ESC 86 %, MS/C 80 %.

El análisis descriptivo de las variables evaluadas muestra un comportamiento uniforme en la germinación de *Guaiacum unijugum*. El porcentaje de Germinación (PG) mostró una media de 1.28 con una desviación estándar de 0.30, lo cual sugiere una mayor variabilidad en comparación con el IVG. Los valores de mediana (1.30)

y moda (1.57) confirman una tendencia hacia porcentajes altos de germinación. El coeficiente de asimetría (-0.63) indica una ligera inclinación hacia valores superiores, mientras que la curtosis negativa (-0.61) sugiere una distribución más aplanada, con una dispersión leve alrededor del promedio.

Los resultados del índice de velocidad de germinación (IVG) nos arrojan que el medio A.A/C tiene un índice de 0.15, el medio A.A/ESC un 0.14, el medio MS/ESC un 0.13 y el medio MS/C un 0.12. El análisis descriptivo presentó una media de 0.14, con una mediana y moda de 0.15, lo cual indica una distribución centrada y homogénea de los datos. La desviación estándar (0.04) fue baja, evidenciando poca variabilidad entre repeticiones y una germinación relativamente constante. El coeficiente de asimetría (-0.82) señala una ligera asimetría negativa, es decir, la mayoría de los valores se concentraron hacia los valores más altos de IVG. Asimismo, la curtosis positiva (0.61) indica una distribución cercana a la normal, sin presencia de valores extremos. En conjunto, estos resultados reflejan una velocidad de germinación estable y consistente entre los tratamientos y medios evaluados.

7.1.2 Aclimatación de las plántulas de *G. unijugum*

Conforme las plántulas fueron creciendo en el medio de cultivo, se manifestaron síntomas de enfermedad en las estructuras vegetales (Figura 5), el 90% de las plántulas estaban enfermas, por lo que no lograron desarrollarse, por ende, no lograron ser colocadas en sustrato para la aclimatación y terminaron por morir en el medio de cultivo. No se obtuvieron datos de trasplante, lo que impidió que se tomaran datos de altura y diámetro.

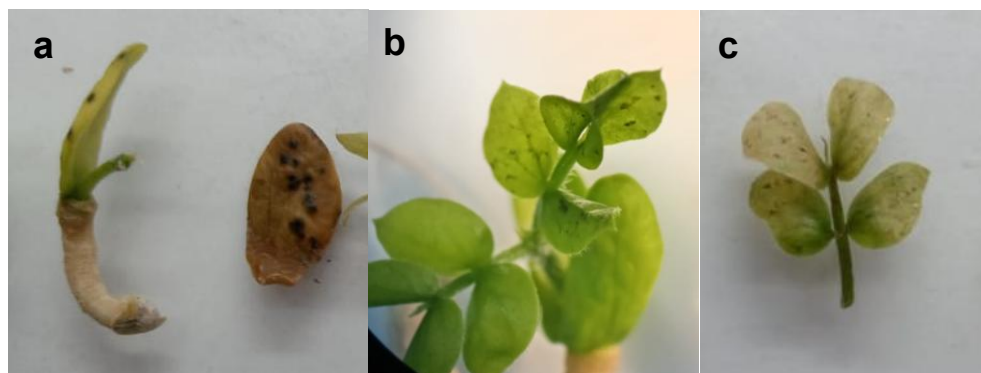


Figura 5. Desarrollo de síntomas de enfermedad en *Guaiacum unijugum*: a) puntos negros en cotiledones, b) puntos negros en hojas, c) hoja desprendida del tallo perdiendo color hasta secarse.

7.1.3 Discusión del ensayo de germinación y aclimatación de *Guaiacum unijugum*

Los resultados de este ensayo demuestran que esta especie logra germinar en un periodo de 4 días a partir de la siembra tanto con el tratamiento sin escarificación como en el tratamiento de escarificación, siendo las semillas que fueron colocadas en el medio agar-agua, las que obtuvieron los porcentajes más altos de germinación, siendo el tratamiento sin escarificación el que obtuvo 100 %, por lo que esta especie no necesita de un tratamiento pre-germinativo para germinar.

Cabe aclarar que *Guaiacum sanctum* y *Guaiacum coulteri* fueron colocadas en toallas absorbentes humedecidas, por lo que solo se tomaron los datos de porcentaje de germinación con el tratamiento de escarificación. El método de escarificación en *Guaiacum unijugum* no influye en el porcentaje de germinación, ya que con este método se obtienen porcentajes de germinación de 86% y 80%. Estos resultados difieren de lo encontrado en *Guaiacum sanctum*; una vez que se remueve el arilo, alrededor del 100 % de las semillas logran germinar en un periodo de 2 a 5 días con el tratamiento pre-germinativo de escarificación, mientras que en el testigo no germinaron (Taylor , 1966). Las semillas de *Guaiacum unijugum* presentaban un periodo de almacenamiento de dos meses previo a su siembra, a diferencia de las semillas de *Guaiacum sanctum*, las cuales fueron utilizadas

inmediatamente después de su recolección, esta diferencia en el tiempo de almacenamiento podría influir en el comportamiento germinativo. En *Guaiaacum coulteri* en las semillas sin escarificar se obtuvo el menor porcentaje de germinación con 10%, mientras que las semillas lijadas germinan al segundo día obteniendo un porcentaje de germinación del 86.7% (Sánchez-Soto et al., 2017), este porcentaje es similar al obtenido en este trabajo con el tratamiento de escarificación en el que se obtuvo un 86%, esto puede deberse a que tanto a las semillas de *G. coulteri* y *G. unijugum* se les retiro el arilo. Se ha descrito que en condiciones naturales existen semillas de *G. sanctum* en las que el arilo, por lo general, se deteriora rápidamente y es fácil de remover (Taylor, 1966; Wendelken & Martin, 1987). Por lo que la remoción del arilo se sugiere como un tratamiento pregerminativo alternativo, retiro debido a que esta se presenta como una estrategia eficaz para el proceso de germinación.

En general, el análisis descriptivo en Porcentaje de Germinación (PG) e Índice de Velocidad de Germinación (IVG), ambos indicadores evidencian que las semillas de *G. unijugum* presentan una alta capacidad germinativa y una velocidad de emergencia uniforme, sin requerir un tratamiento pre-germinativo específico.

7.1.4 Conclusión del ensayo de germinación y aclimatación de *Guaiaacum unijugum*

Los resultados obtenidos muestran que *Guaiaacum unijugum* posee un alto potencial germinativo *in vitro*, alcanzando hasta un 100 % de germinación en el medio Agar-agua sin escarificación. A pesar de que el estudio no contó con réplicas ni rigor estadístico, los datos generados proporcionan información valiosa para comprender el comportamiento germinativo de la especie y constituyen una base inicial para futuros estudios. Además, la viabilidad observada en las semillas después de dos meses de almacenamiento sugiere que podrían clasificarse como semillas ortodoxas. En conjunto, estos resultados representan un primer acercamiento al establecimiento de protocolos de propagación *in vitro*.

7.2 Resultados Caso B: Ensayo de germinación de *P. barkleyi*

7.2.1 Germinación de *P. barkleyi*

El inicio de la germinación en el medio Agar-agua con y sin ANA fue a los 5 días de colocadas en el medio tanto en el control como con el tratamiento de humo. Obteniendo el máximo porcentaje de germinación en el medio Agar-Agua sin hormona a los 16 días con el tratamiento de Humo y a los 17 días en el control. En lo que respecta al medio Agar-Agua con ANA control y tratamiento de humo fue a los 22 días (Figura 6).

