

# VARIACIÓN EN GERMINACIÓN Y VIGOR DE SEMILLAS DE *Pinus cembroides* Y *Pinus orizabensis*

## VARIATION IN GERMINATION AND VIGOR OF *Pinus cembroides* AND *Pinus orizabensis* SEEDS

Leticia A. Hernández-Anguiano<sup>1</sup>, Javier López-Upton<sup>1\*</sup>, Carlos Ramírez-Herrera<sup>1</sup>, Angélica Romero-Manzanares<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Forestal. <sup>2</sup>Botánica. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (uptonj@colpos.mx).

### RESUMEN

*Pinus cembroides* y *P. orizabensis* producen semillas comestibles, vendidas con diferente precio en función al color de su testa. La calidad germinativa de las semillas se evaluó considerando su color y tres procedencias por cada especie: Colón y Cadereyta de Querétaro, y Santiago de Anaya, Hidalgo para *P. cembroides*, Tepeyahualco, Puebla, y El Carmen y Altzayanca, Tlaxcala para *P. orizabensis*. La combinación de los factores de colores, procedencia y especie, permitió formar 18 lotes. El grosor de testa y la germinación se determinaron con cuatro repeticiones de 25 semillas y con 15 para prueba de imbibición por cada lote. Los análisis de varianza se realizaron para probar diferencias entre especies, procedencias y color de testa. Grosor de testa, capacidad germinativa, valor pico y velocidad de imbibición y germinación fueron diferentes entre especies. En *P. cembroides* la testa fue 0.1 mm más gruesa y la capacidad germinativa 4 % superior que en *P. orizabensis*. El valor pico fue mayor y la germinación más rápida en *P. cembroides* (12.7 vs. 13.4 d para alcanzar 50 % de germinación). La procedencia fue significativa para la capacidad germinativa, días a la germinación del 50 %, valor pico, y el tiempo para alcanzarlo. Las semillas de *P. cembroides* de Cadereyta presentaron germinación mayor (95 %), la de Colón germinó más rápido. El vigor y germinación (4.4 y 87.5 %) menores fueron las de Santiago de Anaya. Las semillas de *P. orizabensis* de El Carmen tuvieron la germinación mayor (87.1 %), y las de Tepeyahualco y Altzayanca mayor velocidad de germinación. Las semillas con testa parda de ambas especies tuvieron más grosor de testa y mayor capacidad de germinación; en *P. cembroides* las de testa negra es más delgada y germinaron más rápido que las de testa parda, y la semilla de color pardo de *P. orizabensis* tuvieron más vigor.

### ABSTRACT

*Pinus cembroides* and *P. orizabensis* produce edible seeds, which are sold at different prices depending on the color of their seed coat or testa. Germinative quality of the seeds was evaluated considering their color and three provenances per species: Colón and Cadereyta, Querétaro, and Santiago de Anaya, Hidalgo, for *P. cembroides*; Tepeyahualco, Puebla, and El Carmen and Altzayanca, Tlaxcala, for *P. orizabensis*. The combination of the factors color, provenance and species allowed us to form 18 lots. Testa thickness and germination were determined with four replications of 25 seeds and 15 replications for the imbibition test per lot. Analyses of variance were performed to test differences between species and among provenances and seed coat colors. Testa thickness, germinative capacity, peak value, and rates of imbibition and germination were different between species. The *P. cembroides* testa was 0.1 mm thicker and germination capacity was 4% higher than *P. orizabensis*. The peak value was higher and germination faster in *P. cembroides* (12.7 vs. 13.4 d to reach 50 % germination). Provenance was significant for germinative capacity, days to 50 % germination, peak value, and days to reach peak value. *P. cembroides* from Cadereyta had the highest germination (95 %); seed from Colón germinated faster. Lower vigor and germination (4.4 and 87.5 %) were found in seeds from Santiago de Anaya. The *P. orizabensis* seeds from El Carmen had higher germination (87.1 %) and those from Tepeyahualco and Altzayanca higher germination rate. Brown seeds of both species had thicker testa and higher germination capacity. Black *P. cembroides* seeds have thinner testa and germinated at a faster rate than those with brown seed coat. Brown *P. orizabensis* seeds were more vigorous.

**Key words:** germination, seed testa color, *Pinus cembroides*, *Pinus orizabensis*, peak value.

\* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2017. Aprobado: noviembre, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 52: 1161-1178. 2018.

**Palabras clave:** germinación, color de testa, *Pinus cembroides*, *Pinus orizabensis*, valor pico.

## INTRODUCCIÓN

*Pinus cembroides* Zuccarini y *P. orizabensis* (D.K. Bailey) D.K. Bailey & F.G. Hawksworth son pinos de la sección Parrya del subgénero *Strobilus* (Gernandt *et al.*, 2003). Los árboles son de porte mediano, ramificación a altura baja, con crecimiento lento, y su madera es principalmente utilizada como combustible (Wolf, 1985; Bailey y Hawksworth, 1992; Romero *et al.*, 1996). *P. cembroides* se distribuye en Arizona, Texas y Nuevo México en EUA y en 14 estados del centro y norte de México arriba de los 20° N, incluidos los estados de Querétaro e Hidalgo, como localidades australes (Farjon y Styles, 1997). *Pinus orizabensis*, endémico de México, se localiza en Puebla, Tlaxcala y el centro de Veracruz, por debajo de los 20° N (Perry, 1991; Farjon y Styles 1997). La importancia de estas especies es ecológica, económica y cultural; su potencial adaptativo es alto al crecer en lugares con poca precipitación. Ambas especies son útiles para reforestación en ecosistemas degradados de zonas áridas y semiáridas con altitudes de 800 a 2800 m (Mohedano-Caballero *et al.*, 1999), pero las aves y los roedores consumen las semillas (Romero *et al.*, 1996). La semilla (piñón) es recolectada para comercialización y autoconsumo, es una fuente de ingreso para los dueños de estos bosques y representa una fuente de abasto de piñones para la elaboración de platillos y dulces típicos (Fonseca, 2003; Hernández *et al.*, 2011).

La capacidad de germinación y vigor son las variables principales que definen la calidad de las semillas para producción de planta (Bonner *et al.*, 1994; Trujillo, 1996). La primera es el porcentaje de semillas que germinan en un periodo de tiempo y define la cantidad de semillas que se requieren para producir plántulas (Kolotelo *et al.*, 2001). La segunda es la velocidad de germinación, y se define con el número de días para alcanzar 50 % de la capacidad germinativa o al determinar el valor máximo (VP) de germinación acumulada dividido entre el número de días para alcanza el valor máximo (Kolotelo *et al.*, 2001); cuanto más rápida y uniforme sea la germinación, el vigor de la semilla y la uniformidad de la producción de la planta serán mayores (Bonner *et al.*, 1994; Trujillo, 1996).

## INTRODUCTION

*Pinus cembroides* Zuccarini and *P. orizabensis* (D.K. Bailey) D.K. Bailey & F.G. Hawksworth are pines of the Parrya section of the sub-genus *Strobilus* (Gernandt *et al.*, 2003). They are medium stature, low-branching and slow-growing trees. Its wood is used mainly as fuel (Wolf, 1985; Bailey and Hawksworth, 1992; Romero *et al.* 1996). *Pinus cembroides* is distributed in Arizona, Texas and New Mexico in the USA and in 14 states of central and northern Mexico above 20° N, including the states of Querétaro and Hidalgo, as southern locations (Farjon and Styles, 1997). *Pinus orizabensis*, endemic to Mexico, is found in Puebla, Tlaxcala and central Veracruz, below 20° N (Perry, 1991; Farjon and Styles 1997). The importance of these species is ecological, economic and cultural. Its adaptive potential is high, growing in places with little precipitation. Both species are useful for reforestation in degraded ecosystems in arid and semi-arid areas at altitudes from 800 to 2800 m (Mohedano-Caballero *et al.*, 1999), but birds and rodents eat the seeds (Romero *et al.*, 1996). The seed (pine nut) is collected for selling and for home consumption. It is a source of income for the owners of these forests who supply pine nuts for typical dishes and candies (Fonseca, 2003; Hernández *et al.*, 2011).

Germinative capacity and vigor are the main variables that define the quality of the seeds for plant production (Bonner *et al.*, 1994; Trujillo, 1996). Germinative capacity is the percentage of seeds that germinate in a period and defines the amount of seed required to produce seedlings (Kolotelo *et al.*, 2001). Vigor refers to germination rate and is defined by the number of days needed to reach 50% of the seed germinative capacity, or when determining the peak value (PV) of accumulated germination divided by the number of days to reach the peak value (Kolotelo *et al.*, 2001). The more rapid and even the germination, the higher the seed vigor and uniformity of plant production (Bonner *et al.*, 1994; Trujillo, 1996).

These two pine nut pines are allopatric and *P. orizabensis* is distributed in more southern conditions and at higher elevations than *P. cembroides*. They differ by the number of needles per fascicle, the amount of wax on the needles and the position of stomata (Bailey and Hawksworth, 1992). This presupposes

Estos dos pinos piñoneros son alopátricos. *Pinus orizabensis* se ubica en condiciones más australes y en mayor elevación que *P. cembroides*, y se diferencian por el número de acículas por fascículo, cantidad de cera en las acículas y posición de estomas (Bailey y Hawksworth, 1992). Ello supone diferencias en adaptación entre estas taxa, por lo que establecer reforestaciones con el piñonero equivocado alteraría la distribución natural de las especies y, además, es probable que se afecte el desarrollo y supervivencia de las plantas.

Los productores toman como criterio de calidad y precio de semilla el color de la testa (negro, bicolor y pardo o parraleño como se le conoce en Tlaxcala), porque la semilla con testa bicolor y pardo son más demandas por la industria alimenticia, tienen un precio mayor (Hernández *et al.*, 2011), y cada árbol produce un solo color de testa. Martínez *et al.* (1987) documentan diferencias significativas de la calidad de la semilla con base en el color de la testa en *P. johannis* M.-F. Robert: las semillas pardas tuvieron 36.5 % de viabilidad y 35 % de germinación, las de color claro y negro (oscuras) tuvieron 99 % de viabilidad y una capacidad de germinación de 84 y 79 %, respectivamente.

