

GERMINACIÓN *in vitro* DE SEMILLAS DE *Cedrela odorata* L. DE GENOTIPOS EXTINTOS

In vitro GERMINATION OF *Cedrela odorata* L. SEEDS FROM EXTINCT GENOTYPES

Sampayo-Maldonado, S.¹; Castillo-Martínez, C.R.^{2*}; Jiménez-Casas, M.¹; Sánchez-Monsalvo, V.³; Jasso-Mata, J.¹; López-Upton, J.¹

¹Posgrado en Ciencias Forestales, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Km 36.5 carretera México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. CENID-COMEF. Av. Progreso No. 5, Colonia Barrio de Santa Catarina, Delegación Coyoacán, Ciudad de México. ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental El Palmar, km 16 Carretera Tezonapa-El Palmar Grande. Tezonapa, Veracruz, México. C.P. 95096.

*Autor de correspondencia: castillo.carlos@inifap.gob.mx

RESUMEN

La especie más importante para la industria forestal de México, es *Cedrela odorata* L., sin embargo, los problemas con plagas, baja producción de semillas y baja viabilidad durante el almacenamiento ponen en riesgo a la especie. Es necesario evaluar técnicas para la germinación *in vitro* para obtener material aséptico para generar protocolos para la propagación masiva de materiales selectos de cruza controladas y ganancia genética. Se evaluó el efecto de la escarificación en semillas de nueve familias superiores de un huerto semillero sexual extinto y su germinación en diez medios de cultivo. Se prepararon cinco medios: Murashigue y Skoog (MS), Medio Woody Plant (WPM), Medio Gambor (B5), Medio Schenk y Hildebrand (SH) y Agua destilada (AD). De los cuales se preparó una réplica a lo que se les adicionó carbón activado para obtener diez medios. La escarificación de semillas fue el mejor tratamiento con 52.8% de germinación y menor contaminación. El medio MS más carbón activado registró la mayor germinación (59.5%). Se presentaron diferencias significativas entre familias para germinación y contaminación. En las interacciones entre factores, la escarificación de las semillas en el medio MS con carbón activado fue la mejor para germinación; representado en tres familias.

Palabras clave: propagación, carbón activado, multiplicación.

ABSTRACT

The most important species for the forestry industry in México is *Cedrela odorata* L., however, the problems with pests, low seed production and low viability during storage place the species at risk. It is necessary to evaluate techniques for *in vitro* germination to obtain aseptic material to generate protocols for the massive propagation of select materials of controlled crosses and genetic gain. The effect of scarification on seeds from nine superior families from an extinct seed garden and their germination in ten growth media was evaluated. Five media were prepared: Murashigue and Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM), Gambor Medium (B5), Schenk and Hildebrand Medium (SH) and distilled water (AD). With these, a copy was prepared to which activated carbon was added to obtain ten media. The scarification of seeds was the best treatment with 52.8 % of germination and less contamination. The MS medium plus activated carbon showed the highest germination (59.5 %). Significant differences were found between families for germination and contamination. In the interactions between factors, seed scarification in MS medium with activated carbon was the best for germination, represented in three families.

Keywords: propagation, activated carbon, multiplication.

Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 8, agosto. 2017. pp: 53-58.

Recibido: septiembre, 2016. **Aceptado:** junio, 2017.