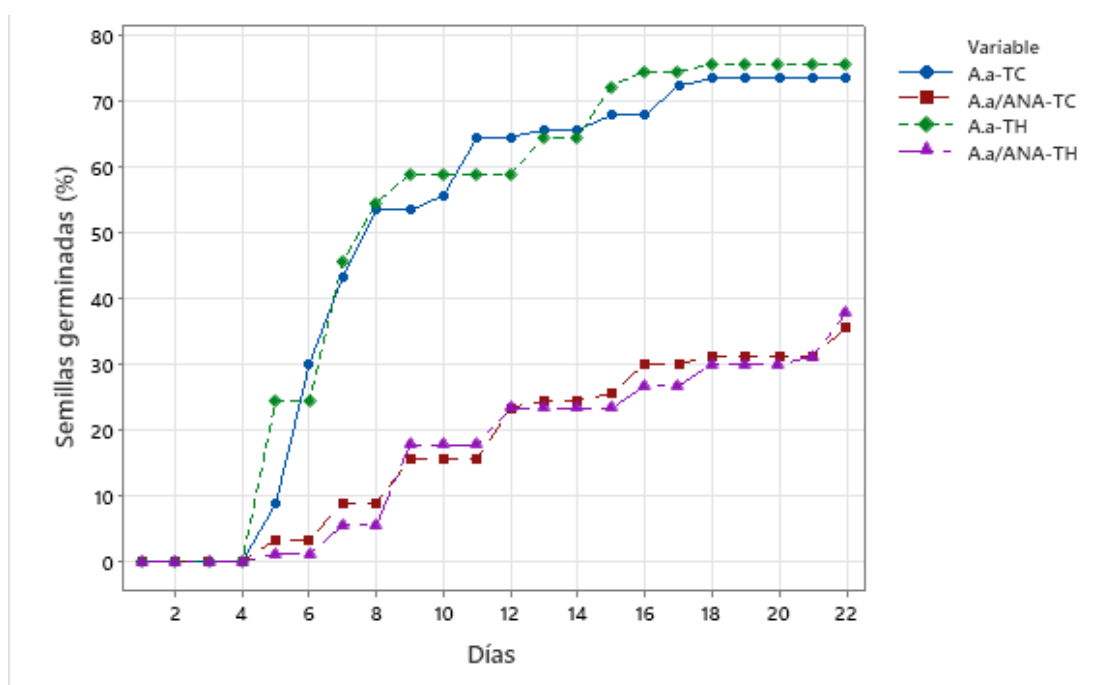


Figura 6. Germinación para el medio Agar-Agua de *Pseudosmodium barkleyi*.

Por otro lado, el inicio de la germinación en el medio Murashige & Skoog (MS) con y sin ANA en el tratamiento control fue en el día 7, obteniendo el máximo porcentaje de germinación en el día 22. En lo que respecta al medio Murashige & Skoog (MS)/ANA con tratamiento pre-germinativo de humo el inicio de la germinación fue en el 12 obteniendo el punto más alto en el día 16 (Figura 7).

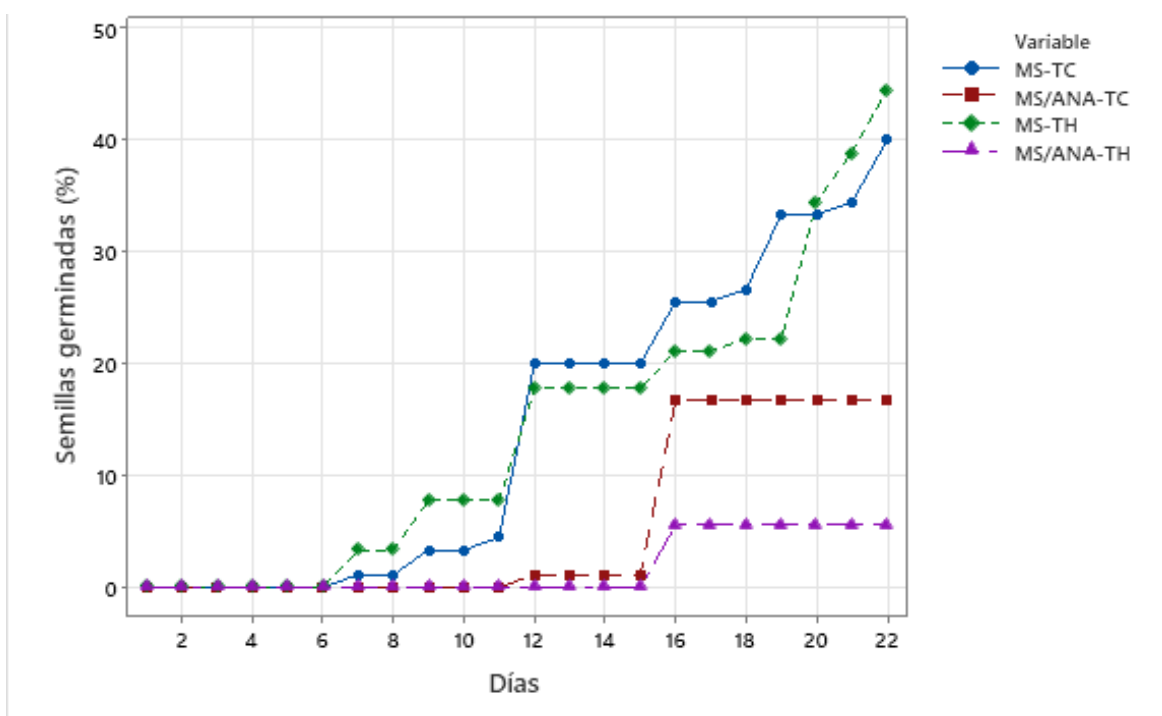


Figura 7. Germinación para el medio Murashige & Skoog (MS) de *Pseudosmodium barkleyi*.

El medio A.A/H, fue el que obtuvo el mayor porcentaje de germinación con un 75 % ($\bar{x}=42.53$, $\sigma^2= 499.05$) de semillas germinadas, seguido por el medio A.A/C con un porcentaje de 73 % ($\bar{x}=41.45$, $\sigma^2= 496.5$). El medio MS/H con un porcentaje de germinación de 44 % ($\bar{x}=18.02$, $\sigma^2= 88.08$), seguido por el medio MS/C 40 % ($\bar{x}=17.68$, $\sigma^2= 214.8$), el medio A.A/ANA/H con un 37 % ($\bar{x}=21.05$, $\sigma^2= 177.06$), el medio A.A/ANA/C con un 35 % ($\bar{x}=21.93$, $\sigma^2= 167.26$), el medio MS/ANA/C 16 % ($\bar{x}=8.76$, $\sigma^2= 119.93$), por último, el medio MS/ANA/H con un 5 % ($\bar{x}=4.33$, $\sigma^2= 42.19$) siendo el medio con menor porcentaje de germinación (Figura 8). De acuerdo con el análisis estadístico para el porcentaje de germinación (PG), existen diferencias estadísticamente significativas entre los medios evaluados ($F= 40.40$; $p= 1.03 \times 10^{-19}$) significa que el tipo de medio influye, el tratamiento no presentó un efecto significativo ($F= 0.17$; $p= 0.67$) no tuvo efecto detectable por sí solo. Así mismo la interacción entre medio y tratamiento no mostró una significancia estadística ($F= 0.28$; $p= 0.84$), es decir, el efecto del tratamiento no depende del tipo de medio utilizado, ni el medio modifica la respuesta del tratamiento.

