

ARTÍCULO CORTO

Germinación *in vitro* de semillas de *Guaiacum sanctum* L., especie de importancia comercial y medicinal

Carolina Orantes-García*, Nidia del Carmen Ríos-de León, Alma Gabriela Verdugo-Valdez

Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Resumen

Guaiacum sanctum L. es una especie maderable con múltiples propiedades medicinales, sin embargo, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) se encuentra amenazada, además que presenta dificultades para propagarse en condiciones silvestre. El objetivo fue evaluar el proceso germinativo *in vitro* de las semillas de *Guaiacum sanctum*. Las semillas recién recolectadas fueron removidas asépticamente de los frutos y sembrados en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con ácido giberélico (0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 mg L⁻¹ de GA₃). Se utilizó un diseño completamente al azar, aplicándose ANOVA y la prueba de Tukey (P<0.05). Con 2.0 mg L⁻¹ de GA₃ se obtuvo 85% de germinación final comparado con el testigo (0.0 mg L⁻¹ de GA₃) que presentó 13%. Existió diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P<0.0001). El porcentaje final de germinación aumentó a medida que las concentraciones de ácido giberélico incrementaron. La germinación *in vitro* puede ser una alternativa de propagación y conservación para esta especie forestal.

Palabras clave:

Ácido giberélico
Cultivo *in vitro*
Guayacán
Zygophyllaceae

Keywords:

Gibberellic acid
In vitro culture
Guayacan
Zygophyllaceae

In vitro seeds germination of *Guaiacum sanctum* L., a species of commercial and medicinal importance

Abstract

Guaiacum sanctum L. is a timber species with multiple medicinal properties; however, it is threatened according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN), it presents difficulties in propagating in wild conditions. The objective was to evaluate the *in vitro* germination process of *Guaiacum sanctum* seeds. The freshly collected seeds were aseptically removed from the fruits and sown in the Murashige and Skoog (MS) culture medium supplemented with gibberellic acid (0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 mg L⁻¹ GA₃). A completely randomized design was used, applying ANOVA and Tukey's test (P<0.05). With 200 mg L⁻¹ of GA₃, 85% final germination was obtained compared to the control (0.0 mg L⁻¹ of GA₃) which presented 13%. There were statistically significant differences between treatments (P<0.0001). The final germination percentage increased as the concentrations of gibberellic acid increased. *In vitro* germination can be an alternative for propagation and conservation for this forest species.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente número 1150, Colonia Lajas Maciel, C.P. 29032, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Teléfono: + 52 9616170444 ext. 42. Correo-electrónico: carolina.orantes@unicach.mx

1. Introducción

Guaiacum sanctum L. es un árbol tropical nativo de crecimiento lento que pertenece a la familia Zygophyllaceae. En México es conocido comúnmente como “guayacán” y “palo santo” (Pennington y Sarukhán, 2005). Históricamente las poblaciones de *G. sanctum* han sido explotadas debido al gran potencial medicinal que tiene, pues distintas partes de la planta se usan para tratar diferentes enfermedades (López-Toledo et al., 2008). La corteza de *G. sanctum* produce una resina que posee propiedades antibióticas para curar enfermedades de transmisión sexual como la gonorrea y la sífilis (Fuchs y Hamrik, 2010). También es utilizado como laxante, diurético, antiinflamatorio, para el tratamiento de la tos, tuberculosis y reumatismo (Rivers, 2017). Estudios preliminares indican que también podría tener propiedades contra el cáncer (López-Toledo et al., 2008). Además, *G. sanctum* es una especie maderable por lo que ha sido objeto de extracción para uso industrial, el alto contenido de densidad y resina de la madera le confiere propiedad autolubrificante, lo que la hace adecuada para la construcción naval (López-Toledo et al., 2011; Pennington y Sarukhán, 2005).