INTRODUCCIÓN

Cedrela *odorata* L. es una de las especies más atractivas por su rentabilidad económica (Ramírez *et al.*, 2008), lo que la convierte en la de mayor importancia comercial para la industria forestal de México (Quinto *et al.*, 2009). Actualmente se encuentra incluida en la lista de especies en riesgo sujeta a protección especial en la NOM. 059 (SEMARNAT, 2010), razón por la cual su conservación, propagación y uso sustentable cobra especial importancia (Muellner *et al.*, 2009). Rodríguez y Díaz (2011) mencionan que los principales problemas que limitan el éxito de ésta especie son: baja producción de semillas, susceptibilidad al ataque de *Hypsipyla grandella* Zeller, dispersión corta de sus semillas y baja viabilidad durante el almacenamiento; ya que se propaga principalmente por semillas (Magnitskiy y Plaza, 2007). La cubierta seminal protege a la semilla de los factores ambientales adversos y puede inhibir la germinación al impedir la entrada de agua y oxígeno (Ribeiro y Costa, 2015). Para romper la latencia de tipo física, acelerar la germinación y lograr mayores porcentajes de germinación se utilizan técnicas de escarificación (Wada y Reed, 2011), para algunas especies, la germinación *in vitro* es la única forma de originar plántulas normales (Damon *et al.*, 2004). Según Bueno *et al.* (2009) la germinación *in vitro* permite obtener material vegetal para el establecimiento de protocolos de propagación masiva. Donde a partir de estos explantes se pueden generar plántulas sanas, libres de patógenos (Gutiérrez *et al.*, 2008). La importancia de realizar la germinación *in vitro* en *C. odorata* es la conservación de la variación genética, la propagación de genotipos seleccionados y la multiplicación de individuos superiores. Se utilizan los explantes estériles para probar niveles de auxinas para la realizar embriogénesis somática y organogénesis directa e indirecta, para generar los protocolos para la especie (Hartmann *et al.*, 2001). La respuesta de las semillas a las condiciones *in vitro* son muy diferentes a la respuesta a las condiciones naturales (Damon *et al.*, 2004), por lo que es necesaria la evaluación de diferentes medios de cultivo para encontrar los requerimientos óptimos de nutrientes necesarios, particularmente para ciertos genotipos que han mostrado superioridad, como es el caso de materiales selectos. Con base en lo anterior, se evaluó el efecto del medio de cultivo para la germinación *in vitro* de semillas de nueve familias de *C. odorata* a las que se les aplicó tratamientos de escarificación, para la generación de protocolos de propagación masiva y conservación de germoplasma selecto a

corto y mediano plazo. Con la técnica se están conservando genotipos de materiales ya extintos.

MÉTODOS Y MATERIALES

Se evaluaron semillas de nueve familias del Huerto Semillero de *Cedrela odorata* L. que se encontraba dentro del Campo Experimental El Palmar (18° 32' N, 96° 47' W; 180 m), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), que se localiza en el Municipio de Tezonapa, Veracruz, México (Sánchez *et al.*, 2003). El clima es cálido húmedo con lluvias en verano, con una precipitación media de 2,888 mm anuales, y temperatura media anual de 24.4 °C. Los suelos son de tipo Acrisol, profundos y de buen drenaje, poseen una textura de migajón arcillo-arenoso y pH de 4.8 (Sánchez y Velázquez, 1998). Las semillas se recolectaron en marzo del 2014 de genotipos que se obtuvieron a partir de un ensayo de procedencias-progenie. Este experimento formó parte de una estrategia de mejoramiento genético de *Cedrela odorata* L. del INIFAP. Los tratamientos de desinfección y siembra de las semillas se realizaron en las instalaciones del laboratorio de cultivo *in vitro* del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del INIFAP, en Tepatitlán de Morelos, Jalisco.

Se seleccionaron cinco medios de cultivo, de uso común para especies forestales; 1) agua destilada (AD) (Bueno *et al.*, 2009), 2) medio B5 (Gambor *et al.*, 1968), 3) medio Woody plant (WPM) (Smith y McCown, 1982), 4) medio Schenk y Hildebrand (SH) (1972) y 5) medio Murashigue y Skoog (MS) (1962). A los cinco medios se les adicionó 9 g L⁻¹ de agar y 30 g L⁻¹ de sacarosa. Se preparó una réplica de estos cinco medios de cultivo a los cuales se les adicionó carbón activado (CA), para obtener diez medios de cultivo. El pH de los medios se niveló a 5.7 y mediante un despachador se depositaron 10 ml de medio a los tubos de ensayo, los cuales después fueron esterilizados.

Tren de desinfección de semillas

Las semillas fueron puestas con jabón en agua corriente por 10 minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada. Después se dejaron 60 minutos en Captan® (3 g L⁻¹) y se enjuagaron tres veces con agua destilada. Se trataron con etanol al 70% durante un minuto, después se enjuagaron tres veces con agua destilada. Posteriormente se dejaron en inmersión durante 15 minutos en cloro al 30%, y ya en la campana de flujo laminar se les dio tres enjuagues con agua estéril. La siembra se realizó en condiciones asépticas en la campana de flujo