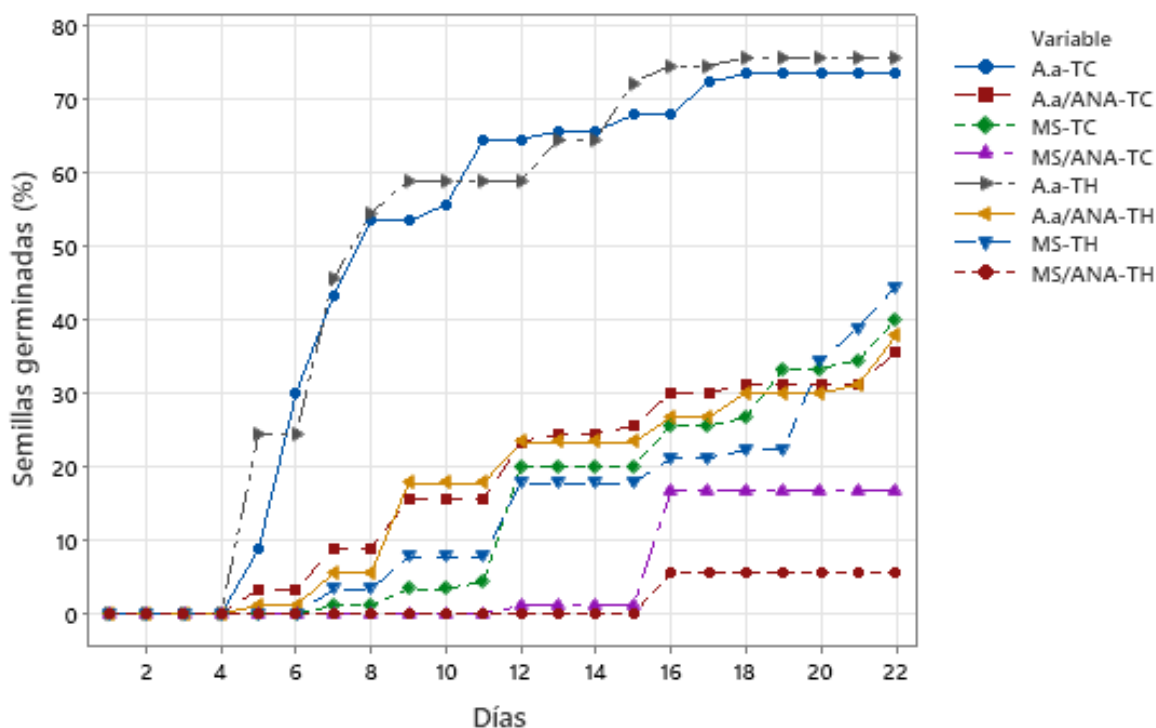


Figura 8. Porcentaje de germinación de *Pseudosmodinium barkleyi*: A. A/C 73 %, MS/C 40 %, A. A/ANA/C 35 %, MS/ANA/C 16 %. A.A/H 75 %, MS/H 44 %, A. A/ANA/H 37 %, MS/ANA/H 5 %.

La mayor velocidad de germinación la presenta el medio Agar-agua con el tratamiento pre-germinativo de humo con 0.63 ($\bar{x}=0.17$, $\sigma^2= 0.04$), seguido por el medio agar-agua control con 0.56 ($\bar{x}=0.20$, $\sigma^2= 0.06$), el medio agar-agua control con la auxina ANA con 0.44 ($\bar{x}=0.12$, $\sigma^2= 0.02$), el medio agar-agua humo con la auxina ANA con 0.38 ($\bar{x}=0.13$, $\sigma^2= 0.02$), el medio Murashige & Skoog (MS) con humo con 0.37 ($\bar{x}=0.10$, $\sigma^2= 0.02$), el medio Murashige & Skoog (MS) control con 0.28 ($\bar{x}=0.07$, $\sigma^2=0.01$), el medio Murashige & Skoog (MS) con la auxina ANA con 0.25 ($\bar{x}=0.03$, $\sigma^2= 0.02$), siendo el medio Murashige & Skoog (MS) con el tratamiento pre-germinativo de humo el que menor índice presenta 0.17 ($\bar{x}=0.05$, $\sigma^2= 0.03$). El análisis estadístico para el índice de velocidad de germinación (IVG) nos indica que se encontró diferencia significativa entre los medios utilizados ($F= 5.09$; $p= 0.001$), el tratamiento no mostró un efecto significativo ($F= 0.19$; $p= 0.88$), lo que sugiere que este factor no influyó de manera relevante. Así mismo la interacción entre medio y tratamiento no mostro una significancia estadística ($F= 0.22$; $p= 0.88$) lo que indica

que el efecto de cada factor es independiente. Esto quiere decir, que el medio y el tratamiento actúan por separado, de modo que el efecto de un tratamiento es el mismo sin importar el medio en el que se aplique.

7.2.2 Evaluación del crecimiento de las plántulas de *P. barkleyi*

- Altura

La altura de las plántulas se registró inicialmente antes del trasplante y nuevamente después de diez semanas de aclimatación, se observó una disminución en la altura de las plántulas correspondientes a los tratamientos A.A/C, A.A/H y MS/C, lo que podría atribuirse al proceso de aclimatación de las nuevas condiciones *ex vitro*, donde el crecimiento se presentó de manera lenta. En contraste, las plántulas provenientes del tratamiento MS/H mantuvieron un desarrollo más favorable, alcanzando una altura final promedio de 8.4 cm, evidenciando una mejor respuesta al trasplante. Asimismo, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los medios de cultivo, siendo el medio MS/H el que presentó el valor promedio más alto ($\bar{x}$ = 8.99; σ^2 = 2.70), lo que indica una respuesta superior y con mayor variabilidad en comparación con los demás tratamientos. En cambio, los medios A.A/C, A.A/H y MS/C mostraron valores promedio más bajos ($\bar{x}$ = 3.18; 2.68 y 6.75, respectivamente), reflejando un crecimiento limitado (Figura 9).

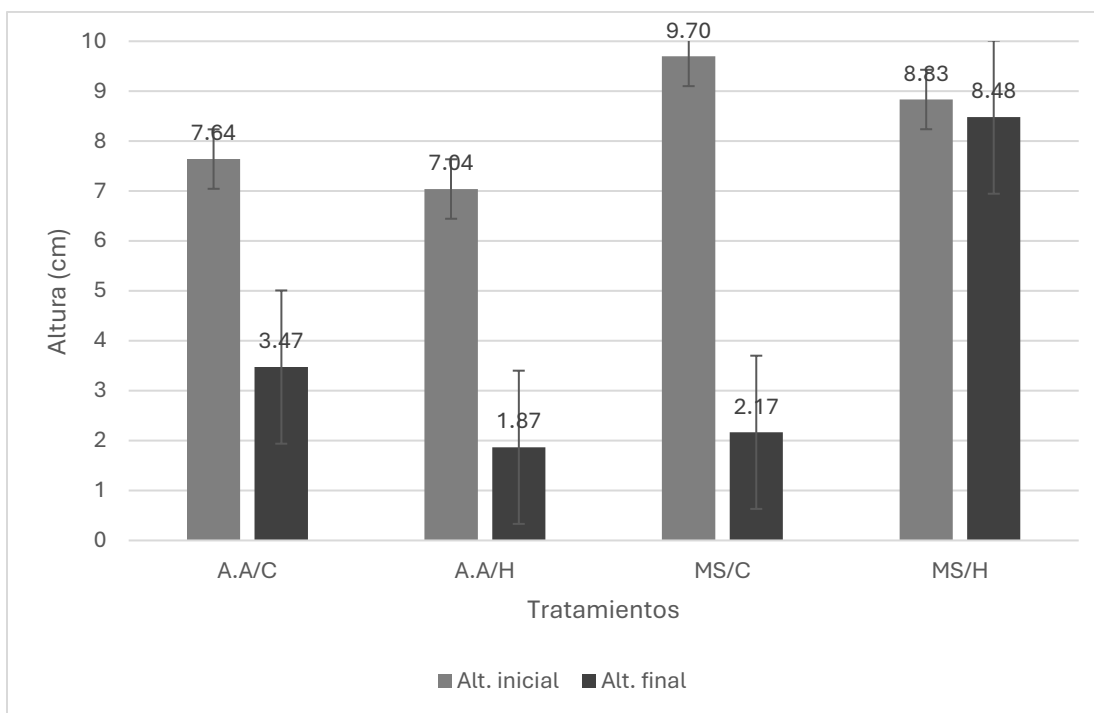


Figura 9. Medida inicial y final en el crecimiento de altura en plántulas de *Pseudosmodium barkleyi*, provenientes de los diferentes tratamientos.

Se observaron diferencias notables entre los tratamientos y medios de cultivo evaluados. Los valores promedio registrados indican que las plántulas cultivadas en el medio A.A presentaron una altura promedio de 2.93 mm, mientras que aquellas desarrolladas en el medio MS alcanzaron un valor superior de 7.87 mm, evidenciando un crecimiento más favorable en este último. Dentro de los tratamientos, el uso de Humo mostró un incremento en la altura promedio (8.99 mm en MS/H) en comparación con los tratamientos con Control (6.75 mm en MS/C). El análisis de varianza (ANOVA) reveló diferencias significativas para el medio ($F=51.61$; $p=1.88 \times 10^{-8}$), lo que indica que el medio aplicado influyó significativamente en la altura de las plántulas. En contraste, el tratamiento no presentó un efecto significativo ($F=1.60$; $p=0.21$), mientras que la interacción entre medio y tratamiento mostró una tendencia cercana a la significancia ($F=3.96$; $p=0.05$), lo que sugiere una posible influencia combinada entre ambos factores.