El agua es un factor determinante en el almacenamiento y germinación de las semillas y depende de la composición química de la semilla; así, el manejo en viveros forestales es importante documentar el comportamiento de la semilla en la imbibición para iniciar sus procesos metabólicos (Bonner *et al.*, 1994). El objetivo de este estudio fue determinar diferencias en características germinativas de las semillas de varias procedencias de *P. cembroides* y *P. orizabensis*, y evaluar diferencias en la germinación de semillas con diferente color de testa. La hipótesis fue que hay diferencias en la capacidad y energía germinativa de las semillas de ambos pinos y entre las procedencias probadas, y que las semillas germinan diferente según el color de la testa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas se recolectaron en poblaciones naturales de *P. cembroides* y *P. orizabensis* en 2014 y 2015 (Cuadro 1). Las de *P. cembroides* se eligieron por su cercanía geográfica con la otra especie y una de alta elevación, que es única en la especie, con fines de comparación. En cada procedencia se seleccionaron 15 árboles sanos con buena conformación de copa a una distancia mínima

differences in adaptation between these taxa, and so reforestation with the wrong pine nut tree would alter the natural distribution of the species and may affect the development and survival of the plants.

Producers use seed coat color (black, bi-color and brown, or “parraleño” as they call it in Tlaxcala) as the criterion for quality and price of the seeds because seeds with a bi-color or brown testa are more highly demanded by the food industry, their price is higher (Hernández *et al.*, 2011), and each tree produces testa of only one color. Martínez *et al.* (1987) document significant differences in seed quality based on the color of the testa of *P. johannis* M.-F. Robert seeds: 36.5 % of seeds with brown testa were viable and 35 % germinated, while 99 % of those that were light colored or black (dark) were viable with 84 and 79 % germinative capacity, respectively.

Water is a determining factor in seed storage and germination and depends on seed chemical composition. Thus, in managing forest nurseries it is important to document seed imbibition behavior when it initiates metabolic processes (Bonner *et al.*, 1994). The objective of this study was to determine differences in germinative characteristics of *P. cembroides* and *P. orizabensis* seeds from several provenances, and to evaluate differences in germination among seeds of different color testa. The hypothesis was that there are differences in germinative capacity and energy of seeds of both pines and of those from the provenances tested, and that seed germination is different depending on the color of the testa.

## MATERIALS AND METHODS

Seeds were collected in natural populations of *P. cembroides* and *P. orizabensis* in 2014 and 2015 (Table 1). In the case of *P. cembroides*, the trees were selected because they are geographically close to the other species and at high elevation and thus could be compared. In each provenance, 15 healthy trees with good crown conformation were chosen; the trees were at least 50 m apart. The number of cones collected varied from 10 to 15 per individual tree. The cones from each tree were packed in paper bags labeled with the name of the species, provenance and date. The strobili were transported to the laboratory of the graduate program in Forest Sciences of the Colegio de Postgraduados in Texcoco, state of Mexico, to be processed and the seed analyzed.

Because we observed that each tree produces seed with seed coat of only one color and that producers obtain higher prices

**Cuadro 1. Ubicación de las poblaciones de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* incluidas en el presente estudio.****Table 1. Location of the populations of *Pinus cembroides* and *P. orizabensis* included in this study.**

| Población<br>nombre, municipio, estado | Latitud N      | Longitud O      | Altitud<br>(m) |
|----------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|
| <i>Pinus cembroides</i>                |                |                 |                |
| El Carrizal, Colón, Querétaro          | 20° 52' 40.23" | 100° 05' 07.23" | 2159           |
| La Laja, Cadereyta, Querétaro          | 20° 48' 44.32" | 99° 38' 18.72"  | 2831           |
| La Florida, Santiago de Anaya, Hidalgo | 20° 28' 36.06" | 98° 59' 01.50"  | 2002           |
| <i>Pinus orizabensis</i>               |                |                 |                |
| Tepeyahualco, Tepeyahualco, Puebla     | 19° 30' 25.60" | 97° 30' 26.27"  | 2417           |
| Rancho Domínguez, El Carmen, Tlaxcala  | 19° 24' 01.28" | 97° 42' 44.39"  | 2671           |
| Las Cuevas, Altzayanca, Tlaxcala       | 19° 22' 44.30" | 97° 43' 02.10"  | 2479           |

Datos obtenidos en la población con un geoposicionador Garmin® Etrex 10 Datum WGS84 ♦ Data obtained with a geographic positioner Garmin® Etrex 10 Datum WGS84.

entre estos de 50 m; el número de conos recolectados varió de 10 a 15 por individuo, y se empaquetaron por árbol en bolsas de papel etiquetadas con el nombre de la especie, procedencia y fecha. Los estróbilos se trasladaron al laboratorio del Posgrado en Ciencias Forestales del Colegio de Postgraduados en Texcoco, estado de México, para el beneficio y análisis de la semilla.

En virtud de que se detectó que cada árbol produce semilla de solo un color de testa y que los productores obtienen un mayor precio con los colores no negros, se decidió probar este factor además de las especies y su origen geográfico. El número de semillas de algunas combinaciones especie-procedencias-color de testa fue escaso, por lo que en las pruebas se usaron muestras de menor tamaño al sugerido por las reglas del ISTA (International Seed Testing Association, 1999). Por la misma razón y porque no se encontraron árboles que produjeran ciertos colores de testa en algunas procedencias se conformaron 18 lotes de semilla de acuerdo con la cantidad disponible por especie, procedencia y color de la testa en dos fechas de recolecta (Cuadro 2). Cada lote es un grupo de semillas compuesto de varios árboles que tuvieran semilla de cierto color de testa en cada localidad de cierto año. Se probaron diferencias en capacidad germinativa (CG), viabilidad, valor pico (VP), días para alcanzar el valor pico (DVP), días para alcanzar el 50 % de la capacidad germinativa (GERM50), grosor de testa e imbibición. En ambas especies se identificaron tres colores en la testa (negro, pardo y bicolor), sólo que en *P. cembroides* no hubo suficientes semillas bicolors para hacer las pruebas, por lo que se consideraron los otros dos colores en esta especie.

Las pruebas fisiológicas se realizaron con semilla recolectada en dos años consecutivos, la semilla del 2014 se mantuvo almacenada a humedad menor al 8 %, en una cámara fría a -6 °C. No se detectaron efectos significativos por el año de cosecha en las

with seeds that are not black, we decided to test this factor as well as the species and their geographic origin. The number of seeds of some species-provenance-testa color combinations was small, and for this reason, in the tests a smaller sample size than suggested by the ISTA (International Seed Testing Association, 1999) was used. For the same reason and because we did not find trees that produced certain colors of testa in some provenances, we formed 18 lots of seed depending on the amount available per species, provenance and testa color on two collection dates (Table 2). Each lot is a group of seeds composed of several trees that had seed of a certain test color in each location of a certain year. Differences in germinative capacity (CG), viability, peak value (VP), days to peak value (DVP), days to reach 50 % of the germinative capacity (GERM50), testa thickness and imbibition were determined. In both species three colors were identified (black, brown and bi-color). Only for *P. cembroides* there were not sufficient bi-color seeds for the tests, and we considered only the other two colors for tests with this species.

The physiological tests were conducted with seed collected in two consecutive years. The 2014 seed was stored at humidity below 8 % in a cold chamber at -6 °C. No significant differences between the collection years were detected in germination tests, and thus, this factor was not considered in later analyses.

#### Seed moisture content

Moisture content was determined in two seed samples that had initial weight of 3 to 4 g. These samples were placed in aluminum boxes with covers and put into a drying oven Riossa® at 130 °C for 1 h (ISTA, 1999). The seed was weighed on an analytical balance Edam® PW124, with a precision of 0.1

**Cuadro 2. Lotes de semilla formados para análisis de germinación, viabilidad, vigor, imbibición y grosor de testa de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis*, establecidos para probar diferencias entre especies, procedencias y color de testa de la semilla.**

**Table 2. Lots formed for analysis of germination, viability, vigor, imbibition and testa thickness of *Pinus cembroides* and *P. orizabensis* seed, established to determine differences between species and among provenances and seed coat colors.**

| Lote | Especie               | Procedencia       | Color de testa | Cosecha |
|------|-----------------------|-------------------|----------------|---------|
| 1    | <i>P. cembroides</i>  | Colón             | Negro          | 2015    |
| 2    | <i>P. cembroides</i>  | Cadereyta         | Negro          | 2015    |
| 3    | <i>P. cembroides</i>  | Cadereyta         | Pardo          | 2015    |
| 4    | <i>P. cembroides</i>  | Santiago de Anaya | Negro          | 2015    |
| 5    | <i>P. cembroides</i>  | Santiago de Anaya | Pardo          | 2015    |
| 6    | <i>P. orizabensis</i> | Tepeyahualco      | Negro          | 2015    |
| 7    | <i>P. orizabensis</i> | Tepeyahualco      | Bicolor        | 2015    |
| 8    | <i>P. orizabensis</i> | Altzayanca        | Negro          | 2015    |
| 9    | <i>P. orizabensis</i> | Altzayanca        | Bicolor        | 2015    |
| 10   | <i>P. orizabensis</i> | Altzayanca        | Negro          | 2014    |
| 11   | <i>P. orizabensis</i> | Altzayanca        | Pardo          | 2014    |
| 12   | <i>P. orizabensis</i> | Altzayanca        | Bicolor        | 2014    |
| 13   | <i>P. orizabensis</i> | Tepeyahualco      | Negro          | 2014    |
| 14   | <i>P. orizabensis</i> | Tepeyahualco      | Pardo          | 2014    |
| 15   | <i>P. orizabensis</i> | Tepeyahualco      | Bicolor        | 2014    |
| 16   | <i>P. orizabensis</i> | El Carmen         | Negro          | 2014    |
| 17   | <i>P. orizabensis</i> | El Carmen         | Pardo          | 2014    |
| 18   | <i>P. orizabensis</i> | El Carmen         | Bicolor        | 2014    |

pruebas de germinación, por lo que éste factor no se consideró en los análisis posteriores.