laminar. Para el tratamiento de escarificación, las semillas se disectaron en cajas petri con bisturí estériles. Se sembró una semilla en cada tubo de ensayo, después fueron sellados con parafilm y se etiquetaron. Posteriormente fueron colocados en la cámara de incubación a 24 ± 2 °C con fotoperiodo de 16 horas luz, usando lámparas de alógeno con intensidad lumínica de $28.05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 8 horas de oscuridad, y durante un mes se realizaron conteos y se determinó el porcentaje de semillas germinadas y porcentaje de contaminación. Para el análisis de datos, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de $2 \times 10 \times 9$ (dos tratamientos de escarificación, 10 medios de cultivo y nueve familias) con 10 repeticiones. Al analizar los datos estos no cumplieron con los supuestos de normalidad. Previo al análisis de varianza las variables en porcentaje (Y) fueron transformadas con la función arcoseno de la raíz cuadrada del valor original expresado en fracción decimal [$T = \arcseno(\sqrt{Y})$]. Posteriormente los valores promedio fueron retransformados a las unidades originales, con la función [$Y = 100 \text{seno}^2(T)$]. Se realizó una comparación múltiple de medias de Tuckey ($p \leq 0.05$); estos análisis se realizaron con el programa estadístico SAS para computadora personal (SAS, 2004). De acuerdo con el diseño experimental, para el análisis se utilizó el modelo lineal siguiente (1):

$$Y_{ijkl} = \mu + M_i + F_j + E_k + MF_{ij} + ME_{ik} + FE_{jk} + MFE_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde: Y_{ijkl} =variable respuesta del j -ésimo genotipo, con el k -ésimo tratamiento de escarificación, en el i -ésimo medio de cultivo; μ =media general; M_i =efecto aleatorio del i -ésimo medio de cultivo (diez medios); F_j =efecto aleatorio del j -ésimo genotipo (nueve familias); E_k =efecto aleatorio del k -ésimo tratamiento de escarificación (con escarificación y sin escarificación); MF_{ij} =efecto de la interacción entre el j -ésimo genotipo en el i -ésimo medio de cultivo; ME_{ik} =efecto de la interacción entre el k -ésimo tratamiento de escarificación en el i -ésimo medio de cultivo; FE_{jk} =efecto de la interacción entre el k -ésimo tratamiento de escarificación en el j -ésimo genotipo; MFE_{ijk} =efecto de la interacción entre el k -ésimo tratamiento de escarificación en

el j -ésimo genotipo en el i -ésimo medio de cultivo y ε_{ijkl} =error aleatorio correspondiente a la observación Y_{ijkl} . Con este modelo se obtuvieron los estimadores de varianza y del error para cada característica de interés.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto del tratamiento de escarificación en semillas, el medio de cultivo usado y el origen genético (familias) de las semillas resultaron significativos ($p \leq 0.05$) para la germinación y contaminación de semillas germinadas *in vitro*, pero sus interacciones no fueron significativas, solo en el caso del tratamiento de escarificación y el medio de cultivo (Cuadro 1).

El tratamiento de escarificación tuvo un efecto significativo en las semillas germinadas y en la contaminación ($p \leq 0.05$). La escarificación en semillas de *C. odorata* L. es el mejor tratamiento para lograr una germinación mayor a 52%, siendo superior en 9% al tratamiento testigo. Mientras que las semillas sin escarificación se contaminaron más y su porcentaje de germinación fue inferior a 45% (Cuadro 2).

Los resultados indicaron que escarificar las semillas de *C. odorata* es el mejor tratamiento para obtener la mejor germinación *in vitro*. Esto puede ser explicado por que según Wada y Reed (2011) la escarificación permite el paso de agua que inmediatamente hidratará el embrión, iniciando el proceso

Cuadro 1. Valor de P del análisis de varianza para las variables evaluadas en la germinación *in vitro* de semillas de *Cedrela odorata* L.

Fuente de variación	Germinación	Contaminación
Escarificación	0.0040**	0.0029**
Medio	0.0397**	0.1492
Familia	0.0001**	0.0001**
Escarificación*Medio	0.0001**	0.0001**
Escarificación*Familia	0.3620	0.6463
Familia*Medio	0.9997	0.9751
Escarificación*Medio*Familia	0.9999	0.9998

** Con diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Cuadro 2. Valores medio y error estándar del tratamiento de escarificación en los porcentajes de semillas *Cedrela odorata* L. germinadas y contaminadas.

