



COLEGIO DE POSTGRADUADOS



UNAN-LEÓN

Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático
(Rev. iberoam. bioecon. cambio clim.)
Vol. 4 num 7, 2018, pag 851-861
ISSN electrónico 2410-7980

Inducción a la ruptura de latencia en semillas de *Trema micranthum*, (Roem. & Schult.) Blume, una especie emergente para la elaboración del papel amate

Nathaly del C. Sánchez Villegas¹; Ángel Sol Sánchez¹; Roberto de la Rosa Santamaría¹; Obdulia Baltazar Bernal²; Javier Gabino Roman³; Elizabeta Hernández Domínguez³

¹Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Cárdenas Tabasco, México.

²Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, Córdoba, Veracruz, México.

³Unidad de Investigación en Biotecnología Vegetal, Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Acayucan Veracruz, México.

*Autor para correspondencia: Ángel Sol Sánchez (sol@colpos.mx)

DOI: <http://dx.doi.org/10.5377/ribcc.v4i7.6314>

Recibido: Enero de 2018

Aceptado: 17 Julio 2018

Resumen

El objetivo de este trabajo fue la evaluación del porcentaje de viabilidad en semillas de *Trema micranthum* los cuales se dividieron en: pruebas de imbibición y test de tetrazolio para la identificación de las semillas viables germinables y viables no germinables, así como la evaluación de dos promotores de germinación para inhibir la latencia presente en las semillas. La permeabilidad de las semillas se evaluó en lotes de 100 con tres réplicas, la viabilidad se determinó mediante pruebas de tinción con tetrazolio a 0.5 y 1% en diferentes tiempos en donde se obtuvo el porcentaje de semillas viables y no viables. Por otro lado, se evaluaron dos promotores de germinación (Nitrato de potasio (KNO₃) y Ácido giberélico (GA3) a tres concentraciones diferentes (500, 1000 y 2000 mg L⁻¹) con tres repeticiones cada uno seguidos de la siembra en medio MS. Finalmente con las pruebas realizadas se determinó el porcentaje de semillas viables germinables y viables no germinables. Las semillas utilizadas en la evaluación de permeabilidad mostraron que transcurridas 10 horas alcanzaban un máximo de absorción de agua, la determinación de tinción de semillas tuvo mayor resultado con tetrazolio al 1.0%. La evaluación de los dos promotores tuvo como resultado el 33% de germinación aproximadamente con GA3 [500 mgL⁻¹] y 18% con KNO₃ [500 mgL⁻¹]. Finalmente, de las dos pruebas que fueron realizadas se tuvo como resultado un 50% de semillas viables 28% de semillas viables no germinables, 22% germinables y estos resultados se obtuvieron mediante las pruebas de tinción y en la evaluación de los dos promotores de germinación.

Palabras clave: Viabilidad; Germinación; Imbibición; Jonote; Latencia

Copyright (c) 2018 Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático.



Este trabajo de la Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático del Centro de Investigación en ciencias agrarias y economía aplicada de la UNAN-León está licenciado bajo una Licencia Internacional Creative Commons 4.0 Atribución-NoComercial-CompartirIgual .



Induction to the latency rupture in seeds of *Trema micranthum*, (Roem. & Schult.) Blume, an emerging species for the production of amate paper

Abstract

The objective of this work was the evaluation of the viability percentage in *Trema micranthum* seeds, which were divided into: imbibition and tetrazolium tests for the identification of viable seed for germination and no viable for germination seeds, as well as the evaluation of two promoters Germination to inhibit latency present in seeds. Seed permeability was evaluated in batches of 100 with three replicates; viability was determined by tetrazolium staining at 0.5 and 1% at different times in which the percentage of viable and non-viable seeds was obtained. On the other hand, two promoters of germination (N03) and gibberellic acid (GA3) were evaluated at three different concentrations (500, 1000 and 2000 mg L⁻¹) with three replicates each followed by sowing in RAS medium. Finally, with the tests carried out, the percentage of viable and no viable seeds for germination seeds was determined. The seeds were used in the evaluation of the permeability of the demonstration that after 10 hours reached a maximum of the water absorption, the determination of the seed show had the main result with the tetrazolium 1.0%. Evaluation of the two promoters resulted in approximately 33% germination with GA3 [500 mgL⁻¹] and 18% with KNO3 [500 mgL⁻¹]. Finally, tests that were carried out on 50% viable seeds 28% viable non-germinable seeds, 22% germinable and these results were obtained by staining tests and in the evaluation of the two germination promoters,