#### Contenido de humedad de la semilla

El contenido de humedad se determinó en dos muestras de semilla con un peso inicial entre 3 y 4 g, las cuales se colocaron en cajas de aluminio con tapa y se introdujeron en una estufa de secado Riossa® a 130 °C por 1 h (ISTA, 1999). La semilla se pesó en una balanza analítica marca Edam® PW124, con aproximación a 0.1 mg. El contenido de humedad se calculó con la fórmula siguiente (Kolotelo *et al.*, 2001; Bonner *et al.*, 1994):

C.H. = (Peso fresco semilla - Peso seco semilla)\*100 / Peso fresco semilla.

#### Grosor de testa

El grosor de testa se midió en cuatro repeticiones de 25 semillas por lote. Las semillas se quebraron con una prensa troqueladora C-Clamp, marca Truper, modelo 17666 PTR-2. Cada semilla se colocó de forma vertical en la prensa con el micrópilo hacia abajo y se ejerció presión moderada hasta fracturar de

mg. Moisture content (MC) was calculated with the following formula (Kolotelo *et al.*, 2001; Bonner *et al.*, 1994):

MC = (seed fresh weight – seed dry weight)\*100 / seed fresh weight.

#### Testa thickness

Testa thickness was measured in four replications of 25 seeds per lot. The seeds were broken with a die press C-Clamp (Truper, model 17666 PTR-2). Each seed was placed vertically in the press with the micropyle pointing downward and moderate pressure was exerted until the testa fractured longitudinally. The larger piece of the testa was measured. Measurement of thickness was done at the opposite ends of the testa at a distance of 5 mm above the micropyle near the middle of the testa with a digital vernier (Mitutoyo, model CD-6CS). The value reported was the average thickness for the lot.

#### Seed imbibition

The seed imbibition curve of the 18 lots was constructed by monitoring seed weight gain. Four replications of 15 seeds per



manera longitudinal la testa de la semilla. La medición se hizo en el trozo mayor de testa. La medición del grosor se realizó en dos extremos opuestos de la testa, a una distancia de 5 mm por encima del micrópilo cerca de la parte media de la testa con un vernier digital marca Mitutoyo, modelo CD-6CS, se obtuvo el grosor promedio.

### Imbibición de la semilla

La curva de imbibición de la semilla de los 18 lotes se realizó a través del monitoreo de la ganancia de peso de semillas. Cuatro repeticiones de 15 semillas por lote se colocaron en 100 mL agua destilada a temperatura ambiente en vasos de precipitados. El peso inicial se midió, se monitoreó cada 2 h por 24 h, y después cada 4 h por 20 h adicionales. El peso se cuantificó en una balanza analítica marca Edam® PW124. El agua de cada muestra se cambió cada 12 h; el porcentaje de absorción obtenido fue el peso acumulado de la semilla por unidad de tiempo con respecto al peso inicial de la semilla.

### Viabilidad de la semilla

Cuatro repeticiones de 25 semillas se utilizaron de cada lote. La testa se eliminó, y los embriones y megagametofito se remojaron por 12 h en agua destilada. En el megagametofito se realizó un corte longitudinal con un bisturí #4 para saturar el embrión en una solución al 1 % de 2, 3, 5 cloruro de tetrazolio (TZ), en cajas de Petri de vidrio. Las cajas con las muestras se colocaron por 24 h en la obscuridad en bolsas aluminizadas que evitan el paso de la luz a temperatura ambiente. Las semillas se clasificaron como viables cuando el megagametofito y embrión se tiñeron en tono rojo intenso (Kolotelo *et al.*, 2001).

### Germinación

Previo a la prueba de germinación, la semilla se desinfectó en una solución de hipoclorito de sodio (0.25 %), con cloro comercial Cloralex® con una inmersión de 5 min más un lavado abundante con agua corriente. La testa se escarificó con peróxido de hidrógeno al 3 % (v:v) por 2 min y la semilla se remojó en agua destilada por 12 h previo a la prueba de germinación. Las semillas se colocaron sobre tela de algodón dentro de cajas de plástico rígido transparente de 20 x 27 x 12 cm con tapa de cierre hermético; se instalaron separadores plásticos entre tratamientos y se agregaron 75 mL de agua destilada, y se asperjó una solución fungicida de Captán al 0.2 %. Las cajas con la semilla se colocaron en una cámara con temperatura diurna de 24 a 26 °C y nocturna de 22 a 24 °C.

Las semillas germinadas se registraron cada día por 35 d. Cuando el tamaño de la raíz fue similar a la longitud de la semilla

lot were placed in 100 mL distilled water at room temperature in precipitation beakers. Initial weight was recorded and monitored every 2 h for 24 h and later every 4 h for additional 20h. Weight was quantified on an Edam® PW124 analytical balance. The water used for each sample was changed every 12 h. The percentage of absorption obtained was accumulated seed weight per unit of time, relative to initial seed weight.

### Seed viability

Four replications of 25 seeds from each lot were used. The testa was eliminated, and the embryos and megagametophytes were soaked for 12 h in distilled water. The megagametophyte was cut longitudinally with a #4 scalpel to saturate the embryo in a 1 % solution of 2, 3, 5 tetrazolium chloride (TZ) in glass Petri dishes. The Petri dishes with the samples were placed for 24 h at room temperature in darkness in aluminized bags that did not allow passage of light. The seeds were classified as viable when the megagametophyte and embryo dyed intense red (Kolotelo *et al.*, 2001).

### Germination

Before the germination test, the seeds were disinfected in a solution (0.25 %) of commercial sodium hypochlorite (Cloralex®) by immersion for 5 min plus washing with abundant running water. The testa was scarified with 3 % hydrogen peroxide (v:v) for 2 min and the seed was soaked in distilled water for 12 h before the germination test. The seeds were placed on a cotton cloth in 20 x 27 x 12 cm transparent rigid plastic boxes with hermetic covers. Plastic separators were installed between treatments and 75 mL distilled water was added. They were then sprayed with a fungicide solution of 0.2 % Captán. The boxes with seeds were placed in a chamber with daytime temperature of 24 to 26 °C and night temperature of 22 to 24 °C.

The germinated seeds were recorded every day for 35 d. When the root was as long as the seed, the seed was considered germinated. The variables were germinative capacity (CG), peak value (VP), days to reach peak value (DVP) and time to reach 50 % total germination (GERM50), calculated with the following formulas:

$CG (\%) = (\text{germinated seeds} / \text{total seeds}) * 100$

$VP = \text{MAX } \Sigma \text{ germination} / \text{days}$  (Kolotelo *et al.*, 2001)

$DVP (\text{day}) = \text{test day on which accumulated germination divided by the number of days lapsed was the highest}$  (Kolotelo *et al.*, 2001).

$GERM50 (\text{days}) = \text{number of days to reach 50 \% of the germinative capacity.}$

se consideró germinada. Las variables calculadas fueron la capacidad de germinación (CG), valor pico (VP), día que se alcanzó el valor pico (DVP), y tiempo en lograr el 50 % de la germinación total (GERM50) con las fórmulas siguientes:

$$CG (\%) = (\text{semillas germinadas/semillas totales}) \times 100$$

$$VP = \text{MAX } \Sigma \text{ Germinación/días (Kolotelo et al., 2001).}$$

$$DVP (\text{día}) = \text{día de la prueba en que la germinación acumulada dividida entre los días transcurridos fue el máximo (Kolotelo et al., 2001).}$$

$$\text{GERM50 (días)} = \text{número de días en alcanzar el 50 \% de la capacidad germinativa.}$$

### Diseño experimental y análisis estadístico

En la prueba de germinación se usó un diseño completamente al azar con 20 repeticiones conformadas por diez semillas cada una de cada tratamiento (Cuadro 2). Previo a los análisis estadísticos los datos de capacidad germinativa y viabilidad se estandarizaron, por ser información expresada en porcentaje, y los datos de porcentaje se transformaron con la función arcoseno de la raíz cuadrada de  $p$  ( $\theta = \text{arcoseno } \sqrt{p}$ , donde  $\theta$  es el dato transformado y  $p$  es el valor de capacidad germinativa o viabilidad). Esta transformación se aplica a datos entre 0 y 1 para mejorar su distribución normal (Sokal y Rohlf, 1981). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el procedimiento Mixto (SAS Institute, 2003). No hubo diferencias en ninguna variable entre años y este factor no se consideró en los modelos estadísticos usados; así, algunas combinaciones color-especie, o procedencias-especie tuvieron más repeticiones.

Los modelos usados para el análisis para probar diferencias entre especies y procedencias fueron:

$$Y_{ijkl} = \mu + R_i + E_j + RE_{ij} + P_{k(j)} + RP_{ijk} + E_{ijkl}$$

donde  $Y_{ijkl}$  es el valor observado del  $l$ -ésimo lote de cierto color de testa de la  $k$ -ésima procedencia de la  $j$ -ésima especie en la  $i$ -ésima repetición,  $\mu$  es la media general,  $R_i$  es el efecto aleatorio de la  $i$ -ésima repetición,  $E_j$  es el efecto fijo de la  $j$ -ésima especie,  $RE_{ij}$  es el efecto aleatorio de la interacción de la  $i$ -ésima repetición con la  $j$ -ésima especie,  $P_{k(j)}$  es el efecto fijo de  $k$ -ésima procedencia dentro de la  $j$ -ésima especie,  $RP_{ijk}$  es el efecto aleatorio de la interacción del  $i$ -ésima repetición con la  $k$ -ésima procedencia dentro de la  $j$ -ésima especie, y  $E_{ijkl}$  es el error experimental.

Para probar diferencias entre colores de la testa, el análisis se realizó por especie con el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + C_j + RC_{ij} + E_{ijk}$$

### Experimental design and statistical analysis

In the germination test, we used a completely randomized design with 20 replications of 10 seeds per treatment (Table 2). Prior to the statistical analyses, the data on germinative capacity and viability were standardized because it is information expressed in percentage. The percentage data were transformed with the arcsine function of the square root of  $p$  ( $\theta = \text{arcoseno } \sqrt{p}$ , where  $\theta$  is the value of germinative capacity or viability). This transformation is applied to data between 0 and 1 to improve their normal distribution (Sokal and Rohlf, 1981). All the statistical analyses were performed with the MIXED procedure (SAS Institute, 2003). None of the variables were different between years, and this factor was not considered in the statistical models used. Thus, some combinations color-species or provenance-species had more repetitions.