Escarificación	Semillas (%)	
	Germinadas	Contaminadas
1	52.85 \pm 2.47 a	20.4 \pm 1.65 a
0	43.20 \pm 2.60 b	26.4 \pm 2.06 b
Promedio	48.02 \pm 2.51	23.40 \pm 1.92
CV (%)	5.5	6.2
Valor de F	8.54	9.12

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

1: Semillas con escarificación y 0: Semillas sin escarificación, CV: Coeficiente de variación.



de germinación. Lo cual coincide con Vilela y Ravetta (2001) que mencionan que todos los tratamientos de escarificación promovieron la germinación en *Prosopis* L. Mientras que Ribeiro y Costa (2015) encontraron que la escarificación aumentó el porcentaje de germinación en semillas de *Myrsine parvifolia* A. Chan et al. (2012) mencionan que la técnica de remojo en agua por 6 h de semillas de *Cedrela odorata* L. incrementa el porcentaje de germinación en un 15%.

El medio de cultivo usado en la germinación *in vitro* tuvo un efecto significativo en los porcentajes de germinación ($p \leq 0.05$). El medio MS más carbón activado usado para germinar semillas de *C. odorata* *in vitro* fue el mejor tratamiento para lograr la mayor germinación, siendo superior al tratamiento testigo. Mientras que los medios de cultivo usados en la germinación de las semillas no tuvieron efectos significativos en los porcentajes de contaminación. Sin embargo, el medio MS y carbón activado presentó el menor porcentaje de contaminación (Cuadro 3).

Los resultados indicaron que el medio MS más carbón activado fue el que presentó la mayor germinación de semillas y menor contaminación. Para Flores et al. (2011) esto puede deberse a que el medio MS presenta altos contenidos de nitrógeno y potasio que seguramente ayudaron a la germinación, ya que según Mitra (1987) durante la germinación la mejor fuente de nitrógeno es el nitrato de amonio. Además Flores et al. (2011) mencionan que el carbón activado fomenta mayor aireación, además de establecer un medio oscuro que propicia el desarrollo de las raíces y absorbe sustancias inhibitoras indeseables, tales como el etileno o pigmentos tóxicos. Las especies forestales tienen diferentes necesidades de nutrientes para su germinación y desarrollo, por lo que es necesario evaluar el medio de cultivo más adecuado para cada

una de ellas. Salazar et al. (2012) mencionan que el medio MS es el más utilizado con éxito en muchas especies. Sin embargo, Rodríguez et al. (2014) mencionan que por la presencia de sales en el medio MS, en varias especies provoca la disminución del vigor y baja germinación debido a efectos osmóticos y tóxicos. Un medio rico en sales disminuye el potencial hídrico, lo que provoca menor disponibilidad de agua para las semillas. Cadenas y Villegas (2012) señalan que el medio MS presenta el potencial osmótico de mayor negatividad, dificultando la estrada de agua a las semillas. Mientras que Righavendra et al. (2010) señalan que el estrés osmótico potencia la

síntesis de ácido abscísico (ABA), que es uno de los causantes de la latencia en semillas. El origen genético conocido de las semillas en la germinación *in vitro*, tuvo un efecto significativo en los porcentajes de germinación y contaminación ($p \leq 0.05$). Las familias 1, 6 y 39 de semillas de *C. odorata* usadas en la germinación *in vitro*, fueron las de mayor porcentaje promediando los demás factores; mientras que las semillas de la familia 59 presentaron los menores porcentajes de contaminación (Cuadro 4).

En el estudio se encontraron diferencias entre la respuesta de las familias de semillas de *C. odorata* a la germinación *in vitro*.

Según Uribe et al. (2008) puede ser explicado por la interacción del genotipo con la disponibilidad de nutrientes cuya proporción y cantidad varían de acuerdo a la fisiología del genotipo en particular. Coincide con lo encontrado por Marín et al. (2009) en las respuestas *in vitro* que variaron de un clon a otro en yuca (*Manihot esculenta* Crantz), donde registraron un efecto de genotipo en condiciones *in vitro*. Además Marini et al. (2010) mencionan que para la germinación *in vitro* de granos de polen de *Cucurbita máxima* Duchesne está determinada por la composición genética. Mientras que Navarro et al. (2008) en la germinación de semillas de

Cuadro 3. Valores medio y error estándar de los medios de cultivo en los porcentajes de semillas de *Cedrela odorata* L. germinadas y contaminadas.