Keywords: Viability; Germination; Imbibition; Jonote; Latency

Introducción

Trema micranthum (*micrantha*) es un árbol perenne, tiene una copa amplia y abierta, puede llegar a medir 30 m de altura y 70 cm de diámetro (Adamski y Ceni-Coelho, 2008; Gutierrez-Carbajal y Dorantes-Lopez, 2004). Es una especie que se encuentra en selvas húmedas y bosques de niebla. En México está presente desde 0 hasta 1500 metros sobre el nivel del mar, distribuido en ecosistemas de selvas perennes en zonas bajas y selvas medianas, hasta zonas semialtas en los bosques mesófilos de montaña, aunque es más frecuente encontrarlo en las planicies costeras del Golfo de México, donde su distribución es muy amplia.

Trema micranthum es un árbol multiusos, en propiedades medicinales como analgésico y antiinflamatorio, (Barbera y Ragusas, 1992). Uno de los principales usos de la especie es la elaboración del papel amate que antes de que se transformara en una artesanía más comercial se elaboraba con corteza de árboles del género *Ficus*, sin embargo, estos árboles se agotaron en su medio natural, por lo tanto, los artesanos se vieron en la necesidad de buscar especies alternas que sirvieran para dichos fines.

Debido al incremento de la demanda de esta artesanía aumentó el número de especies empleadas en la elaboración de papel amate y, por consiguiente, los métodos de procesamiento de las fibras. La situación actual sobre la extracción de corteza del jonote, en semejanza a otros casos de productos forestales no maderables, revela los vacíos en las normas y la manera en la que ciertos recursos biológicos son manejados.





De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 005-SEMARNAT-1997, el aprovechamiento y almacenamiento de cortezas, tallos y plantas completas requieren autorización. En este caso, los jonoteros son sancionados por transportar las cargas de corteza. El arraigo histórico de este producto cultural y el uso de la corteza del jonote han hecho posible la persistencia de la producción del papel amate como artesanía; no obstante, refleja las difíciles condiciones de subsistencia en el ámbito rural y en particular en el uso de productos forestales no maderables.

Debido a que el árbol para la producción de papel amate es completamente descortezado, la extracción de corteza pone en riesgo esta especie. En el caso del *Ficus sp.*, el agotamiento de estos árboles es visible en áreas cercanas a San Pablito Pahuatlan, Puebla. Únicamente individuos maduros, no cosechables son comunes en manchones de bosque y plantaciones mixtas de café. Desde 1980 se observó que las poblaciones de *T. micranthum* fueron reducidas en algunos sitios (Torres 1996, Peters *et al.*, 1987).

Uno de los aspectos más relevantes de la producción de papel amate, es la propagación y generación de poblaciones de árboles de jonote y consecuentemente el establecimiento de un plan de manejo forestal para el suministro de corteza.

Un aspecto que se han detectado en la especie es la reproducción tardía, debido a la dormancia que presentan las semillas, ya que requieren de una alta intensidad lumínica para su germinación y es más largo el proceso en comparación con otras especies pioneras, la germinación puede variar entre los 30 y 50 días a una temperatura de 26°C (Blume, 1857). *T. micranthum* presenta porcentajes de sobrevivencia de aproximadamente 67% durante los seis meses posteriores al trasplante, por lo tanto, es ideal para el mejoramiento de sitios deforestados (Vázquez-Yañez, C., 1998; Rodríguez, R. R. *et al.*, 2004). Tomando en cuenta cada uno de los problemas que presenta la especie y debido a la carencia de información, el objetivo de este trabajo fue evaluar y analizar el tipo de latencia presente en las semillas.

Materiales y métodos

Área de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (UNIBVe) dentro del Instituto Tecnológico Superior de Acayucan, que se ubica entre los paralelos 17° 54' y 18° 09' de latitud norte; 94° 51' y 95° 15' de longitud oeste; altitud entre 10 y 300 m, que se encuentra ubicado en la carretera costera del golfo, km. 216.4, col. Agrícola Michapan, Acayucan Veracruz.