- Diámetro

El diámetro de las plántulas se registró inicialmente antes del trasplante y nuevamente después de diez semanas de aclimatación las plántulas de los tratamientos A.A/C, A.A/H y MS/C fueron las que tuvieron una disminución en su diámetro, lo que podría atribuirse al proceso de aclimatación de las nuevas condiciones *ex vitro*, donde el crecimiento se presentó de manera lenta. Siendo las plántulas provenientes del medio MS/H las que aumentaron un diámetro superior a los demás medios con un diámetro final de 1.30 mm (Figura 10).

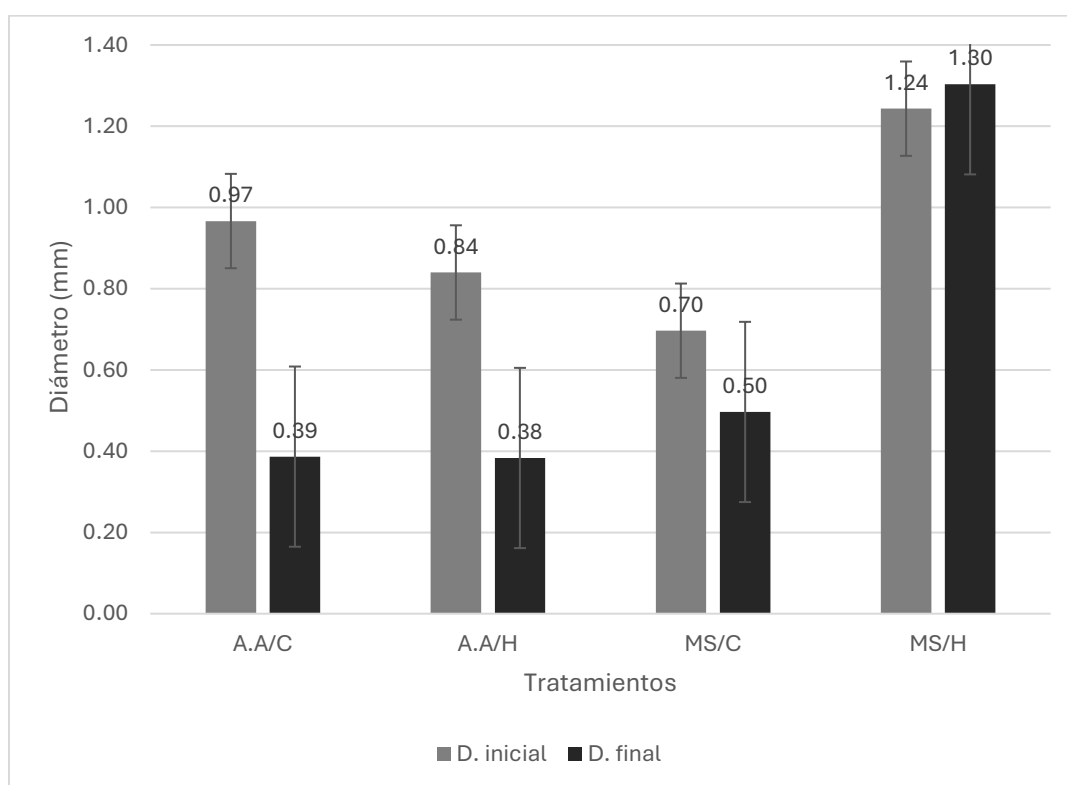


Figura 10. Crecimiento de diámetro en plántulas de *Pseudosmodium barkleyi*, provenientes de los diferentes tratamientos.

Asimismo, en el análisis estadístico se observaron diferencias entre los tratamientos y medios de cultivo. Los valores promedio mostraron que las plántulas cultivadas en el medio Murashige y Skoog (MS) presentaron un mayor diámetro, con 0.878 mm en el tratamiento Control (C) y 1.122 mm en el tratamiento con Humo (H), en comparación con las plántulas desarrolladas en el medio A.A, que registraron

promedios inferiores de 0.452 mm y 0.502 mm, respectivamente. El análisis de varianza (ANOVA) evidenció diferencias significativas para el medio ($F= 42.85$; $p= 1.30 \times 10^{-7}$), lo que indica que los medios ejercieron un efecto determinante sobre el diámetro de las plántulas. En contraste, el tratamiento no mostró diferencias significativas ($F= 3.38$; $p= 0.07$), y la interacción entre medio y tratamiento tampoco resultó significativa ($F= 1.47$; $p= 0.23$).

7.2.3 Supervivencia de plántulas de *P. barkleyi*

La supervivencia de la plántula trasplantada en suelo se tomó a las 10 semanas. El medio MS/H (6 plantas vivas) fue el que registró el mayor porcentaje de supervivencia con un 42 %, seguido por los medios A.A/C (4 plantas vivas) con un 11% y MS/C (4 plantas vivas) con un 25 % de supervivencia en las plántulas. El porcentaje de supervivencia más bajo registrado es el medio A.A/H (2 plantas vivas), con un 7 % (Figura 11).

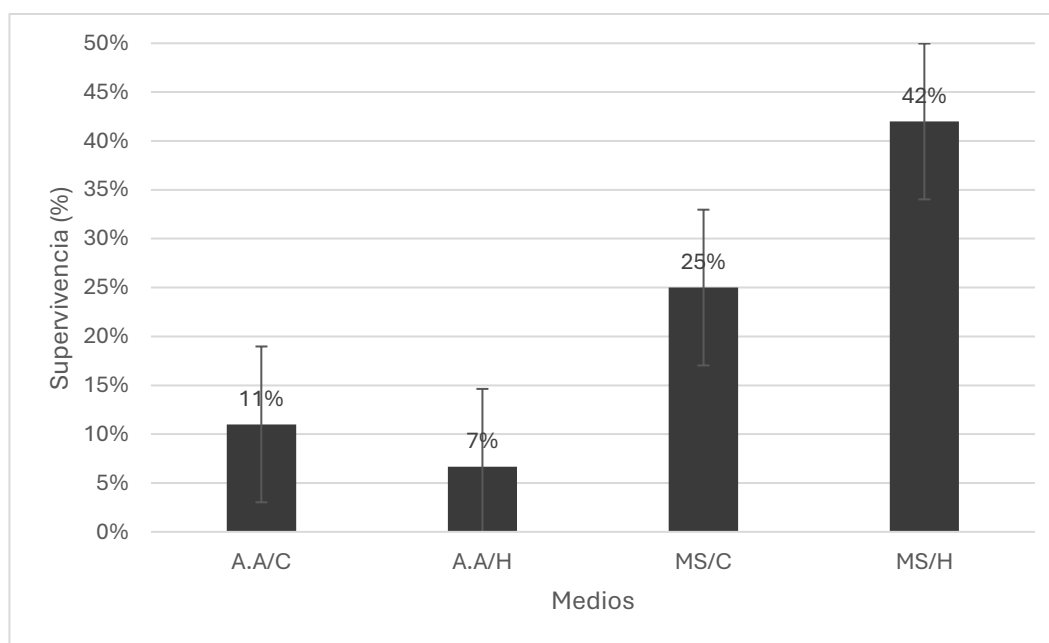


Figura 11. Porcentaje de supervivencia de plántulas de *Pseudosmodium barkleyi* aclimatizadas en sustrato en los diferentes medios, MS/H 42 %, A.A/C 11%, MS/C 25 %, A.A/H 7 %.

El análisis de varianza (ANOVA) para la variable de supervivencia mostró diferencias estadísticamente significativas entre los medios ($F= 13$; $p= 0.0015$), lo que indica que el medio aplicado tuvo un efecto relevante sobre el porcentaje de supervivencia de las plántulas. En contraste, el tratamiento de cultivo no presentó diferencias significativas ($F= 0$; $p= 1$), lo que sugiere que el tipo de tratamiento no influyó de manera considerable en esta variable.