Medio	Semillas (%)	
	Germinadas	Contaminadas
MS + CA	59.5 ± 2.11 a	17.3 ± 6.84 a
WPM + CA	54.4 ± 2.20 ab	25.1 ± 1.65 a
MS	51.6 ± 2.68 ab	19.6 ± 2.01 a
B5 + CA	51.6 ± 2.53 ab	25.1 ± 2.12 a
AD + CA	51.1 ± 2.70 ab	24.5 ± 1.92 a
AD	47.2 ± 2.30 b	22.8 ± 1.78 a
SH + CA	45.5 ± 2.66 bc	20.7 ± 1.76 a
SH	45.0 ± 2.04 bc	22.3 ± 1.44 a
WPM	41.6 ± 2.48 bc	31.2 ± 5.40 a
B5	32.7 ± 2.63 d	25.7 ± 1.85 a
Promedio	48.02 ± 2.52	23.43 ± 2.48
CV (%)	8.4	2.6
Valor de F	2.02	1.51

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

MS: Murashigue y Skoog, WPM: Medio Woody Plant, B5: Medio B5 o Gambor, AD: Agua destilada, SH: Medio Schenk y Hildebrand, CA: Carbón activado, CV: Coeficiente de variación.

Cuadro 4. Valores medio y error estándar del origen genético de las semillas de *Cedrela odorata* L en la germinación *in vitro*.

Familias	Semillas (%)	
	Germinadas	Contaminadas
1	66.5 ± 3.23 a	14.0 ± 3.24 ab
6	62.5 ± 2.87 a	13.5 ± 3.17 ab
39	61.2 ± 2.39 a	21.0 ± 2.35 ab
5	57.5 ± 2.21 ab	17.5 ± 2.78 ab
59	47.5 ± 2.61 abc	4.0 ± 2.16 a
99	46.5 ± 2.43 abc	21.0 ± 2.13 ab
45	38.0 ± 3.85 bc	33.5 ± 3.79 c
26	36.5 ± 2.97 c	36.5 ± 3.18 c
110	16.0 ± 3.24 d	49.0 ± 4.21 d
Promedio	48.02 ± 2.51	23.33 ± 2.37
CV (%)	9.7	8.4
Valor de F	11.96	21.64

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

CV: Coeficiente de variación.

genéticos y las facilidades prestadas para la realización de la presente investigación.

LITERATURA CITADA

- 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.
- Cárdenas-Lara M. A., Villegas-Monter A. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25(2): 213-217.
- Chan-Quijano J. G., Ochoa-Gaona S., Pérez-Hernández I. 2012. Germinación y sobrevivencia de especie arbóreas que crecen en suelos contaminados por hidrocarburos. *Teoría y Praxis* 12: 102-119.
- Damon A., Aguilar-Guerrero E., Rivera L., Nikolaeva V. 2004. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10(2): 195-203.
- Flores-Escobar G., Gil-Vásquez I., Colinas-León M. T., Mata-Rosas M. 2011. Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman Ex.Lindl. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(1): 5-8.
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50(1): 151-158.
- Gutiérrez-Nicolás F., Ravelo Á. G., Zárate R. 2008. Seed germination and *in vitro* propagation of *Maytenus canariensis* through regeneration of adventitious shoots from axillary and apical buds. *Biologia Plantarum* 52(1): 173-176.
- ISTA. 2005. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland. 243 p.
- Magnitskiy S. V., Plaza G. A. 2007. Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agronomía Colombiana* 25(1): 96-103.
- Mamo N., Mihretu M., Fekadu M., Tigabu M., Teketay D. 2006. Variation in seed and germination characteristics among *Juniperus procera* populations in Ethiopia. *Forest Ecology and Management* 225: 320-327.

Mammillaria no encontró diferencias entre tratamientos de escarificación pero si entre genotipos.

En la interacción de los factores (Cuadro 1) en la germinación *in vitro* se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para la interacción del tratamiento de escarificación y medio de cultivo. El tratamiento de escarificación y el medio de cultivo MS más carbón activado fueron la mejor combinación de tratamientos para la germinación *in vitro* de semillas de *C. odorata*. A la vez que ésta misma interacción presentó el menor porcentaje de contaminación. Puede ser explicado por que al realizar un corte a la testa, ya no se impide el paso de agua y comienza la absorción por el embrión, con lo que se resuelven los problemas del potencial osmótico negativo del medio MS, debido a la presencia de sales. Además, si al medio se le adiciona carbón activado el embrión de la semilla estará hidratado y con buena aireación, que al estar en contacto con nitrógeno y potasio del medio, es probable que se potencie la germinación.