Material biológico

Los frutos de *Trema micranthum* fueron colectados en árboles jóvenes en la región de San Andrés Tuxtla, Veracruz en el mes de octubre del 2013. Se seleccionaron frutos en condiciones óptimas de maduración y fueron trasladadas al laboratorio de biotecnología vegetal en donde se les retiró el mesocarpio con un bisturí y seguido a ello fueron colocadas en cajas Petri para su almacenamiento a temperatura ambiente.





Determinación de imbibición de las semillas

Se realizaron pruebas para la determinación de permeabilidad de las semillas al agua. Para dicho experimento se realizaron tres repeticiones con 100 semillas cada una. Como primer punto se tomó el peso 0 y seguido a esto se colocaron en cajas Petri con papel humedecido con agua. Los tiempos que se tomaron para obtener el peso de las semillas fueron 0, 1, 2, 4, 8, 24 horas, en las cuales antes de ser pesadas se eliminó el agua superficial con la ayuda de servilletas y posteriormente se registraba el peso de cada una de las repeticiones.

Tinción con tetrazolio

Se estandarizó un protocolo de tinción para las semillas de *Trema micrantha* (Hernández-P 2009). Por ello, se evaluaron concentraciones del producto a 0.5% y 1.0% durante 1, 3 y 24 h a temperatura ambiente, bajo condiciones de oscuridad empleando un testigo para observar la tinción.

El protocolo de tinción fue aplicado a 10 embriones con 2 réplicas cada una, las cuales fueron colocadas en tubos eppendorf. Para la extracción del embrión se aplicó presión sobre las semillas con el objetivo de romper la testa, seguido a ello se colocaron en agua destilada y con ayuda de un bisturí y una pinza se eliminó el resto de la testa hasta la obtención completa del embrión.

Pruebas de Germinación

Las semillas que se utilizaron fueron previamente expuestas a un protocolo de desinfección, el cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

Desinfección de las semillas

Se preparó el material *ex vitro* para introducirlo *in vitro* mediante un protocolo de desinfección establecido y modificado de acuerdo a las especies (Domínguez, 2008).

Las semillas fueron colocadas en una solución de antifúngicos (2 gL^{-1} de captan, 2 gL^{-1} de manzate, 2 gL^{-1} terramicina) durante 12 horas. Finalizado el tiempo se desechó la solución y fueron lavadas con agua estéril y destilada, para retirar el exceso de anti fúngicos, posteriormente se colocaron en una solución de antioxidantes por 30 minutos y fueron transferidas a la campana de flujo laminar en donde se le retiraron los antioxidantes y fueron colocadas en una solución de hipoclorito de sodio al 10% (cloro comercial) durante 20 minutos, seguido a ello se eliminó dicha solución y se adicionó H_2O_2 50% por 1 minuto y finalmente se expusieron en alcohol al 70% por 10 minutos, finalizado el protocolo fueron lavadas con agua desionizada y estéril hasta retirar el exceso de todas las soluciones.

Evaluación del ácido giberélico y Nitrato de potasio como promotores de germinación

Finalizado el protocolo de desinfección, las semillas se colocaron en tubos eppendorf con ácido giberélico y Nitrato de potasio a tres concentraciones (500 , 1000 , 2000 mgL^{-1}) y un testigo (0 mgL^{-1} , cada tubo con 20 semillas y se realizó por triplicado. Transcurrido el tiempo de exposición de las semillas en los tratamientos fueron sembradas en medio MS y se colocaron en el cuarto de incubación a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, intensidad





luminosa de $140\mu\text{M m s}^{-1}$ a una temperatura de 25°C , y humedad relativa de 40% hasta su germinación.

Resultados y discusión

Imbibición de las semillas

La curva de crecimiento de imbibición mostró que en las primeras tres horas de exposición no hubo ganancia de peso de manera significativa debido a la permeabilidad de la testa de la semilla al agua, la cual al ser sumergida por largo rato comenzó a cubrir la imbibición mostrando un despliegue a las 4.0 horas y la ganancia de peso se estableció a las 15.0 horas de exposición (fig,1).

Los resultados obtenidos indican que las semillas presentan permeabilidad en la testa y tienen un tipo de latencia que podría ser inhibida con ayuda de hormonas. En vista de que no existen reportes de estudios en *Trema micrantha* bajo condiciones de laboratorio, se tomaron en cuenta otras especies como el mortiño (*V. Meridionale*), el cual presentó un 7% de incremento en peso y concluyen que las simientes del mortiño no presentaron latencia exógena, con base en la permeabilidad de la testa al agua. (Hernández, 2009).