7.2.4 Discusión del ensayo de germinación y aclimatación en *P. barkleyi*

Las semillas de *Pseudosmodium barkleyi* mostraron una respuesta germinativa temprana, iniciando la emergencia de la radícula a los cinco días de haber sido colocadas en el medio con el tratamiento pre-germinativo de humo. Este comportamiento coincide con lo observado en *Schinus johnstonii* (Anacardiaceae), en la cual las semillas sometidas al tratamiento con humo fueron las primeras en germinar dentro de los diez días, en comparación con otros tratamientos como la escarificación mecánica y el remojo a los que fueron sometidas las semillas de esta especie (Díaz-Arias et al., 2020). La rápida respuesta germinativa observada sugiere que los compuestos presentes en el humo actúan como inductores fisiológicos que estimulan los procesos metabólicos asociados a la germinación. Asimismo, el uso del medio Agar-agua, en combinación con el tratamiento de humo, demostró ser efectivo, alcanzando un 73 % de semillas germinadas. Este resultado respalda la evidencia de que el medio Agar-agua constituye un entorno favorable para la germinación en especies de la familia Anacardiaceae. En *Schinus fasciculata*, se observó un 40 % de germinación a los tres días y un 84 % a los siete días al emplear este mismo medio (Freire et al., 2014). De manera similar, en *Schinopsis balansae* se reportó un 69 % de germinación en medio Agar-agua a los siete días de la siembra (Alzugaray et al., 2013). Esto sugiere que el medio Agar-agua, por su composición simple y capacidad para mantener condiciones óptimas de hidratación y oxigenación, favorece la activación de los procesos fisiológicos de germinación.

Caso contrario lo observado en el medio Murashige & Skoog (MS) donde la germinación de *P. barkleyi* fue lenta. En este medio, el inicio de la germinación en el tratamiento control ocurrió hasta el séptimo día, alcanzando un 40 % de semillas germinadas (MS/C), mientras que el tratamiento con humo (MS/H) presentó un porcentaje ligeramente superior del 44 %. Estos valores contrastan notablemente con los obtenidos en el medio Agar-agua, donde se registraron porcentajes de germinación de hasta 73 %. Estos resultados difieren en *Pistacia terebinthus* (Anacardiaceae), especie en la que las semillas germinaron exitosamente en diferentes medios de cultivo WP (Lloyd & McCown, 1980), MS (Murashige & Skoog, 1962) y C2D (Cheé & Pool, 1987) alcanzando incluso un 100 % de germinación en el medio MS a los 40 días (García et al., 2010). Esta diferencia puede atribuirse a la variabilidad fisiológica entre especies, así como a las diferencias en las condiciones experimentales y en la composición del medio. El bajo porcentaje de germinación observado en el medio MS podría explicarse por su alta concentración de sales minerales, macro y micronutrientes, las cuales pueden generar un ambiente osmótico desfavorable para la imbibición y la activación metabólica inicial de las semillas. A estos nutrientes del medio MS se les atribuye la disminución del vigor y retardo de la germinación (Rodríguez et al., 2014). Por tanto, los resultados sugieren que la complejidad del medio MS no necesariamente favorece la germinación de *P. barkleyi*. Este resultado es congruente con lo observado en el análisis estadístico, donde se identificaron diferencias estadísticamente significativas tanto en el porcentaje de germinación como en el índice de velocidad de germinación (IVG), lo que indica que el tipo de medio ejerce una influencia determinante en el proceso germinativo.

En los medios que contenían la auxina ANA se observó la formación de callos, cabe aclarar que los callos generados en este trabajo no son de interés, dado que no era el objetivo de este trabajo, sin embargo, la aparición de estos nos indica que la concentración de la auxina ANA (0.0005 mg/L) es alta, ya que estos se forman por la alta concentración de nutrientes en el medio de cultivo y la combinación de un aporte elevado de macronutrientes y la presencia de auxinas, estimulan la división

celular desorganizada lo que conduce a la formación de tejidos callosos (George et al., 2008; Momoko et al., 2013). El uso de la auxina (ANA) no incrementó los porcentajes de germinación ni la velocidad de emergencia de las plántulas. De hecho, los tratamientos con ANA mostraron menores valores en ambas variables, lo cual sugiere que la presencia de auxina podría interferir con el equilibrio hormonal requerido durante la fase inicial de germinación (Taiz & Zwiger, 2002).

En las plántulas obtenidas de *Pseudosmodium barkleyi* se observó un desarrollo favorable en los medios Murashige y Skoog (MS) en comparación con los medios a base de Agar-agua, lo que sugiere que la composición nutricional del medio MS promueve un crecimiento vigoroso durante la etapa de aclimatación. Este comportamiento coincide con lo reportado en otras especies de la familia Anacardiaceae, como *Schinus fasciculata*, en la cual las plántulas obtenidas de la germinación fueron trasplantadas a medios MS en diferentes diluciones ($\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$) mostraron una regeneración eficiente de brotes, alcanzando un 94 % y 100 % de formación de brotes con hojas, respectivamente (Freire et al., 2014). De manera similar, en *Schinopsis balansae* donde las plántulas obtenidas fueron trasplantadas a medios MS evaluando el efecto de dos diluciones del medio MS (100 % y 50 %), sin encontrarse diferencias significativas en el número de hojas, longitud de vástago ni longitud de raíz primaria, aunque ambas concentraciones favorecieron el desarrollo normal de las plántulas (Alzugaray et al., 2013). En conjunto, estos resultados respaldan la tendencia observada en *P. barkleyi*, donde el medio MS proporcionó condiciones adecuadas para el crecimiento y la supervivencia, posiblemente debido a su equilibrio de macro y micronutrientes que favorecen la regeneración y diferenciación de tejidos durante la fase de desarrollo *in vitro*.

En cuanto a la variable de altura, el análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los medios de cultivo, destacando el medio Murashige y Skoog (MS) por presentar los mayores valores promedio. Este resultado puede atribuirse a que el medio MS, al poseer una formulación completa de sales minerales y una adecuada proporción de macro y micronutrientes, favorece un crecimiento más

vigoroso durante la etapa de desarrollo de las plántulas (George et al., 2008). En contraste, los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí y registraron una disminución progresiva en la altura, posiblemente asociada a la pérdida de turgencia del tallo durante las semanas de aclimatación. Esto sugiere que la composición nutricional limitada del medio Agar-agua reduce el potencial de crecimiento, al no proveer los elementos esenciales para mantener la expansión celular y el desarrollo de tejidos (Bhojwani & Razdan, 1996). Aunque la interacción entre medio y tratamiento no resultó significativa, mostró una tendencia cercana a la significancia, indicando una posible influencia combinada del medio nutritivo y el tratamiento pre-germinativo sobre el crecimiento. En conjunto, estos resultados evidencian que el medio MS suplementado con el tratamiento pre-germinativo de humo (MS/H) promovió un desarrollo más favorable en la altura de las plántulas, reflejando un efecto positivo en la aclimatación y el vigor general. De manera similar, los resultados obtenidos para el diámetro del tallo mostraron diferencias significativas entre los medios de cultivo, siendo nuevamente el medio MS/H el que presentó los mayores valores promedio. Este incremento en el grosor del tallo está relacionado con una mayor resistencia mecánica y una mejor capacidad de transporte vascular, lo cual contribuye a una aclimatación más exitosa (Hartmann et al., 2011). En contraste, los tratamientos A.A/C y A.A/H mostraron una disminución en el diámetro, probablemente debido a la pérdida de turgencia y al menor aporte de nutrientes en el medio Agar-agua.

En este contexto, es importante destacar que, aunque el medio Murashige & Skoog (MS) favorece un crecimiento más vigoroso durante las etapas de aclimatación, no necesariamente estimula la germinación inicial de las semillas. Esto se debe a que su alta concentración de sales y nutrientes puede generar un potencial osmótico elevado, limitando la imbibición y el intercambio gaseoso requeridos para la activación metabólica de la germinación (George et al., 2008). En cambio, medios más simples como el Agar-agua proporcionan un entorno menos iónico y más equilibrado, que facilita la absorción de agua y la respiración de la semilla durante las primeras fases del proceso germinativo. Por tanto, mientras que el medio MS

resulta más adecuado para el crecimiento y desarrollo posterior de las plántulas, el medio Agar-agua ofrece condiciones más apropiadas para la germinación y la emergencia inicial de *Pseudosmodium barkleyi*.