El uso de la flora local es muy importante para las comunidades; sin embargo, en muchas ocasiones las plantas se obtienen directamente de los bosques, sin que exista un manejo o cultivo de las especies (Cayuela et al., 2006). Este es el caso de *G. sanctum*, donde el aprovechamiento se realiza de poblaciones silvestres, y aunado a la pérdida de su hábitat debido a la deforestación asociada con el crecimiento poblacional, la pobreza y el cambio del uso del suelo, han ocasionado gran reducción de su abundancia en muchos lugares (Cayuela et al., 2006; López-Toledo et al., 2011), por lo que hoy en día se encuentra dentro de la lista roja de especies amenazadas de la International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) y está catalogado en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (IUCN, 2022).

Aunado a lo anterior, los estudios para *G. sanctum* son escasos. Se reporta que la germinación *ex vitro* es muy difícil, no todas las semillas germinan fácilmente; por lo cual se requiere de un manejo especial que muchas veces incluye algún tratamiento pregerminativo, para romper la latencia de las semillas, además se reporta que las semillas son recalcitrantes (Espinoza-Ocaña y Orantes-García, 2014; Flores et al., 2008; Valverde-Cerdas et al., 2008).

Ante la pérdida acelerada de recursos fitogenéticos, se han desarrollado métodos eficientes de conservación *ex situ*; algunos de estos procedimientos recurren a herramientas de la biotecnología que permiten la conservación de germoplasma vegetal, como lo es el cultivo *in vitro*, con lo que se logra la reproducción de las plantas de forma más rápida y efectiva (Bopana y Saxena, 2008). Por lo consiguiente, el objetivo de este trabajo fue evaluar la germinación *in vitro* de las semillas de *G. sanctum*, para obtener información básica que permita iniciar con el

establecimiento de un protocolo de cultivo *in vitro* como búsqueda de una alternativa para la propagación y conservación de esta especie.

2. Materiales y métodos

2.1. Comprobación de la viabilidad de las semillas

Con la finalidad de comprobar la viabilidad de las semillas, se realizó la técnica del tetrazolio. De un lote de 1000 semillas, se tomaron 100 al azar, las cuales se dividieron en 4 grupos de 25 semillas cada uno. Las semillas se sumergieron en agua a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) durante 24 h; posteriormente con la ayuda de un bisturí se dividieron por los cotiledones y se les agregaron tres gotas de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, Sigma®) al 1%. Las semillas fueron colocadas en cajas Petri y se envolvieron con papel aluminio para limitar su exposición a la luz. La incubación se realizó en un ambiente libre de humedad y luz, a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por 24 h (ISTA, 2005); en seguida se observaron con un microscopio estereoscópico Carl Zeiss®, para contar el número de semillas totalmente teñidas. Se determinó el porcentaje de viabilidad de acuerdo con la fórmula de Hartmann y Kester (2001), la cual considera el tono rojo como indicador de semillas totalmente viables, mientras que las semillas libres de coloración son consideradas como no viables.

2.2. Desinfección de semillas

Las semillas presentan un arilo de color rojo (Figura 1), la cual fue eliminada de forma manual; en seguida se lavaron con agua destilada esterilizada y jabón comercial, posteriormente se llevó a cabo la aplicación de tres sustancias preparadas previamente en agua destilada y constante movimiento; hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) al 10% durante 20 min, etanol al 70% durante 5 min y por último, agrimycin-500 (estreptomycin: oxitetreciclina: sulfato tribásico de cobre, Pfizer®) al 1% durante 20 min. Después de la aplicación de cada una de las sustancias se efectuaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