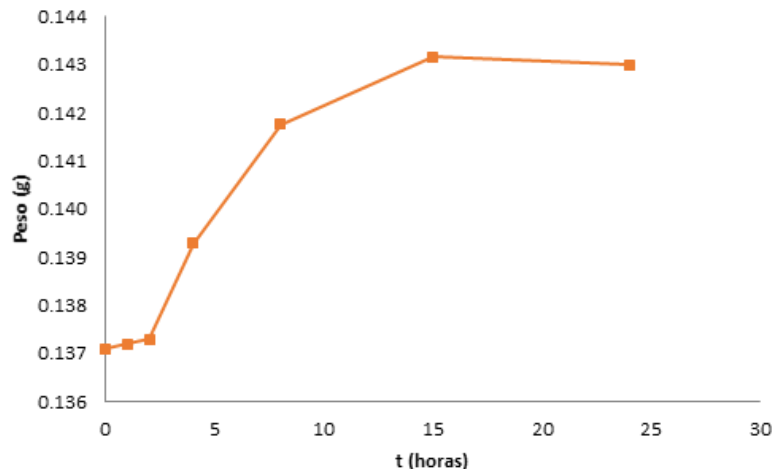


Figura 1. Incremento de peso (g) en semillas de *Trema micranthum*

Protocolo de tinción con tetrazolio

El test de tinción se utilizó para evaluar la coloración que presentaron los embriones de las semillas mostró información significativa. En las figuras 2 y 3 se observa el resultado de las tinciones a dos concentraciones a diferentes tiempos de exposición, ambas figuras presentan un testigo (a) en donde se observó que los embriones son de color blanco; en la figura 2 se presentan los embriones expuestos a una concentración de 0.5% de tetrazolio, los cuales a partir de las seis horas (Figura 2(d)) los embriones comenzaron a tornarse de un color rojizo y después



de 12 horas alcanzaron su máxima tonalidad (Figura 2(e-f); no obstante, bajo la concentración al 1% de tetrazolio, se observó que a partir de las tres horas de exposición (Figura 2(c)) ya tenían una coloración rosa claro y al paso de las horas se tornaron a color rojo más fuerte. Sin embargo, con la prueba de tetrazolio no se pudo obtener el resultado de la viabilidad de las semillas, debido a que las semillas pueden ser viables o no viables a partir de la tinción de los tejidos de los embriones (Borza *et al.*, 2007).