Respecto a la supervivencia, los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo, lo que indica que el tipo de medio tuvo un efecto determinante sobre el porcentaje de supervivencia de las plántulas. Se observó una tendencia hacia mayores porcentajes en los tratamientos que utilizaron el medio Murashige y Skoog (MS), siendo el tratamiento MS/H el que alcanzó la mayor supervivencia (20%). En contraste, el medio Agar-agua con tratamiento de humo (A.A/H) registró el porcentaje más bajo (7%), lo que evidencia que la supervivencia de las plántulas depende principalmente del medio de cultivo, más que del tratamiento pre-germinativo aplicado. Estos resultados destacan la relevancia del medio nutritivo en el mantenimiento de la viabilidad y en la capacidad de adaptación de las plántulas durante las etapas iniciales del desarrollo *in vitro*. La baja supervivencia general observada podría estar relacionada con la sensibilidad fisiológica de *Pseudosmodium barkleyi* durante las primeras fases de crecimiento y aclimatación. Este fenómeno puede deberse a que las condiciones de cultivo *in vitro*, aunque controladas, no siempre replican los factores ambientales específicos del hábitat natural de la especie. Además, la composición iónica del medio MS, si bien favorece el crecimiento, puede resultar excesiva para plántulas jóvenes, generando estrés osmótico o desbalances metabólicos que limiten su supervivencia. Por otro lado, los bajos porcentajes en el medio Agar-agua podrían atribuirse a la escasa disponibilidad de nutrientes, lo que impide el desarrollo sostenido de tejidos y la formación de estructuras funcionales. Así, la limitada supervivencia tanto *in vitro* como potencialmente en su hábitat sugiere que la especie presenta una sensibilidad fisiológica que podría contribuir a su estatus de riesgo, resaltando la necesidad de continuar con estudios de optimización de medios de cultivo y protocolos de aclimatación que mejoren su propagación y conservación *ex situ* (Sarasan et al., 2006).

7.2.5 Conclusión del ensayo de germinación y aclimatación de *P. barkleyi*

La información obtenida en este estudio con semillas de *Pseudosmodingium barkleyi* resulta de relevancia para el establecimiento de un protocolo de cultivo *in vitro* orientado a su conservación *in situ* y *ex situ*. Los resultados evidenciaron que la germinación puede lograrse en ambos medios evaluados, destacando el tratamiento con Agar-agua/humo, que alcanzó un 75 % de germinación, seguido por el tratamiento Agar-agua/control con un 73 %. Estos resultados confirman que los medios simples, como el Agar-agua, proporcionan condiciones más favorables para la imbibición y emergencia inicial de las plántulas, mientras que el medio Murashige y Skoog (MS), aunque menos eficiente para la germinación, favorece el crecimiento y desarrollo posterior gracias a su mayor disponibilidad de nutrientes. Asimismo, se demostró que las semillas mantienen su viabilidad incluso después de seis años de almacenamiento, conservando su capacidad de germinar y formar plántulas viables. Finalmente, la adición de ácido naftalenacético (ANA) a una concentración de 0.0005 mg L^{-1} promovió la formación de callos, por lo que su uso no se recomienda en etapas de germinación, dado que puede interferir con el desarrollo normal de las plántulas.

VIII Conclusión general

La propagación generativa mediante el uso de semillas constituye una estrategia esencial para la conservación de especies en categoría de riesgo, como *Guaiaecum unijugum* y *Pseudosmodingium barkleyi*. Este enfoque no solo permite la aplicación y desarrollo de técnicas adecuadas de propagación, sino que también contribuye al conocimiento de la biología germinativa y de los requerimientos específicos de cada especie. La comprensión de estos factores posibilita optimizar las condiciones del medio de cultivo y mejorar significativamente las tasas de germinación y establecimiento de plántulas, fortaleciendo las estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*. En este estudio, *G. unijugum* alcanzó hasta un 100 % de germinación en el medio Agar-agua sin necesitar un tratamiento pre-germinativo, evidenciando la eficacia de este medio para promover la imbibición y la emergencia inicial de las plántulas. De manera similar, en *P. barkleyi*, el medio Agar-agua favoreció las etapas

iniciales de germinación, mientras que el medio Murashige y Skoog (MS), aunque menos eficiente para la germinación, promovió un crecimiento y desarrollo más vigoroso de las plántulas gracias a su mayor disponibilidad de nutrientes. En conjunto, estos resultados confirman la importancia de seleccionar adecuadamente los medios de cultivo y los tratamientos pregerminativos según las características fisiológicas de cada especie, con el fin de establecer protocolos eficientes de propagación.

IX Referencias

- Abadia da Silva, L., de Fátima-Sales, J., Gomes-Neves, J. M., Oliveira dos Santos, H. , & Pereira-Silva, G. (2017). Radiographic image analysis of *Anacardium othonianum* Rizz (anacardiaceae) achenes subjected to desiccation . *Maringá*, v. 39, n. 2, 235-244.
- Alcantara-Cortes, J. S., Acero-Godoy , J., Alcántara-Cortés , J. D., & Sánchez Mora , R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17 (32):, 109-129.
- Cano-Salgado, A., Zavala-Hurtado, J. A., Orozco-Segovia, A., Valverde-Valdés, M. T., & Pérez-Rodríguez, P. (2012). Composición y abundancia del banco de semillas en una región semiárida del trópico mexicano: patrones de variación espacial y temporal. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83:, 437-446.
- Cerón-Carpio, A. B., Olivares-Espinoza, J., & Xicotencatl-Lozano, M. (2023). Conservación de esporas de helechos en bancos de germoplasma. *Revista CIBIOS-BUAP Año 2 No.6* , 7-14.
- Gómez, G., & Batista, C. (2006). Optimización de medos de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, vol. 27, no. 3, 17-24.
- Otero-Ospina, J. T., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*, vol. 58, núm. 4,, 270-276.
- Rzedowski, J., & Calderón de Rzedowski, G. (1999). *Familia Anacardiaceae*. Michoacan: Flora del Bajío y de regiones adyacentes Fascículo 78.

- Aguilar-Ortigoza, C., & Sosa, V. (2004). Taxonomic revision of the genus *Pseudosmodingium* (Anacardiaceae). *RHODORA*. Vol.106. No.928, 348-359.
- Alcántara-Cortes, J. S., Castilla-Pérez, M. G., & Sánchez-Mora, R. M. (2017). Importancia de los cultivos vegetales Invitro para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias* Vol. 1, 71-83.
- Álvarez-Cisneros, O., Pérez-Reyes, C. M., & Bonilla-Vichot, M. (2020). Evaluación de la viabilidad en semillas de *Pinus* tropicales Morelet con diferente tiempo de almacenamiento. *Avances*, vol. 22, núm. 1, 1-9.
- Alzugaray, C., Giampaoli, J., & Bueno, M. (2013). Germinación y cultivo in vitro de *Schinopsis balansae* Engl. *Quebracho - Revista de Ciencias Forestales*, vol. 21, núm. 1-2, 39-45.
- Amador-Alfárez, K. A., Díaz-González, J., Loza-Cornejo, S., & Bivián-Castro, E. Y. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica* Num 35, 109-131.
- Avendaño-López, A., Quintana-Camargo, M., Padilla-García, J., & Arriaga-Ruiz, M. (2015). Análisis de semilla de *Pinus devoniana* con rayos X. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 2(4),5, Recuperado de https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Ciencias_Naturales_y_Agropecuarias/.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2014). *Seed. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Second edition*. Kentucky, USA: Department of Biology University of Kentucky. AP.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2022). Seed (true seed plus endocarp) dormancy in Anacardiaceae in relation to infrafamilial taxonomy and endocarp anatomy. *Seed Science Research*, 32, 187–199. .
- Bhojwan, S. S., & Razdan, M. K. (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition*. Amsterdam, The Netherlands: ELSEVIER.