The models used for the analysis to test differences between species and provenances were:

$$Y_{ijkl} = \mu + R_i + E_j + RE_{ij} + P_{k(j)} + RP_{ijk} + E_{ijkl}$$

where  $Y_{ijkl}$  is the observed value of the  $l$ th lot of a certain testa color of the  $k$ th provenance of the  $j$ th species in the  $i$ th replication,  $\mu$  is the general mean,  $R_i$  is the random effect of the  $i$ th replication,  $E_j$  is the fixed effect of the  $j$ th species,  $RE_{ij}$  is the random effect of the interaction of the  $i$ th replication with the  $j$ th species,  $P_{k(j)}$  is the fixed effect of the  $k$ th provenance within the  $j$ th species,  $RP_{ijk}$  is the random effect of the interaction of the  $i$ th replication with the  $k$ th provenance within the  $j$ th species, and  $E_{ijkl}$  is the experimental error.

To test differences among testa colors, the analysis was performed for each species with the model:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + C_j + RC_{ij} + E_{ijk}$$

where  $Y_{ijk}$  is the observed value of the  $k$ th lot of a certain provenance of the  $j$ th seed testa color in the  $i$ th replication,  $\mu$  is the general mean,  $C_j$  is the fixed effect of the  $j$ th seed testa color,  $RC_{ij}$  is the random effect of the interaction of the  $i$ th replication with the  $j$ th testa color, and  $E_{ijk}$  is the experimental error.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Moisture content and testa thickness

There were no significant differences between species or among provenances or testa colors. The moisture content of *P. cembroides* was 0.33 % higher

donde  $Y_{ijk}$  es el valor observado del k-ésimo lote de cierta procedencia del j-ésimo color de testa de la semilla en la i-ésima repetición,  $\mu$  es la media general,  $C_j$  es el efecto fijo del j-ésimo color de testa de la semilla,  $RC_{ij}$  es el efecto aleatorio de la interacción de la i-ésima repetición con el j-ésimo color de testa, y  $E_{ijk}$  es el error experimental.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Contenido de humedad y grosor de testa

Entre especies, procedencia y color de testa no se encontraron diferencias significativas. El contenido de humedad para *P. cembroides* fue 0.33 % mayor que en *P. orizabensis* (Cuadro 3). Los valores medios del contenido de humedad de semillas con diferente color de testa variaron de 7.24 a 9.64 %. Las semillas del género *Pinus* son ortodoxas ya que toleran contenidos bajos de humedad (5-8 %) y conservan su viabilidad por periodos prolongados de almacenamiento con temperatura controlada y embalaje adecuado (Bonner *et al.*, 1994).

Las diferencias en el grosor de testa de semilla fueron significativas ( $p \leq 0.01$ ) entre especies, procedencias y color de testa. El grosor de la testa fue mayor en semillas de *P. cembroides* y esto pudo influir en la menor absorción de agua, al dificultar la imbibición

than in *P. orizabensis* (Table 3). The mean values of seed moisture content with different testa colors varied from 7.24 % to 9.64 %. Seeds of the genus *Pinus* are orthodox, since they tolerate low moisture content (5-8 %) and remain viable over long periods of storage in controlled temperature with suitable packaging (Bonner *et al.*, 1994).

The differences in seed testa thickness between species and among provenances and testa colors were significant ( $p \leq 0.01$ ). The testa of *P. cembroides* seeds was thicker, and this may have influenced the lower absorption of water by making imbibition difficult (Table 3). Testa of black seeds of both species was thinner, and so they probably absorbed water more easily. Farjon and Styles (1997) report a greater range of testa thickness for *P. orizabensis*, 0.7 to 1.1 mm, than for *P. cembroides*, 0.6 to 1.0 mm.

### Seed imbibition

The seeds rapidly absorbed water. After only two hours, *P. cembroides* seed absorption percentage was 10 % and 12.7 % for *P. orizabensis* seeds. Later, the rate of absorption decreased but was higher in *P. orizabensis* seeds. Water absorption of *P. cembroides* seeds was 25 % at 24 h and at 16 h for *P. orizabensis*. At the end of the test (44 h), *P. cembroides* and *P.*

**Cuadro 3. Valores medios y error estándar (e.e.) de grosor de testa, contenido de humedad inicial con base en el peso fresco, contenido de humedad a 44 h de imbibición, y porcentaje de absorción en semillas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* en general y por colores de testa en cada especie.**

**Table 3. Mean values and standard error (e.e.) of testa thickness, initial moisture content based on fresh weight, moisture content at 44 h of imbibition and percentage of absorption of *Pinus cembroides* and *P. orizabensis* seeds in general and by testa color of each species.**

| Especie /<br>color de testa | Grosor testa (mm)<br>media $\pm$ e.e. | C.H. inicial (%) <sup>†</sup><br>media $\pm$ e.e. | C.H. 44 h (%)<br>media $\pm$ e.e. | Absorción (%) <sup>‡</sup><br>media $\pm$ e.e. |
|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>P. cembroides</i>        | 0.87 $\pm$ 0.007 a <sup>Φ</sup>       | 7.73 $\pm$ 0.21 a                                 | 24.64 $\pm$ 0.82 b                | 32.97 $\pm$ 1.69 b                             |
| <i>P. orizabensis</i>       | 0.78 $\pm$ 0.004 b                    | 7.40 $\pm$ 0.13 a                                 | 27.49 $\pm$ 0.50 a                | 38.27 $\pm$ 1.02 a                             |
| <i>Pinus cembroides</i>     |                                       |                                                   |                                   |                                                |
| Negro                       | 0.87 $\pm$ 0.009 b                    | 7.94 $\pm$ 0.30 a                                 | 24.43 $\pm$ 1.26 a                | 32.70 $\pm$ 2.32 a                             |
| Pardo                       | 0.91 $\pm$ 0.011 a                    | 7.52 $\pm$ 0.36 a                                 | 24.05 $\pm$ 1.39 a                | 31.73 $\pm$ 2.54 a                             |
| <i>Pinus orizabensis</i>    |                                       |                                                   |                                   |                                                |
| Bicolor                     | 0.77 $\pm$ 0.006 b                    | 7.24 $\pm$ 0.24 a                                 | 27.13 $\pm$ 0.80 b                | 37.38 $\pm$ 1.68 b                             |
| Negro                       | 0.75 $\pm$ 0.006 c                    | 7.38 $\pm$ 0.19 a                                 | 28.90 $\pm$ 0.80 a                | 41.33 $\pm$ 1.68 a                             |
| Pardo                       | 0.84 $\pm$ 0.008 a                    | 7.58 $\pm$ 0.19 a                                 | 26.13 $\pm$ 1.03 b                | 35.50 $\pm$ 2.17 b                             |

<sup>†</sup>Contenido de humedad. <sup>Φ</sup>Porcentaje de ganancia de peso de la semilla al final de la prueba con respecto a su peso inicial. <sup>Φ</sup>Letras diferentes en cada sección indican diferencias,  $p=0.05$ . <sup>‡</sup>Moisture content. <sup>‡</sup>Percentage weight gain of seed at the end of the test, relative to its initial weight. <sup>‡</sup>Different letters in each section indicate differences,  $p=0.05$ .



(Cuadro 3). El grosor de la testa de las semillas negras fue menor en ambas especies por lo que probablemente absorbieron agua con mayor facilidad. Farjon y Styles (1997) reportan un mayor intervalo de grosor de testa en *P. orizabensis*, de 0.7 a 1.1 mm, que en *P. cembroides* de 0.6 a 1.0 mm.

### Imbibición de la semilla

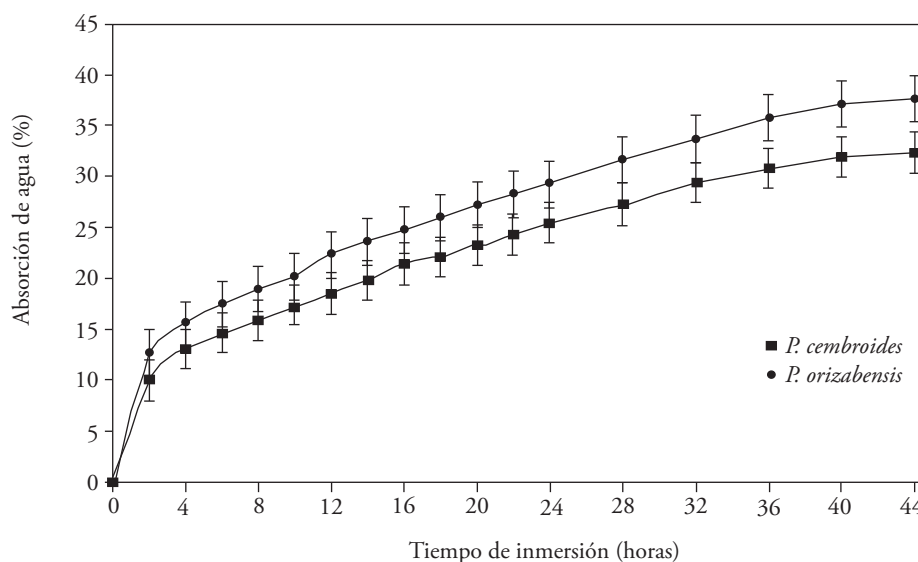
Las semillas absorbieron agua de forma rápida, *P. cembroides* alcanzó 10 % de su peso inicial y 12.7 % las de *P. orizabensis* en las primeras dos horas. Después, la tasa de absorción disminuyó, pero fue mayor en las de *P. orizabensis*. La absorción de agua fue 25 % a las 24 h en las semillas de *P. cembroides*, y a las 16 h en las de *P. orizabensis*. Al final de la prueba (44 h), las semillas de *P. cembroides* y *P. orizabensis* alcanzaron 32.4 % y 37.6 % de absorción, respectivamente (Figura 1). La absorción mayor con velocidad más alta de la semilla de *P. orizabensis* se puede deber a que el grosor de su testa fue 0.1 mm más delgada que la de *P. cembroides*.