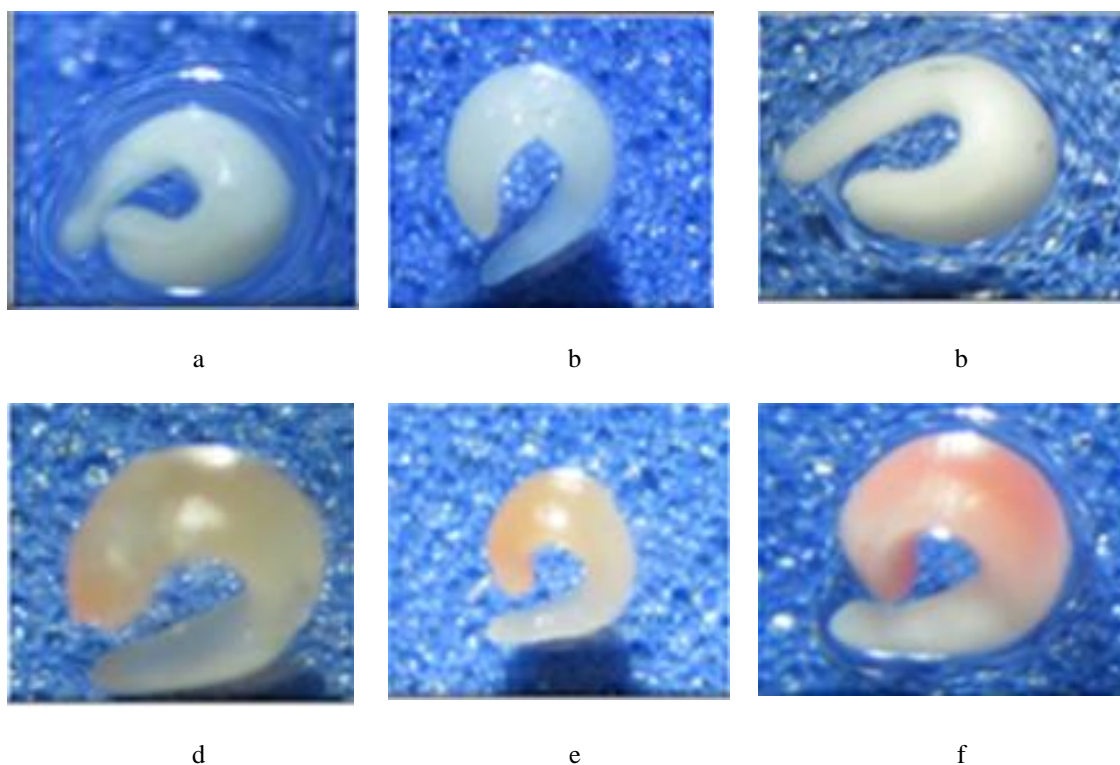


Figura 2. Tinción con tetrazolio al 1% con embriones de *Trema micranthum* a diferentes tiempos de exposición: a) Testigo b) 1 hora; c) 3 horas; d) 6 horas; e) 12 horas; f) 24 horas.

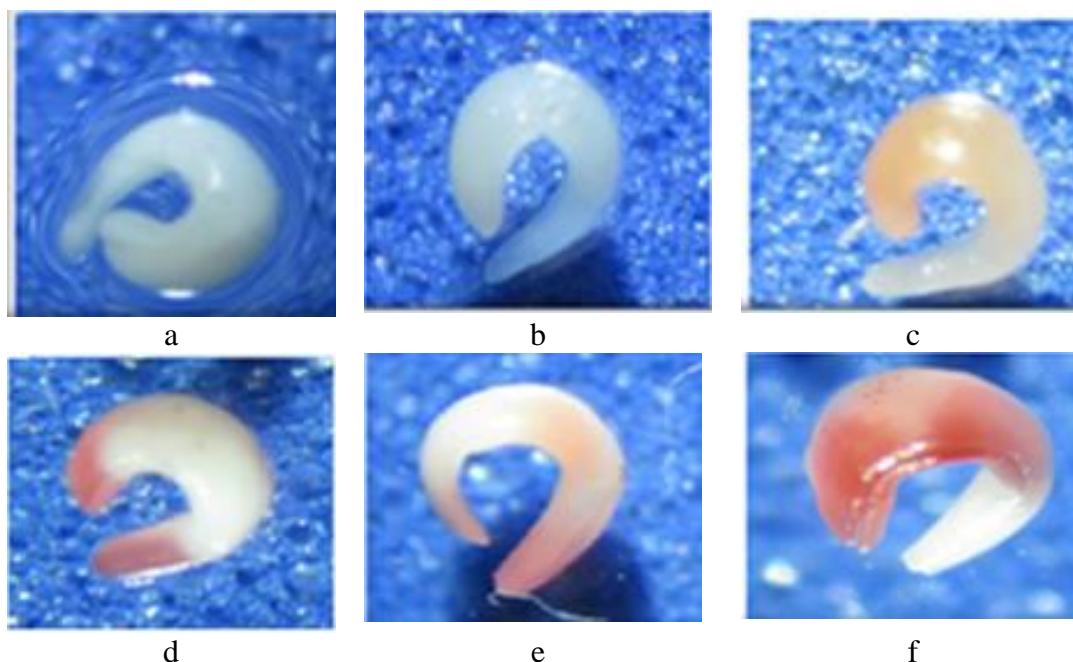


Figura 3. Tinción con tetrazolio a diferentes tiempos de exposición: a) Testigo b) 1 hora; c) 3 horas; d) 6 horas; e) 12 horas; f) 24 horas

Pruebas de Germinación

La germinación de las semillas de *Trema micranthum* se presentó a partir del día 27 posterior a la siembra con ayuda de los promotores de germinación. El porcentaje más alto de germinación de las semillas se obtuvo en aquellas semillas expuestas en el ácido giberélico, como se observa en la figura 4, se alcanzó una germinación mayor al 30% a una concentración de 500 mgL⁻¹ a partir del día 27; seguida a ella se obtuvo un 24% de germinación con 1000 mgL⁻¹ de ácido giberélico y por último un máximo del 10% en concentración de 2000 mgL⁻¹. El efecto de este promotor se mostró después de 24 horas de exposición de las semillas debido a que en ese lapso se estabilizó la absorción de soluciones en relación a los resultados que fueron obtenidos en las pruebas de imbibición.