- Bohórquez-Quintero, M. A., Araque-Barrera, E. J., & Pacheco-Maldonado, J. C. (2016). Propagación in vitro de Espeletia paipana S. Díaz y Pedraza frailejón endémico en peligro de extinción. *Actual Biol* 38 (104), 23-36.
- Borjas-Ventura, R., Julca-Otiniano, A., & Alvarado-Huamán, L. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere. Vol. 8 No 2*, 150-164.
- Bueno, M., Alzugaray, C., Giubileo, G., Severin, C., & Carnevale, N. (2009). Evaluación de la calidad fisiológica de semillas de Maytenus vitis-idaea cultivadas in vitro. *Bosque* 30 (3), 146-150.
- Burgos, A. M., Cenóz, P. J., & Prause, J. (2009). Efecto de la aplicación de auxinas sobre el proceso de enraizamiento de estacas de dos cultivares de mandioca (Manihot esculenta Crantz). *Revista UDO Agrícola* 9 (3), 539-546.
- Caroca, R., Zapata, N., & Vargas, M. (2016). Efecto de la temperatura sobre la germinación de cuatro genotipos de maní (arachis hypogaea L.). *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia* 32(2), 94-101.
- Che-Lah, N. H., El-Enshasy, H. A., Mediani, A., Azlan-Azizan, K., Mohd-Aizat, W., Kit-Tan, J., Rosseleena-Rohani, E. (2023). An insight into the behaviour of recalcitrant seeds by understanding their molecular changes upon desiccation and low temperature. *Agronomy* Vol.13 No.8, 1-18.
- CONABIO. (21 de julio de 2022). *Categorías de riesgo en México*. Obtenido de Biodiversidad mexicana.: <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/catRiesMexico>
- Courtis, A. C. (2013). Germinación de semillas. Cátedra de fisiología vegetal. *Fisiología Vegetal*, 1-22.
- Cuello-Revetria, N., López-Mársico, L., & Rodríguez, C. (2019). Efectos del calor y el humo sobre el banco de semillas de un pastizal natural de Uruguay. *Grupo de Ecología de Pastizales. Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales. Montevideo - Uruguay.(Tesis)*, 1-49.
- de la Cuadra, C. (1992). Germinación, latencia y dormición de las semillas. Dormición en las avenas locas. *Hojas divulgadoras. No.3*, 2-23.

- Debnath, S. C. (2009). A two-step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 45(2):, 122-128.
- Dertien, J., & Melvin R. Duvall. (2014). Perspectives on the systematics and phylogenetics of Guaiacum (Zygophyllaceae): complexities in conservation of endangered hardwoods due to fragmentation, introgression, and intermittent gene flow. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85, 808-822.
- Díaz-Arias, D., Torres, Y. A., Ithurrt, L. S., & Cadillo, D. S. (2020). Posibilidades de reproducción de Schinus johnstonii (Anacardiaceae), una especie nativa del Monte argentino. *Lilloa* 57 (2):, 125-143.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, vol. 31, no. 1, 74-85.
- Everith, J. H. (1983). Seed germination characteristics of three woody plant species from south Texas. *Journal of Range*, 246-249.
- Freire, R., Carnevale, N. J., Alzugaray, C., & Bueno, M. S. (2014). Cultivo in vitro de Schinus fasciculata (Griseb) J.M. Johnst var. fasciculata (molle). *Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XVI No.2*, 169-173.
- Fuentes, A., & Samain, M.-S. (2018). *Guaiacum unijugum*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2018*: e.T88306301A88306305. Obtenido de <https://www.iucnredlist.org/es/species/88306301/88306305>
- García, E., Lorente, P., Marín, J. A., Arbeloa, A., & Andreu, P. (2010). Micropropagación e injerto in vitro de pistach. *Información Técnica Económica Agraria*, Vol. 106 N.º 4, 294-302.
- García-Aguila, L., de Feria, M., & Acosta, K. (2007). Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal Vol. 7, No. 2*, 67-79.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer.: Volume 1, The Background. .
- González-Paneque, O. S., Hernández-Espinosa, M., Silva-Pupo, J. J., & Espinosa -Reyes, Á. (2022). Evaluación de la dinámica del crecimiento in vitro n callos de Ipomoea batatas. *Rev. colomb. biotecnol vol.13 no.1*, Artículo corto.

- González-Rivas, B., Tigabu, M., Castro-Marín, G., & Odén, P. C. (2009). Seed germination and seedling establishment of Neotropical dry forest species in response to temperature and light conditions. . *Journal of Forestry Research* 20(2):, 99-104.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies Jr., F. T., & Geneve, R. L. (2011). *Plant Propagation: Principles and Practices, 8th Edition*. New Jersey: Prentice Hall.
- INAB, I. (2021). *Guía técnica de frutos y semillas forestales. Departamento de Semillas y Recursos Genéticos Forestales. Serie Técnica GT-046*. Guatemala: inab.
- IUCN. (2018). *Guaiaecum unijugum*. Obtenido de The IUCN Red List of Threatened Species : <https://www.iucnredlist.org/species/88306301/88306305>
- IUCN, R. L. (2025). *¿Qué es la Lista Roja de la UICN?* Obtenido de The IUCN Red List of Threatened Species.: <https://www.iucnredlist.org/es>
- Jiménez-Ramírez, J., Martínez-Gordillo, M., Valencia-Ávalos, S., Cruz-Dúran , R., Contreras-Jiménez, J., Moreno-Gutiérrez , E., & Calónico-Soto, J. (2003). Estudio florístico del Municipio Eduardo Neri, Guerrero. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica, vol. 74, núm. 1.*, 79-142.
- Koleff, P., & Urquiza Hass, T. (2011). *Planeación para la conservación de la biodiversidad terrestre en México: retos en un país megadiverso*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad–Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.
- Kumar , P., Choudhary, U., Soni, S., & Sahil , A. (2023). Conservation of orthodox and recalcitrant seeds. *Just Agriculture Vol.3 Issue.11*, 80-84.
- Llano, M., & Fernández, H. (. (2017). Análisis y propuestas para la conservación de la biodiversidad en México 1995-2017. 120.
- Mancipe-Murillo, C., Calderón-Hernández , M., & Pérez-Martínez , L. V. (2018). Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio. *Caldasia* 40(2):, 366-382.
- Martínez-Millán, M., & Cevallos-Ferriz, S. R. (2005). Arquitectura foliar de Anacardiaceae. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76 (2), 137-190.

- Martínez-Meyer, E., Sosa-Escalante, J. E., & Álvarez, F. (2014). El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección? *Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85*: 1-9.
- Martínez-Salas, E., & Saimain, M. (2020). *Pseudosmodingium barkleyi*. Obtenido de The IUCN Red List of Threatened Species: <https://www.iucnredlist.org/species/136750172/137376049>
- McCauley, R. A., Cortés-Palomec, A. C., & Oyama, K. (2010). Distribution, genetic structure, and conservation status of the rare microendemic species, *Guaiaacum unijugum* (Zygophyllaceae) in the Cape Region of Baja California, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad 81*, 745-758.
- Méndez-Delgado, S. (2023). Estado, uso e importancia de fotohormonas de síntesis y estimulantes de crecimiento en el cultivo de rosa (*Rosa* sp). *Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Ingeniería Agronómica*, 1- 61.
- Momoko, I., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell. Vol. 25, no. 9*: 2159-3173.
- Olvera-Hernández, J.I, Álvarez-Calderón, N.M, Guerrero-Rodríguez, J.D, & Aceves-Ruiz, E. (2017). Importancia de especies vegetales en el transpatio de familias campesinas del noroeste de Puebla, México. *Agroproductividad: Vol. 10*, 21-26.
- Orantes-García, C., Ríos-de León, N., & Verdugo-Valdez , A. G. (2023). Germinación in vitro de semillas de *Guaiaacum sanctum* L., especie de importancia comercial y medicinal. *IBCIENCIAS 6 (2)*: , 54-58 .
- Osuna-Fernández, H. R., Osuna-Fernández, A. M., & Andrés, F.-Á. (2016). *Manual de propagación de plantas superiores*. México, D.F: UAM, Casa abierta al tiempo .
- Pérez-Mendoza , C., Carrillo-Castañeda , G., Vidal-Lezama, E., & Ortiz-García , E. (2016). Efecto de la imbibición en la calidad fisiológica de semillas de jitomate. *Rev. Mex. Cienc. Agríc vol.7 no.7*, 1765-1773.
- Pérez, A. (1996). Evaluación de diferentes tratamientos pregerminativos aplicados al *Guaiaacum officinale* (guayacán). *Mesén, F., Rodríguez, Y., Sánchez, A.*