El contenido de humedad inicial puede influir en el periodo de imbibición de la semilla (Mápula *et al.*, 2008); en nuestro estudio fue 7.8 % para *P. cembroides* y 7.4 % en *P. orizabensis* y, por lo tanto, la absorción fue mayor en *P. orizabensis* cuya semilla era menos húmeda. Un remojo en agua corriente por 24 a 48 h es adecuado para promover la imbibición

*orizabensis* had absorbed 32.4 % and 37.6 %, respectively (Figure 1). The highest absorption at the highest rate of the *P. orizabensis* seeds may be due to the thickness of its testa, which was 0.1 mm thinner than that of *P. cembroides*.

Initial moisture content may have an influence in the seed's imbibition period (Mápula *et al.*, 2008). In our study, it was 7.8 % for *P. cembroides* and 7.4 % for *P. orizabensis*; therefore, absorption was greater in *P. orizabensis* whose seed was less moist. Soaking in running water for 24 to 48 h is adequate to promote total imbibition of the seeds, and this period varies among conifer species. Seeds of some species can undergo damage if soaking is prolonged (Landis *et al.*, 2014). In Mexican nurseries, the seeds are submerged for 12 or up to 18 h before sowing. Our results indicate that the period of immersion should increase for these seeds, and care was taken so that overexposure to immersion did not have adverse effects on the seeds, such as appearance of pathogens and the lack of oxygenation (Landis *et al.*, 2014). Germination of *P. edulis* Engelman seeds improved when they were soaked in running water for 48 h (Ronco, 1990).

Black *P. cembroides* seeds absorbed water faster: 25 % in 22 h, contrasting with 28 h for brown seeds (Figure 2). Black *P. orizabensis* seeds reached 25 % in 14 h, while brown and bi-colored seeds took 16 and 20 h, respectively (Figure 3).



**Figura 1.** Imbibición acumulada de semillas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis*.  
**Figure 1.** Accumulated imbibition of *Pinus cembroides* and *P. orizabensis* seeds.

total de las semillas y este periodo varía entre especies de coníferas, pero las semillas de algunas especies pueden sufrir daños por un remojo prolongado (Landis *et al.*, 2014). En los viveros de México, la semilla se sumerge 12 o hasta 18 h antes de la siembra. Nuestros resultados indicaron que el periodo de imbibición debió incrementarse en estas semillas, y se cuidó que la sobreexposición a la inmersión no tuviera un efecto adverso en las semillas como la aparición de patógenos y la falta de oxigenación (Landis *et al.*, 2014). La germinación mejoró cuando las semillas se remojan en agua corriente por 48 h en las semillas de *P. edulis* Engelman (Ronco, 1990).

Las semillas negras de *P. cembroides* absorbieron agua con mayor rapidez: 25 % de absorción en 22 h, y 28 h para las semillas pardas (Figura 2). Las semillas negras de *P. orizabensis* llegaron a 25 % en 14 h, y para las pardas y bicolores 16 h y 20 h, respectivamente (Figura 3).

### Viabilidad de la semilla

Las diferencias para viabilidad de las semillas no fueron significativas ( $p>0.05$ ) entre especies, procedencias o color de la testa. La viabilidad fue alta en semillas de ambas especies: 93.5 % en *P. cembroides* y 90.8 % en *P. orizabensis* (Cuadro 4). Los valores máximo y mínimo de viabilidad entre procedencias

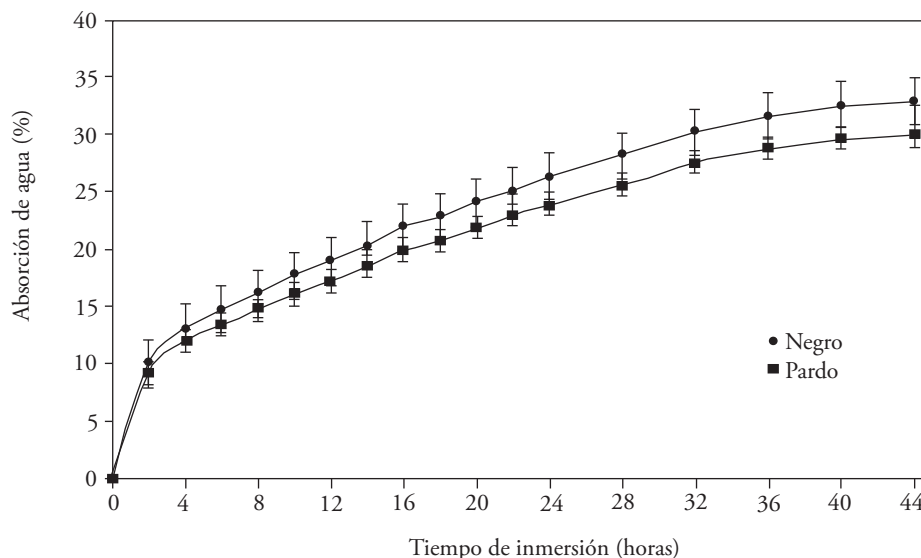
### Seed viability

Differences in seed viability were not significant ( $p>0.05$ ) between species or among provenances and testa colors. Viability was high in seeds of both species: 93.5 % in *P. cembroides* and 90.8 % in *P. orizabensis* (Table 4). The highest values of viability were recorded for *P. cembroides* collected in Cadereyta (98 %) and the lowest for seeds collected in Colón (89 %). Viability was high for recently collected seeds and for those stored in refrigeration for one year.

### Seed germination and vigor

The two species differed significantly in germinative capacity (CG), peak value (VP) and in days to reach 50 % germination (GERM50) but not in days needed to reach peak value (DVP). However, the differences were significant among provenances for the four variables (Table 5).

Germinative capacity of *P. cembroides* seeds was higher than that of *P. orizabensis* (Figure 4, Table 6), and germination of *P. cembroides* seeds was faster, as seen with the fewer number of days required to reach 50 % germination. The peak value shows that *P. cembroides* seeds are more vigorous, but the days to reach peak value indicate similar germination rate (Table 6).



**Figura 2.** Imbibición acumulada de semillas de *Pinus cembroides* con testa de color diferente.  
**Figure 2.** Accumulated imbibition of *Pinus cembroides* seeds with testa of different colors.

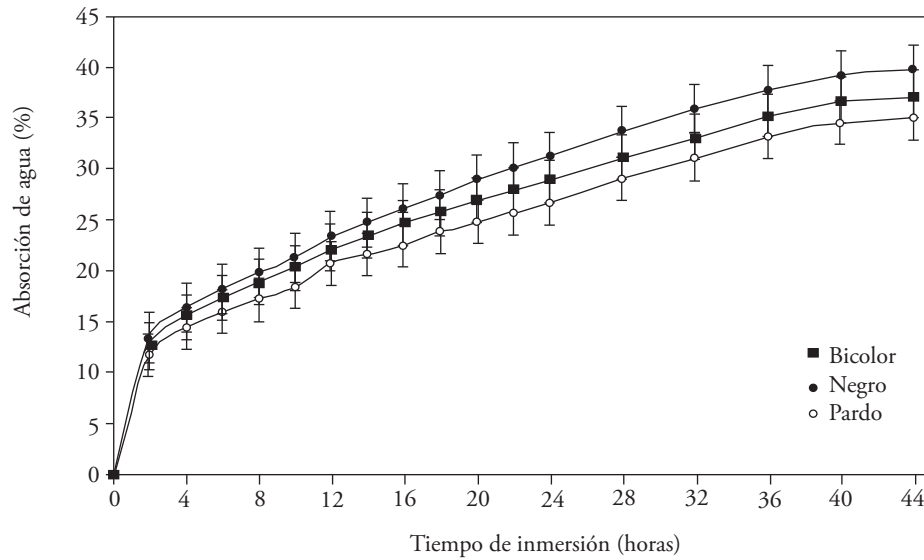


Figura 3. Imbibición acumulada de semillas de *Pinus orizabensis* con testa de color diferente.  
Figure 3. Accumulated imbibition of *Pinus orizabensis* seeds with testa of different colors.

Cuadro 4. Porcentaje de viabilidad de semilla de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis*, por especie, procedencia y por color de testa.  
Table 4. Percentage of viability of *Pinus cembroides* and *P. orizabensis* seeds, by species, provenance and testa color.

| Especie               | Procedencia       | Color de testa | Viabilidad (%) |
|-----------------------|-------------------|----------------|----------------|
| <i>P. cembroides</i>  | ---               | ---            | 93.50 ± 1.45   |
| <i>P. orizabensis</i> | ---               | ---            | 90.82 ± 1.88   |
| <i>P. cembroides</i>  | Cadereyta         | ---            | 98.00 ± 3.18   |
|                       | Colón             | ---            | 89.00 ± 3.08   |
|                       | Santiago de Anaya | ---            | 93.50 ± 2.18   |
| <i>P. orizabensis</i> | Altzayanca        | ---            | 90.80 ± 1.38   |
|                       | El Carmen         | ---            | 91.67 ± 1.78   |
|                       | Tepeyahualco      | ---            | 90.00 ± 1.38   |
| <i>P. cembroides</i>  |                   | Negro          | 94.00 ± 1.29   |
|                       |                   | Pardo          | 95.00 ± 1.58   |
|                       |                   | Bicolor        | 90.20 ± 1.55   |
| <i>P. orizabensis</i> |                   | Pardo          | 92.33 ± 1.99   |
|                       |                   | Negro          | 90.21 ± 1.55   |

se registraron en semillas de *P. cembroides* recolectadas en Cadereyta (98 %) y Colón (89 %). Los valores de viabilidad fueron altos para semilla recién recolectada y en aquellas almacenadas en refrigeración por un año.

Between 8 and 13 % more of the *P. cembroides* seed collected in Cadereyta germinated than that collected in Santiago de Anaya and Colón (Figure 5). However, germination rate was higher in seeds collected in Colón, 1.4 d and 3.4 d fewer to reach

## Germinación y vigor de la semilla

Entre especies hubo diferencias significativas para la capacidad germinativa (CG), valor pico (VP) y en los días para alcanzar el 50 % de germinación (GERM50), pero no para los días necesarios para alcanzar el valor pico (DVP). Sin embargo, las diferencias fueron significativas entre procedencias para las cuatro variables (Cuadro 5).