En la figura 5 se puede observar que a diferencia de los resultados con GA3, el KNO3 mostró una tendencia irregular de germinación. Con la concentración de 500 mgL⁻¹ la germinación comenzó con un 6% a los 36 días, 8% al día 42, 15% en el día 51 y se estabilizó con un 16% al día 57. La concentración de 1000 mgL⁻¹ inició con un 5% a los 36 días, 10% en el día 48 y 14% hasta el día 57, a diferencia de las semillas expuestas en 2000 mgL⁻¹ que no presentó germinación.

En forma comparativa entre ambos promotores, se apreció que el GA3 obtuvo mayor porcentaje de germinación en relación a los días y tiempo de exposición a diferencia del KNO3 que tuvo menor porcentaje de germinación. Con base a ello, los resultados obtenidos se compararon con otras especies como en las semillas de agraz, en donde de la misma manera se

obtuvo mayor porcentaje de germinación con el mismo promotor utilizado (Devlin y Karczmarczyk, 1977; Giba *et al.*, 1995). De acuerdo con la literatura, esto puede ser explicado debido a que se suplen los requerimientos del sistema de fitocromo en semillas fotobásticas (Murdoch y Ellis, 2000), lo que puede implicar que las semillas de agraz se caracterizan por ciertos mecanismos de latencia fisiológica (Copeland y McDonald, 2004).

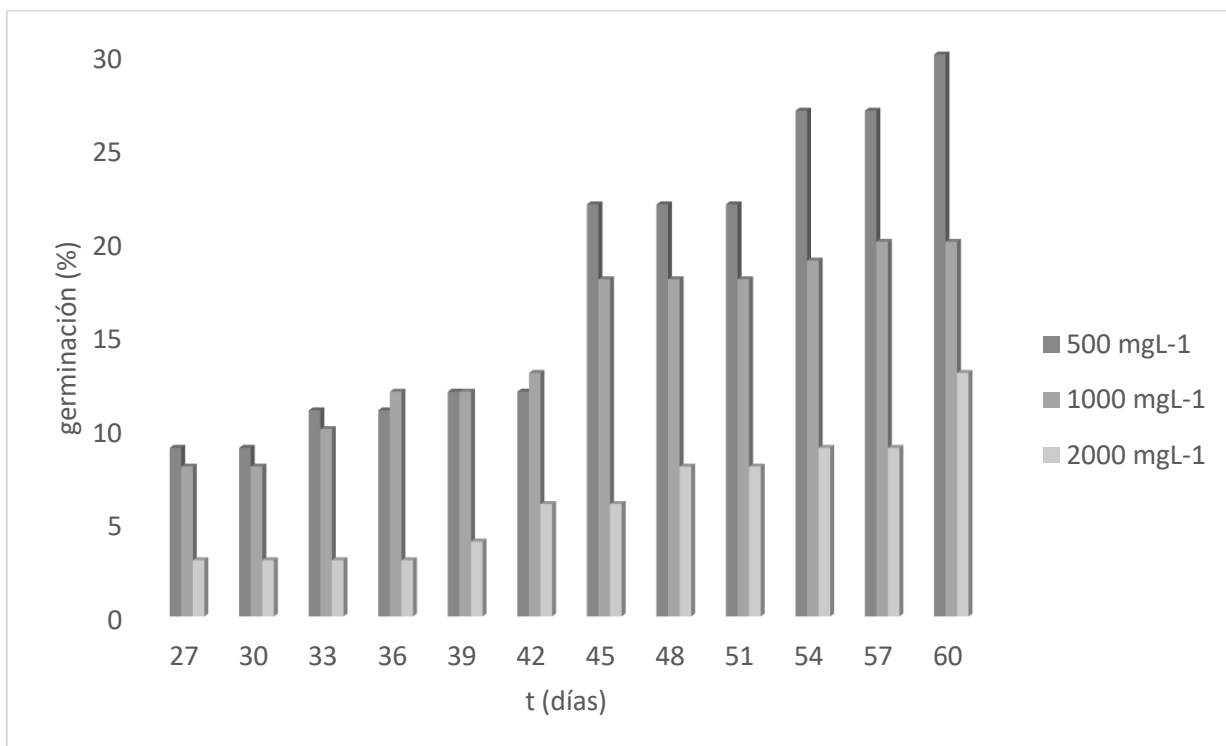


Figura 4. Porcentaje de germinación de *Trema micranthum* después de 30 días expuestos en ácido giberélico (GA₃).