- (eds.), *Memorias Primer Seminario Nacional sobre Mejoramiento Genético y Semillas Forestales.*, 56-60.
- Pérez-Rozo, A. F. (2006). Fisiología de la semilla y germinación de *Montanoa quadrangularis* (Schultz bipontianus) Asteraceae "Arboloco". *Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias*, 1- 158.
- Pita-Villamil, J. M., & Perez-García, F. (1998). Germinación de semillas. *Hojas divulgadoras. No.2090*, 2-20.
- Plascencia, R. L., Castañón Barrientos , A., & Raz Guzmán, A. (2011). La biodiversidad en México su conservación y las colecciones biológicas. *Ciencias, núm. 101*, 36-43.
- Pospílová, J., Tichá, I., Kadleek, P., Haisel, D., & Plizáková, S. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *BIOLOGIA PLANTARUM* 42 (4): , 81-497.
- Preece, J., & Sutter, E. (1991). Acclimatization of micro-propagated plant to the greenhouse and field. *In Debergh, PC, Zimmerman, RH. eds. Micropropagation technology and application. Dordrech Kluwer Academic Press.*, 71-93.
- PROFEPA. (2010). *Especies en categoría de riesgo*. Obtenido de Procuraduría Federal de Protección al Ambiente: https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/6580/1/mx.wap/especies_en_categoria_de_riesgo.html
- PROFEPA. (22 de diciembre de 2022). *Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, NOM-059-SEMARNAT-2010*. Obtenido de Gobierno de México: <https://www.gob.mx/profepa/articulos/nom-059-semarnat-2010>
- Ranal, M. A., & Santana, D. G. (2006). How and why to measure the germination process? *Rev. Bras. Bot.* 29:, 1-11.
- Red de Herbarios Mexicanos*. (6 de febrero de 2025). Obtenido de Lista de Colecciones: <https://herbanwmex.net/portal/index.php>
- Reveles-Torres , L. A., & Velásquez-Valle , R. (2017). Patrimonio fitogenético: Banco de germoplasma de semillas ortodoxas del campo experimental Zacatecas.

- Folleto Técnico Núm 81. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP*, 44.
- Reyes-Tena, A., Rincón-Enríquez, G., Evangelista-Martínez, Z., Quiñones-Aguila, E., & López-Pérez, L. (2015). Lucha entre microbios una herramienta para el control de enfermedades de plantas. . *revista digital universitaria UNAM*. Vol 16, Núm 11: , 2-15.
- Roberts , A. V., Smith, E. F., & Mottley, J. (1990). The preparation of micropropagated plantlets for transfer to soil without acclimatization . *Methods in Molecular Biology*, Vol 6, 227-236.
- Roca, W. M., & Mroginsky, L. A. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia*, 969.
- Rodríguez , M., Chacón , M., & Carrillo , R. (2014). Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación in vitro de *Ugni molinae*. *Bosque* 35(1): , 119-122.
- Rodríguez-González, M. (2006). Propagación in vitro de *Echinocactus grusonii* HILD, (Cactaceae), especie en peligro de extinción. *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.*, 1-78.
- Rzedowski, J., & Calderón de Rzedowski, G. (1994). Zygophyllaceae. *Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 30*, 1-22.
- Sánchez , J. (18 de enero de 2021). *Partes de la semilla y sus funciones*. Obtenido de Ecología verde: <https://www.ecologiaverde.com/partes-de-la-semilla-y-sus-funciones-1973.html>
- Sánchez-Soto, B. H., Pacheco-Aispuro, E., Lugo-García , G. A., Reyes-Olivas , Á., & García-Moya , E. (2017). Métodos de escarificación en semillas de *Guaiacum coulteri*, especie amenazada del bosque tropical caducifolio del norte de Sinaloa, México. *Gayana Bot.* 74(2):, 262-268.
- Sánchez-Salinas, E., & Ortiz-Hernández, M. L. (2014). Escenarios ambientales y sociales de la minería a cielo abierto. *INVENTIO. Narraciones de la ciencia y tecnología*, 27-34.

- Sánchez-Soto, B. H., Pacheco-Aispuro, E., Lugo-García, G. A., Reyes-Olvias, Á., & García-Moya, E. (2017). Métodos de escarificación en semillas de *Guaiaacum coulteri*, especie amenazada del bosque tropical caducifolio del norte de Sinaloa, México. *Gayana Bot.* 74(2), 262-268.
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M., Atherton, C., McMivhen, M., Prendergast, G., & Rowntree, J. K. (2006). Conservation in vitro of threatened plants—progress in the past decade. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 42(3), 206–214.
- Sawma, J. T., & Mohler, C. L. (2002). Evaluating Seed Viability by an Unimbibed Seed Crush Test in Comparison with the Tetrazolium Test 1. *Weed Technol.* 16(4):, 78.
- SEMARNAT. (2002). Norma oficial Mexicana, NOM.059.ECOL-2001, Protección ambiental: Especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. *Lista de especies en riesgo. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Diario oficial de la federación, México, DF.*
- SEMARNAT. (2010). Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana 059. *Diario Oficial. Última reforma publicada el 14 de noviembre de 2019*, 1-78.
- Silveira, F. O., & Fernandes, G. W. (2006). Effect of light, temperature and scarification on the germination of *Mimosa foliolosa* (Leguminosae). *Seed Science and Technology* 34:, 585-592.
- Souza-Pereira, W. V., Rocha-Faria, J. M., Oliveira-Tonetti, O. A., & Amaral da Silva, E. A. (2012). Desiccation tolerance of *Tapirira obtusa* seeds collected from different environments. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 34, nº 3, 388-396.
- Starling, R. J., & Dodds, J. H. (1983). Tissue culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya* 1, 84-90.
- Suárez-Padrón, I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Montería Colombia: Fondo Editorial. Universidad de cordoba.

- Taiz, L., & Zwiger, E. (2002). *Fisiología vegetal Vol.II*. Los Angeles, California : Sinauer Associates.
- Tapia , A. M., A.A., & Luque , V. (2011). Efecto de diferentes métodos de escarificación en la germinación en semillas de *Schinus areira*. *Huayllu-Bios*. N° 5., 33-37.
- Taylor , R. A. (1966). Seed germination and seedling growth of *Guaiaacum sanctum* L. *Florida State Horticultural Society* 79:, 468-470.
- UICN. (2012). Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN. *Versión 3.1. Segunda edición. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: UICN*, 1-34.
- Varela , S. A., & Arana, V. (2010). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Silvicultura en Vivero, Cuadernillo N° 3*, 3-10.
- Wendelken, P. W., & Martin , R. F. (1987). Avian consumption of *Guaiaacum sanctum* fruit in the arid interior of Guatemala. *Biotropica* 19(2), 116-121.
- Zapater, M. A., Alemán, M. M., Lozano, E. C., Aquino, V. H., Flores , C. B., Gil, M. N., Araya, G. (2018). Aspectos reproductivos de *Schinus areira* (Anacardiaceae). *Bol.Soc.Argent. Bot.*53 (4):, 619-631.
- Zevallos-Pollito, P. A., & Flores-Bendezú, Y. (2003). Caracterización morfológica de plántulas de uña de gato *Uncaria Tomentosa* (Willdernow ex Roemer & Schultes) D.C. y *U. guianensis* (Aublet) Gmelin del Bosque Nacional Alexander von Humboldt. *Ecología Aplicada*, vol. 2, núm. 1,, 41-46.
- Zurita-Valencia, W., Gómez-Cruz, J., Atrián-Mendoza, E., Hernández-García, A., Granados-García, M., García-Magaña, J., Sánchez-Vargas, N. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación in vitro y micropropagación del cirimo (*tilia mexicana schlecht.*) (*tiliaceae*). *Polibotánica no.38* , 129-144.