La capacidad germinativa de semillas de *P. cembroides* fue mayor que la de *P. orizabensis* (Figura 4, Cuadro 6), y la germinación de la semilla de *P.*

50 % germinación, compared with seed collected in the other two sites. The peak value shows that seeds from Colón and Cadereyta is more vigorous and seed from Santiago de Anaya is less vigorous.

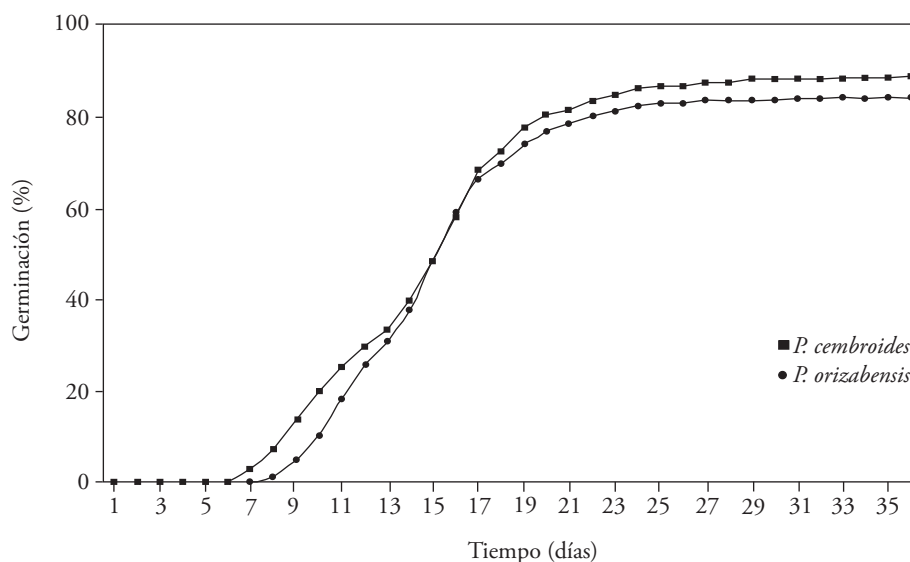
*P. orizabensis* seed germination was more homogeneous and the differences between the extreme values of CG was 5%. Germination of seed from El Carmen was higher (Figure 6) but slower to germinate and with less vigor, around 1 d of difference in reaching 50% of total germination. Altzayanca seed exhibited greater vigor, based on peak value, but Tepeyahualco seed reach peak value more rapidly.

**Cuadro 5. Análisis de varianza para capacidad germinativa (CG), días para 50 % de la C.G. (GERM50), valor pico (VP) y día en que se presenta el valor pico (DVP) entre especies y procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis*.**

**Table 5. Analysis of variance for germinative capacity (CG), days to 50 % CG (GERM50), peak value (VP) and day on which peak value appears (DVP) between species and provenances of *Pinus cembroides* and *P. orizabensis*.**

| Efecto       | CG      |        | GERM50  |        | VP      |        | DVP     |        |
|--------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
|              | Valor F | Pr>F   | Valor F | Pr>F   | Valor F | Pr>F   | Valor F | Pr>F   |
| Especie      | 4.39    | 0.0497 | 5.93    | 0.0249 | 6.73    | 0.0178 | 0.46    | 0.5068 |
| Procedencias | 7.96    | 0.0001 | 12.9    | 0.0001 | 6.06    | 0.0003 | 11.17   | 0.0001 |

Los grados de libertad del numerador 1 y 4, del denominador 19 y 76 para especie y procedencia, respectivamente ♦ Degrees of freedom of the numerator 1 and 4, of the denominator 19 and 76 for species and provenance, respectively.



**Figura 4. Germinación de semillas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis*.**

**Figure 4. Germination of *Pinus cembroides* and *P. orizabensis* seeds.**

**Cuadro 6. Valores medios y error estándar (e.e.) de la capacidad germinativa (CG), días para 50 % de la capacidad germinativa (GERM50), valor pico, y días para alcanzar el valor pico (DVP) de semillas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis*, y sus respectivas procedencias.**

**Table 6. Mean values and standard error (e.e.) of the germinative capacity (CG), days to 50 % germinative capacity (GERM50), peak value, and days to reach peak value (DVP) of *Pinus cembroides* and *P. orizabensis* seeds and their respective provenances.**

| Especie /<br>procedencia | CG (%)<br>media $\pm$ e.e.      | GERM50 (días) <sup>†</sup><br>media $\pm$ e.e. | Valor pico<br>(%/d)<br>media $\pm$ e.e. | DVP<br>(días) <sup>‡</sup><br>media $\pm$ e.e. |
|--------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>P. cembroides</i>     | 88.17 $\pm$ 1.38 a <sup>‡</sup> | 12.74 $\pm$ 0.28 b                             | 5.02 $\pm$ 0.12 a                       | 16.29 $\pm$ 0.36 a                             |
| <i>P. orizabensis</i>    | 84.22 $\pm$ 0.86 b              | 13.38 $\pm$ 0.21 a                             | 4.70 $\pm$ 0.08 b                       | 16.53 $\pm$ 0.26 a                             |
| <i>Pinus cembroides</i>  |                                 |                                                |                                         |                                                |
| Cadereyta                | 95.00 $\pm$ 2.03 a              | 12.55 $\pm$ 0.38 b                             | 5.34 $\pm$ 0.17 a                       | 16.08 $\pm$ 0.50 b                             |
| Colón                    | 82.00 $\pm$ 2.85 c              | 11.13 $\pm$ 0.51 c                             | 5.37 $\pm$ 0.23 a                       | 14.20 $\pm$ 0.67 c                             |
| Santiago de Anaya        | 87.50 $\pm$ 2.03 b              | 14.55 $\pm$ 0.38 a                             | 4.35 $\pm$ 0.17 b                       | 18.60 $\pm$ 0.50 a                             |
| <i>Pinus orizabensis</i> |                                 |                                                |                                         |                                                |
| Altzayanca               | 83.40 $\pm$ 1.31 b              | 13.11 $\pm$ 0.27 b                             | 4.74 $\pm$ 0.12 a                       | 16.35 $\pm$ 0.35 b                             |
| El Carmen                | 87.13 $\pm$ 1.46 a              | 14.08 $\pm$ 0.29 a                             | 4.63 $\pm$ 0.13 a                       | 17.38 $\pm$ 0.38 a                             |
| Tepeyahualco             | 82.13 $\pm$ 1.46 b              | 12.95 $\pm$ 0.29 b                             | 4.72 $\pm$ 0.13 a                       | 15.88 $\pm$ 0.38 b                             |

<sup>†</sup>Valores menores indican mayor velocidad. <sup>‡</sup>Letras diferentes indican diferencias (p=0.05) ♦ <sup>‡</sup>Lower values indicate higher rate. <sup>‡</sup>Different letters indicate differences (p=0.05).

*cembroides* fue más rápida según el menor número de días para lograr el 50 % de germinación. El valor pico muestra que las semillas de *P. cembroides* tienen mayor vigor, pero los días para alcanzar el valor pico indicaron una velocidad similar (Cuadro 6).

En *P. cembroides*, la semilla recolectada en Cadereyta germinó entre 8 y 13 % más que las de Santiago de Anaya y Colón (Figura 5). Sin embargo, la velocidad de germinación fue mayor en Colón, 1.4 d y 3.4 d de antelación para alcanzar el 50 % de germinación, en comparación con las otras dos localidades. El valor pico muestra mayor vigor en las semillas de Colón y Cadereyta, y la semilla de Santiago de Anaya es la de menor vigor.

En *P. orizabensis* la germinación en promedio fue más homogénea y la diferencia entre los valores extremos de CG fue 5 %. La de El Carmen tuvo la germinación mayor (Figura 6), pero fue más lenta en germinar y con menor vigor, alrededor de 1 d de diferencia para alcanzar el 50 % del total germinado. Altzayanca mostró más vigor de acuerdo con el valor pico, pero Tepeyahualco presentó mayor rapidez en alcanzar el valor pico.

La capacidad germinativa de *P. cembroides* fue mayor en nuestro estudio que el valor reportado para semilla de la misma especie recolectada en el Ejido la Amapola en San Luis Potosí, donde alcanzó 81 %

The germinative capacity of *P. cembroides* seed was higher in our study than the value reported for seed of the same species collected in the Ejido La Amapola in San Luis Potosí, where it was 81% (Sandoval *et al.*, 2000). The germinative capacity of *P. orizabensis* seed in our study was also superior to the same species (48 %) collected in Altzayanca, Tlaxcala (Sánchez *et al.*, 2005); these authors report that germination initiated 30 d after the experiment was set up in agrolite in a greenhouse, unlike our study where it began on the sixth day.

In both pines there were significant differences in germinative capacity among the different testa colors (Table 7). Brown *P. cembroides* seeds had 5.5% more germination than black seeds, and 8.4% more with brown *P. orizabensis* seeds. In this species, germination of bicolor and black testa seeds was similar (Table 8; Figure 7). However, only with *P. cembroides* seed were there differences in days to reach 50 % germination and in number of days to peak value (Table 7). More seeds with brown testa germinated, but *P. cembroides* seeds with black testa germinated more rapidly, with fewer days to 50 % germination and to peak value. This did not occur with *P. orizabensis* (Table 8; Figure 8).

Martínez *et al.* (1987) observed that *P. johannis* seeds with different testa color were not significantly



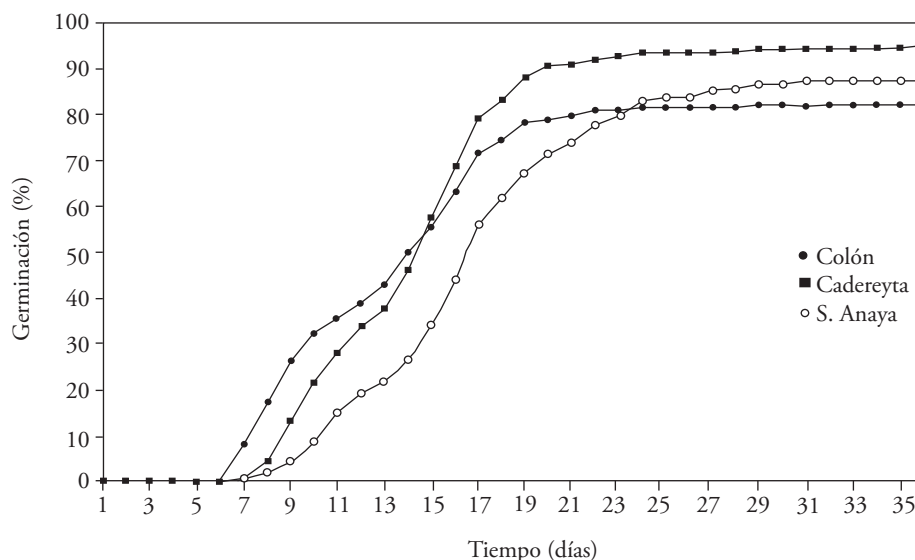


Figura 5. Germinación de semillas de diferentes procedencias de *Pinus cembroides*.