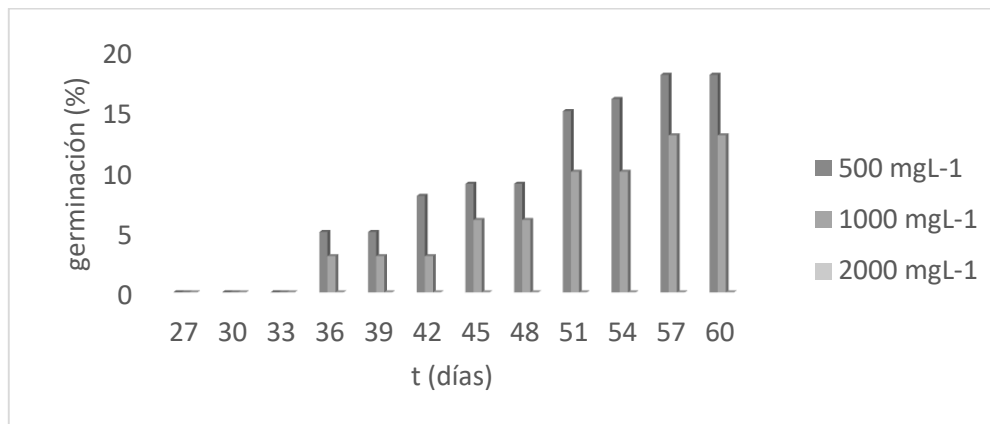


Figura 5. Porcentaje de germinación con Nitrato de Potasio (KNO₃) en *Trema micranthum*

De acuerdo a los datos obtenidos en los experimentos, se observó que las semillas tuvieron un 80% de viabilidad, 35% de semillas germinadas y 45% de semillas viables no germinadas, por último, se obtuvo el 20% de semillas no viables con las pruebas en el test de tetrazolio. La figura 6 muestra los resultados, obtenidos por los resultados de los experimentos de germinación y latencia al igual que las tinciones con tetrazolio.

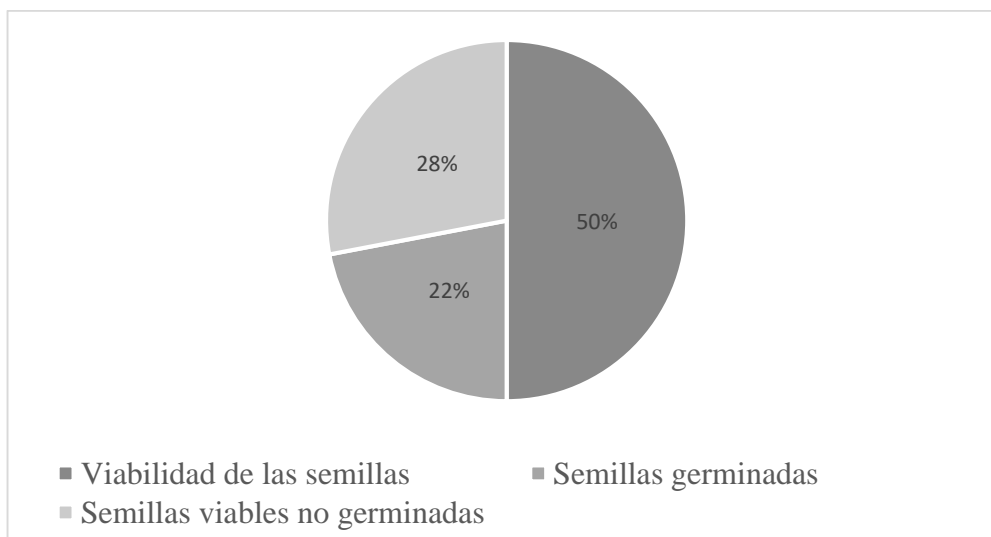


Figura 6. Categorización de la viabilidad de las semillas de *Trema micranthum*



CONCLUSIONES

Las semillas de *Trema micranthum* tienen un porcentaje alto (50%) de inviabilidad que puede ser debido a diverso factores propis de la semilla o se constitución po endógeno.