CONCLUSIONES

La escarificación de las semillas de *C. odorata* puestas a germinar en el medio MS con carbón activado, fue el tratamiento más efectivo con los más altos porcentajes de germinación. La técnica de escarificación en la germinación *in vitro* con el medio MS con carbón activado es una opción viable para obtener material vegetal aséptico para generar protocolos para la propagación masiva de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Campo Experimental El Palmar, y al Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por los materiales

- Marín A., Albarrán J. G., Fuenmayor F., Perdomo D. 2009. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración *in vitro* de cinco cultivares élites de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). UDO Agrícola 9(3): 556-562.
- Marini G. V., Arenas R. O., Togno L. S. 2010. Efecto de los medios de cultivo sobre la germinación *in vitro* de granos de polen en poblaciones de *Cucurbita máxima*. Horticultura Argentina 29(70): 18-21.
- Mitra G. C. 1987. Some aspects of asymbiotic nutrition of orchid's embryos. Journal of the Orchid Society of India 1(1-2): 91-103.
- Muellner A. N., Pennington T. D., Chase M. W. 2009. Molecular phylogenetics of Neotropical Cedreleae (mahogany family, Meliaceae) based on nuclear and plastid DNA sequences reveal multiple origins of "*Cedrela odorata*". Molecular Phylogenetics and Evolution 52: 461-469.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497.
- Navarro-Carvajal M. C., Cervantes-Olvera G., Lázaro-Castellanos J. O. 2008. Efecto de la escarificación de semillas en la germinación de dos especies de *Mammillaria*. Zonas Áridas 12(1): 97-105.
- Quinto L., Martínez-Hernández P. A., Pimente-Bribiesca L., Rodríguez-Trejo D. A. 2009. Alternativas para mejorar la germinación de semillas de tres árboles tropicales. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 15(1): 23-28.
- Raghavendra A., Gonugunta V., Christmann A., Grill E. 2010. ABA perception and signalling. Trends in Plant Science 15(7): 395-401.
- Ramírez-García C., Vera-Castillo G., Carrillo-Anzures F., Magaña-Torres O. S. 2008. El cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) como alternativa de reconversión en terrenos abandonados por la agricultura comercial en el Sur de Tamaulipas. Agricultura Técnica en México 34(2): 243-256.
- Ribeiro J. N. S., Costa C. S. B. 2015. The effect of temperatura regulation on seed germination of the tropical tree *Myrsine parvifolia* A. DC near its southern limit. South African Journal of Botany 98: 128-133.
- 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*. Bosques 35(1): 119-122.
- Rodríguez-Rodríguez L., Díaz-Ramos A. 2011. Introducción a la embriogénesis somática en cedro (*Cedrela odorata* L.). Cuba Tabaco 12(1): 8-15.
- Ruiz-García R., Vargas-Hernández J. J., Cetina-Alcalá V. M., Villegas-Monter A. 2005. Efecto del ácido indolbutírico (AIB) y tipo de estaca en el enraizado de *Gmelina arborea* Roxb. Revista Fitotecnia Mexicana 28(4): 319-326.
- Sánchez-Monsalvo V., Salazar-García J. G., Vargas-Hernández J. J., López-Upton J., Jasso-Mata J. 2003. Genetic parameters and response to selection for growth traits in *Cedrela odorata* L. Revista Fitotecnia Mexicana 26(1): 19-27.
- Sánchez-Monsalvo V., Velázquez-Estrada C. 1998. Evaluación de dos insecticidas biológicos en el control de *Hypsiphylia grandella* (Zeller). Barrenador de brotes de las Meliaceae. Ciencia Forestal en México 23(83): 33-39.
- Salazar-Mercado S. A., Orlando-Cancino G. 2012. Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología 14(1): 53-59.
- SAS Institute. (2004) SAS/STAT 9.1 Guide for Personal Computers. SAS Institute Inc. Cary, N.C. 378 p.
- Schenk R. U., Hildebrandt A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany 50(1): 199-204.
- SEMARNAT. 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario oficial. p. 67.
- Smith M. A. L., McCown B. H. 1982. A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species. Plant Science Letters 28: 149-156.
- Uribe M. E., Delaveau C., Garcés M., Escobar R. 2008. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. Bosque 29(1): 58-64.
- Vilela A. E., Ravetta D. A. 2001. The effect of seed scarification and soil-media on germination, growth, storage, and survival of seedlings of five species of *Prosopis* L. (Mimosaceae). Journal of Arid Environments 48: 171-184.
- Wada S., Reed B. M. 2011. Optimized scarification protocols improve germination of diverse *Rubus* germplasm. Scientia Horticulturae 130: 660-664.