Figure 5. Germination of *Pinus cembroides* seed from different provenances.

(Sandoval *et al.*, 2000). También la capacidad germinativa de la semilla de *P. orizabensis* en nuestra prueba fue superior al de la misma especie (48 %) recolectada en Altzayanca Tlaxcala (Sánchez *et al.*, 2005); además, ellos señalan que la germinación inició 30 d después de instalado el experimento en invernadero en agrolita, a diferencia de nuestro estudio en el cual se inició desde el sexto día.

different in viability, but germination of mottled seed was 36.5 %. This value is a third of that obtained with brown or mottled *P. cembroides* and *P. orizabensis* seeds (more than 90 % in both species). The same authors indicate that the seed with light-colored or black testa had a germination of 84 and 79 %. For the study of *P. cembroides* and *P. orizabensis* seed, that with black test had the lowest germinative

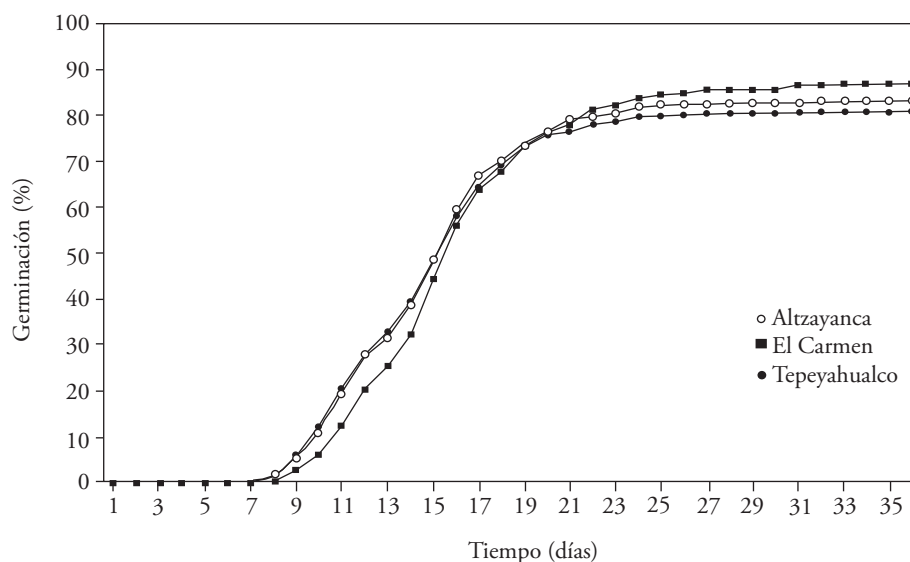


Figura 6. Germinación de semillas de diferentes procedencias de *Pinus orizabensis*.

Figure 6. Germination of *Pinus orizabensis* seed from different provenances.

En ambos pinos hubo diferencias significativas en la capacidad de germinación entre los colores de testa (Cuadro 7). Las semillas de color pardo tuvieron 5.5 % más germinación que las negras en *P. cembroides* y 8.4 % más en *P. orizabensis*, en esta especie la germinación es similar para las de testa bicolor y las negras (Cuadro 8; Figura 7). Sin embargo, sólo en *P. cembroides* hubo diferencias en los días para alcanzar 50 % de germinación y en el número de días para el valor pico (Cuadro 7). Las semillas con testa de color pardo tienen mayor germinación, pero las de color negro germinan más rápido en *P. cembroides*, con menos días para el 50 % de germinación y alcanzar el valor pico, lo cual no ocurrió en *P. orizabensis* (Cuadro 8; Figura 8).

capacity, 87 and 81 %, respectively. No differences in germination among the different testa colors were reported with *P. sylvestris* L., and each tree produces testa of different colors (Kaliniewicz *et al.*, 2013).

*P. cembroides* seed testa is thicker and has a lower rate of water absorption, and contrary to what was expected, more seeds germinated and at a faster rate than *P. orizabensis* seeds. A prediction could be that the seeds that absorb water at a faster rate, such as those of *P. orizabensis*, germinate at a faster rate, but it is possible that some physiological mechanism is involved in rapid germination of *P. cembroides*, and this physiological response could be an adaptive opportunist trait, confirming the existence of morphological and adaptive differences that deserve

**Cuadro 7. Análisis de varianza de la capacidad germinativa, días para 50 % de la capacidad germinativa (GERM50), valor pico, y días al valor pico de semillas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* con diferente color de testa.**

**Table 7. Analysis of variance of germinative capacity, days to 50 % germinative capacity (GERM50), peak value, and days to peak value of *Pinus cembroides* and *P. orizabensis* seeds with different testa colors.**

| Variable              | Color de testa en <i>P. cembroides</i> |            |            |        | Color de testa en <i>P. orizabensis</i> |            |            |        |
|-----------------------|----------------------------------------|------------|------------|--------|-----------------------------------------|------------|------------|--------|
|                       | G.L.† núm.                             | G. L. den. | Valor de F | Pr > F | G.L. núm.                               | G. L. den. | Valor de F | Pr > F |
| Capacidad germinativa | 1                                      | 19         | 9.09       | 0.0071 | 2                                       | 38         | 6.80       | 0.0030 |
| GERM50                | 1                                      | 19         | 8.12       | 0.0102 | 2                                       | 38         | 2.45       | 0.1000 |
| Valor pico            | 1                                      | 19         | 2.85       | 0.1079 | 2                                       | 38         | 7.38       | 0.0020 |
| Días al valor pico    | 1                                      | 19         | 10.51      | 0.0043 | 2                                       | 38         | 2.18       | 0.1271 |

† G.L. = Grados de libertad del numerador y denominador ♦ G.L. = Degrees of freedom of the numerator and denominator.

**Cuadro 8. Valores medio y error estándar (e.e.) de la capacidad germinativa, días para 50 % de la capacidad germinativa (GERM50), valor pico, y días al valor pico de semillas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* con testa de diferente color.**

**Table 8. Mean values and standard error (e.e.) of the germinative capacity, days to 50 % of germinative capacity (GERM50), peak value, and days to peak value of *Pinus cembroides* and *P. orizabensis* seed with different testa colors.**

| Color                    | Capacidad germinativa (%)<br>media ± e.e. | GERM50 (días)†<br>media ± e.e. | Valor Pico (%/d)<br>media ± e.e. | Días al valor pico (días)†<br>media ± e.e. |
|--------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>Pinus cembroides</i>  |                                           |                                |                                  |                                            |
| Negro                    | 87.17 ± 1.27 b <sup>‡</sup>               | 12.47 ± 0.33 b                 | 4.74 ± 0.16 a                    | 15.80 ± 0.44 b                             |
| Pardo                    | 92.75 ± 1.55 a                            | 13.95 ± 0.40 a                 | 5.09 ± 0.14 a                    | 18.08 ± 0.54 a                             |
| <i>Pinus orizabensis</i> |                                           |                                |                                  |                                            |
| Bicolor                  | 83.20 ± 1.43 b                            | 13.61 ± 0.27 a                 | 4.58 ± 0.12 b                    | 16.73 ± 0.35 a                             |
| Negro                    | 81.60 ± 1.43 b                            | 13.24 ± 0.29 a                 | 4.55 ± 0.12 b                    | 16.44 ± 0.35 a                             |
| Pardo                    | 90.00 ± 1.81 a                            | 12.97 ± 0.32 a                 | 5.16 ± 0.15 a                    | 15.97 ± 0.41 a                             |

† Valores menores indica mayor velocidad. ‡ Letras diferentes indican diferencias (p=0.05) ♦ † Lower values indicate higher rate. ‡ Different letters indicate differences (p=0.05).

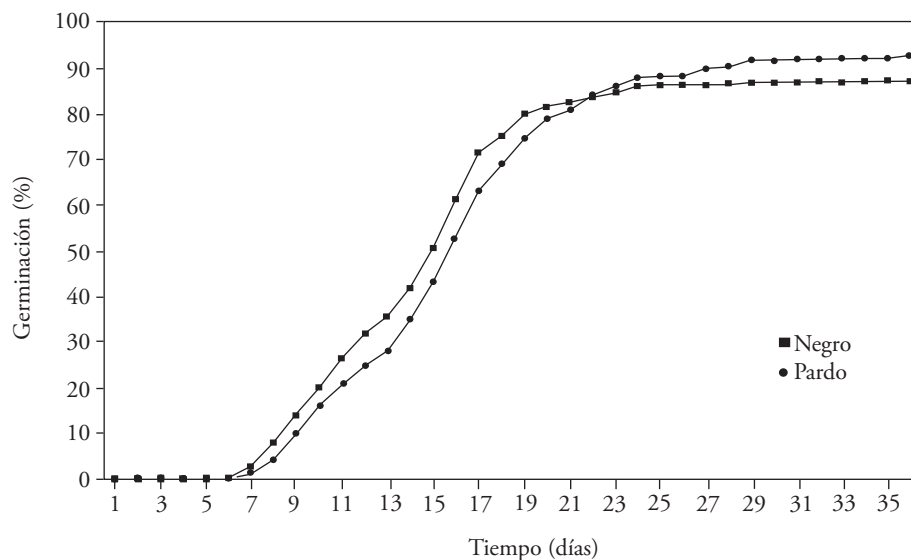


Figura 7. Curva de germinación de semillas *cembroides* con testa de color diferente.

Figure 7. Germination curve of *Pinus cembroides* seeds with different testa color.