Los protocolos utilizados para la germinación, demostraron que las semillas de *Trema micranthum* presentan latencia de tipo endógena, la cual, se puede inhibir con promotores de germinación como el GA₃ [500 mgL⁻¹], el cual acelera el proceso de germinación en base al tiempo; sin embargo, no supera la tasa de germinación en condiciones naturales (mayor al 60%).

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como también por la Línea prioritaria de investigación 8 “Impacto y mitigación del cambio climático” y al Laboratorio de Biotecnología Vegetal (UNIBVe).

LITERATURA CITADA

- Adamski, J. M., y Ceni-Coelho, G. 2008. Biomass, mineral accumulation, and calcium crystals in *Trema icrantha* (L.) Blume as a function of calciumcarbonate addition. *Journal of Plant Nutrition*, 31, pp. 205–217.
<https://doi.org/10.1080/01904160701853639>
- Barbera, R., Trovato, A., Rapisarda, A., y Ragusas, S. 1992. Analgesic and antiinflammatory activity in acute and chronic conditions of *Trema guineense* (Schum Thonn.) Ficalho and *Trema micrantha* Blume extracts in rodents. *Phytotherapy Research*, 6(3), pp. 146–148.
<https://doi.org/10.1002/ptr.2650060309>
- Baskin, C.C. y J.M. Baskin. 2001. *Seeds. ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, San Diego, CA.
- Borza, J.K., P.R. Westerman y M. Liebman. 2007. Comparing estimates of seed viability in three foxtail (*Setaria*) species using the imbibed seed crush test with and without additional tetrazolium testing. *Weed Technol.* 21, pp. 518-522.
<https://doi.org/10.1614/WT-06-110>
- Brokaw, N. L. 1985. Gap-phase regeneration of three pioneer species in a neotropical forest. *Journal of Ecology*, 66, pp. 682– 687.
<https://doi.org/10.2307/1940529>
- Devlin, R.M. y S.J. Karczmarczyk. 1977. Influence of light and growth regulators on cranberry seed dormancy. *J. Hort. Sci.* 52, pp. 283-288.
<https://doi.org/10.1080/00221589.1977.11514756>
- Giba, Z., D. Grubisic y R. Konjevic. 1995. The involvement of phytochrome in light- induced germination of blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) seeds. *Seed Sci. Technol.* 23(1), pp. 11-19.





COLEGIO DE POSTGRADUADOS



UNAN-LEÓN

Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático
(Rev. iberoam. bioecon. cambio clim.)
Vol. 4 num 7, 2018, pag 851-861
ISSN electrónico 2410-7980

- Gutiérrez-Carvajal, L., y Dorantes-López, J. 2004. Especies forestales de uso tradicional del estado de Veracruz (1a ed.). México: CONAFOR-CONACYT-UV.
- Hernández P. María Isabel. 2009. Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de morti-o (*Vaccinium meridionale* Swartz). Propagación y cultivo de tejidos. *Agronomía Colombiana* 27(1), pp. 15-23.
- IBPGR. 1985. Handbook of seed technology for genebanks - Volume II. Compendium of specific germination information and test recommendations. International Board for Plant Genetic Resources, Roma Chapter 36. Pp. 200.
- Murdoch, A.J. y R.H. Ellis. 2000. Fenner, M. Dormancy, viability and longevity Seeds: the ecology of regeneration in plants communities. CAB Internacional, pp. 183-214.
<https://doi.org/10.1079/9780851994321.0183>
- Pennington, T., D y Sarukhán. 1988. Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. 2da. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. México, D.F. pp. 350-353.
- Roem. Y Schult. Blume, 1856. *Museum Botanicum* 2: 58. Pp. 1856.
- Torres, R.B. 1996. Biología da Reproducao de *Trema micrantha* (L.)Blume (Ulmaceae).PhD Vásquez-Yanes, C. 1998. *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae): A promising neotropical tree for site amelioration of deforested land. *Agroforestry Systems*, 40, pp. 97–104.

Copyright (c) 2018 Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático.



Este trabajo de la Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático del Centro de Investigación en ciencias agrarias y economía aplicada de la UNAN-León está licenciado bajo una Licencia Internacional Creative Commons 4.0 Atribución-NoComercial-CompartirIgual .