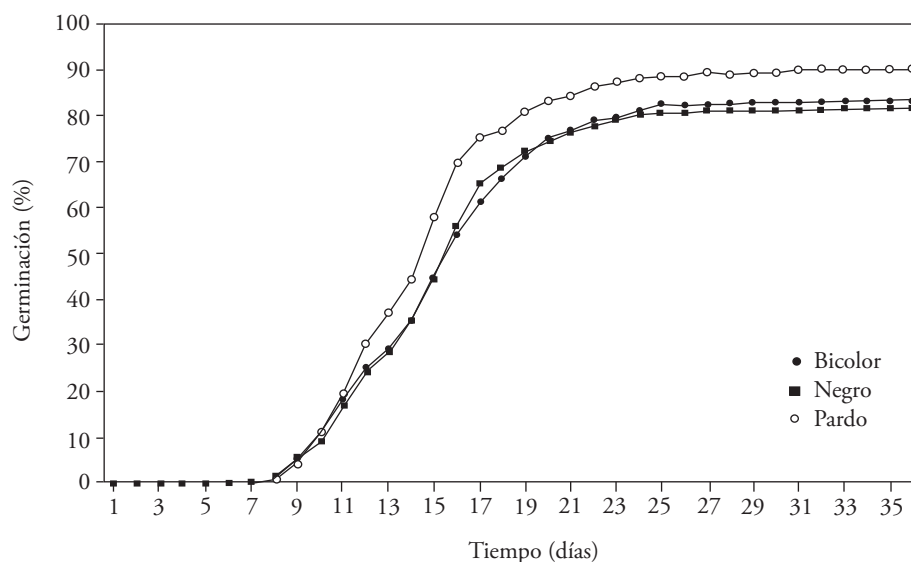


Figura 8. Curva de germinación de semillas de *Pinus orizabensis* con testa de color diferente.

Figure 8. Germination curve of *Pinus orizabensis* seeds of different testa color.

Martínez *et al.* (1987) observaron que semillas de *P. johannis* con diferente color de testa no presentaron diferencias significativas en viabilidad, pero la germinación de semilla moteada fue 36.5 %. Este valor es un tercio del registrado en *P. cembroides* y *P. orizabensis*, con semilla de tono pardo parda o moteada (más de 90 % en ambas especies). Los mismos autores indican que las semillas con testa clara y ne-

distinction and management as different taxa, particularly in repopulation that is carried out in the country.

The results of viability and germination indicate the absence of latency in the seed of both species despite the thick testa, which is composed mainly of dead cells and acts as a protective covering for the live inner tissues (Kolotelo *et al.*, 2001). The seeds

gra tuvieron una germinación de 84 y 79 %. Para el estudio de *P. cembroides* y *P. orizabensis* la semilla de testa color negro fue la de menor capacidad germinativa, 87 y 81 %, respectivamente. En *P. sylvestris* L. no se reportan diferencias en la germinación según el color de la semilla y cada árbol produce diferentes colores de testa (Kaliniewicz *et al.*, 2013).

Las semillas de *P. cembroides* presentaron un grosor mayor de testa y una tasa menor de absorción de agua, y, contrario a lo esperado, germinaron en mayor cuantía y con mayor velocidad de germinación que las semillas de *P. orizabensis*. Una predicción podría ser que las semillas que absorben agua con mayor rapidez como las de *P. orizabensis*, germinen más rápido, pero es posible que algún mecanismo fisiológico esté involucrado en la rápida germinación de *P. cembroides*, y esta característica de respuesta fisiológica pudiera ser de carácter adaptativo oportunista. Lo anterior confirma la existencia de diferencias morfológicas y adaptativas que merecen la distinción y manejo como taxa diferentes, en particular en la repoblación que se efectúan en el país.

Los resultados de viabilidad y germinación indicaron ausencia de latencia en la semilla de ambas especies a pesar del grosor de la testa, que se compone principalmente de células muertas y actúa como una cubierta protectora para los tejidos vivos interiores (Kolotelo *et al.*, 2001). Las semillas sólo presentaron quiescencia, y germinan cuando las condiciones ambientales son adecuadas (Baskin y Baskin, 2004).

## CONCLUSIONES

Las semillas de *Pinus cembroides* tienen mayor grosor de testa, menor tasa de absorción de agua, pero mayor capacidad germinativa y velocidad de germinación que las semillas de *P. orizabensis*, lo que confirma diferencias morfológicas y potencialmente adaptativas.

La procedencia de la semilla tuvo efectos significativos en la calidad de la semilla, sobresalió la de Cadereyta en *P. cembroides* y la de El Carmen en *P. orizabensis*.

El color de la testa de la semilla influyó en las variables de germinación. La semilla con testa de color pardo, la de más valor, presenta más de capacidad germinativa que la de color negro; pero esta última posee mayor vigor, al germinar más rápido.

presented only quiescence and germinate when the environmental conditions are suitable (Baskin and Baskin, 2004).

## CONCLUSIONS

*Pinus cembroides* seeds have thicker testa, lower rate of water absorption, but a higher germinative capacity than the seeds of *P. orizabensis*, which confirms morphological and potentially adaptive differences.

Provenance of the seed had significant effects on seed quality; *P. cembroides* seed from Cadereyta and *P. orizabensis* seed from El Carmen were outstanding.

Seed testa color had influence in germination variables. Brown seeds, the most valuable, have greater germinative capacity than black seeds, but the latter is more vigorous and germinate more rapidly.

—End of the English version—



## LITERATURA CITADA

- Bailey, D. K., and F. G. Hawksworth. 1992. Change in status of *Pinus cembroides* Subsp. *orizabensis* (Pinaceae) from central México. *Novon* 2: 306-307.
- Baskin, J. M., and C. C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14: 1-16.
- Bonner, F. T., J. A. Vozzo, W. W. Elam, and S. B. Land. 1994. Tree Seed Technology Training Course. Instructor's Manual. USDA, Forest Service. General Technical Report SO-106. New Orleans, Louisiana. 160 p.
- Farjon, A., and B. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica Monograph 75. The New York Botanical Garden, Nueva York. 291 p.
- Fonseca J., R. M. 2003. De piñas y piñones. *Ciencias* (Universidad Autónoma de México) 69: 64-65
- Gernandt, D. S., A. Liston, and D. Piñero. 2003. Phylogenetics of *Pinus* Subsections *Cembroides* and *Nelsoniae* Inferred from cpDNA sequences. *Systematic Bot.* 28: 657-673
- Hernández M., M. M., J. Islas G., y V. Guerra de la C. 2011. Márgenes de comercialización del piñón (*Pinus cembroides* subsp. *orizabensis*) en Tlaxcala, México. *Rev. Mex. Ciencias Agríc.* 2: 265-279.
- ISTA, International Seed Testing Association. 1999. International Rules for Seed Testing. *Seed Science & Technology* 27, Supplement. Zurich, Switzerland. 333 p.
- Kaliniewicz, Z., P. Tylek, P. Markowski, A. Anders, T. Rawa, K. Józwiak, and S. Fura. 2013. Correlations between the germination capacity and selected physical properties of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seeds. *Baltic For.* 19: 201-211.

- Kolotelo, D., E. van Steenis, M. Peterson, R. Bennett, D. Trotter, and J. Dennis. 2001. Seed Handling Guidebook. Tree Improvement Branch, Ministry of Forests. British Columbia, Canada. 106 p.
- Landis, T. D., R. W. Tinus, y J. P. Barnett. 2014. Manual de viveros para la producción de especies forestales en contenedor. Vol. 6 Propagación de las Plantas. Comisión Nacional Forestal. Zapopan, Jalisco. pp: 71-96
- Mápula L., M., J. López U., J. J. Vargas H., y A. Hernández L. 2008. Germinación y vigor de semillas en *Pseudotsuga menziesii* de México. Ra Ximhai 4: 119-134.
- Martínez N., F., P. Garza L., y R. Reyes C. 1987. Caracterización radiográfica en la morfología y germinación de *Pinus cembroides* Zucc. y *P. johannis* M.-F. Robert. In: Passini M.-F. (Comp.). Memorias del II Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros. Centre d'Etudes Mexicaines et Centraméricaines. Centro de Genética Forestal A.C., Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Mohedano-Caballero, L., V. M. Cetina A., G. Vera C., y R. Ferrera C. 1999. Micorrización y poda aérea en la calidad de planta de pino piñonero en invernadero. Rev. Chapingo, Serie Ciencias For. y Ambiente 5: 141-148.
- Perry, J. P. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. 231 p.
- Romero M., A., E. García M., and M.-F. Passini. 1996. *Pinus cembroides* s.l. y *Pinus johannis* del Altiplano Mexicano: una síntesis. Acta Bot. Gallica 143: 681-693.
- Ronco, F. P. Jr. 1990. *Pinus edulis* Engelm. pinyon. In: Burns, R. M., and B.H. Honkala, Techn. Coord. Silvics of North America. Volume 1. Conifers. Agric. Handb. 654. USDA, Forest Service. pp: 327-337.
- Sánchez T., V., M. L. Nieto P., y L. C. Mendizábal H. 2005. Producción de semillas de *Pinus cembroides* subsp. *orizabensis* D.K. Bailey de Alzayanca, Tlaxcala, México. Foresta Veracruzana 7: 15-20.
- Sandoval M., C., V. M. Cetina A., R. Yeaton, y L. Mohedano C. 2000. Sustratos y polímeros en la producción de planta de *Pinus cembroides* Zucc. bajo condiciones de invernadero. Rev. Chapingo, Serie Ciencias For. y Ambiente 6: 143-150.
- SAS Institute. 2003. The SAS System for Windows 9.0. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.
- Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1981. Biometry: The Principles of Practice of Statistics in Biological Research. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 776 p.
- Trujillo N., E. 1996. Análisis y pruebas rápidas de la calidad de la semilla. In: Memorias de curso para profesores; Mejoramiento Genético, Selección y Manejo de Fuentes Semilleras y de Semillas Forestales. PROSEFOR, CATIE. Turrialba, Costa Rica. pp: 86-101.
- Wolf, F. 1985. Algunas propiedades de la madera de *P. cembroides* Zucc. In: Memorias del 1er Simposio Nacional Sobre Pinos Piñoneros. Flores L., J. E. (ed). Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. pp: 69-82.