2.3. Germinación *in vitro*

Se prepararon 400 tubos de ensayo de vidrio de 200 x 25 mm (Kimax®), con 25 mL de medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Sigma®) suplementado con diferentes concentraciones (tratamientos) de ácido giberélico (GA₃) (Sigma®); 0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 mg L⁻¹, con 30 g de sacarosa, 0.1 g de myo-inositol, 0.05 g de NaHPO₄ y solidificado con 2.5 g de phytigel, se esterilizaron a 1.5 kg cm⁻² durante 15 min. Los tubos fueron cerrados herméticamente con tapas de baquelita de 20 x 25 cm (Kimax®) y sellados con polietileno (Kleen Pack®). Se dejó a prueba de esterilidad durante tres días en la cámara de incubación. En cada tubo se colocó una semilla, los cuales fueron incubados, durante 60 días, en una cámara bioclimática a 25 ± 1 °C, bajo luz blanca fría fluorescente (50 μmol m⁻² s⁻¹) y fotoperiodo de 16 h luz, 8 h de oscuridad.



Figura 1. Semillas de *G. sanctum*, donde se muestra el arilo de color rojo característico de la especie (izquierda), así como semillas de color negro, sin arilo (derecha).

Se evaluó el porcentaje de germinación final (% G) para determinar el efecto de los tratamientos en la capacidad germinativa (proporción de semillas capaces de germinar en condiciones óptimas o en una condición determinada), también fue calculado el tiempo promedio de germinación, el cual se refiere al tiempo que las semillas necesitan para germinar y germinación acumulada, que muestra la forma en que se incrementa la germinación y el tiempo (días) de inicio de la germinación (Hartmann y Kester, 2001).

2.4. Diseño y análisis estadístico

Se utilizó un diseño categórico completamente aleatorizado con un solo factor de seis niveles, con cinco repeticiones de 20 unidades experimentales por repetición (6x5x20), considerado un total de 600 semillas. Para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) simple y se realizó la prueba de Tukey para la comparación de medias ($P < 0.05$).

3. Resultados y Discusión

3.1 Efectos en la progenie y proporción de individuos diapáusicos

Las semillas de *G. sanctum* presentaron 100% de viabilidad. Espinoza-Ocaña y Orantes-García (2014), indicaron que las semillas de *Guaiacum sanctum* recién colectadas mantienen una viabilidad del 100%.

De acuerdo con los análisis hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.0001$). El mayor porcentaje de germinación final se obtuvo en el tratamiento 2.0 mg L⁻¹ de GA₃ (85%±3.53), mientras que en las semillas a las que no se les aplicó ninguna concentración de ácido giberélico se obtuvo el menor porcentaje de germinación final con 13% (±2.73) (Figura 2). Diversos autores muestran que las giberelinas son importantes para inducir la germinación,

permiten el rompimiento de la latencia, por lo que son ampliamente utilizadas para promover o inducir la germinación de semillas en diversas especies de plantas (Tigabu y Odén, 2001; Siobhan y McCourt, 2003).

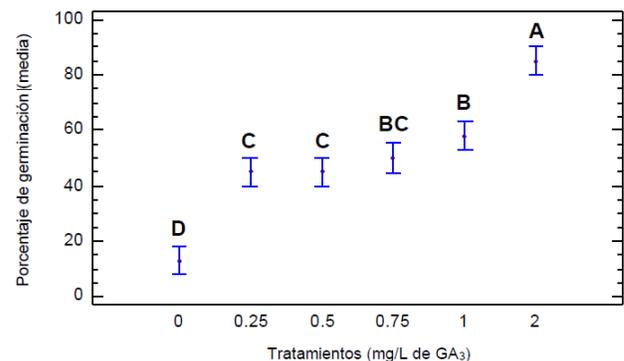


Figura 2. Comparación de medias del porcentaje de germinación final en los diferentes tratamientos aplicados a las semillas de *Guaiacum sanctum* (N=600, F=98.38, $P < 0.0001$).

El ácido giberélico aceleró el tiempo en el proceso germinativo de las semillas de *G. sanctum*. Con el tratamiento 2.0 mg L⁻¹ de GA₃ inició el proceso germinativo a los seis días después de la siembra (dds) concluyendo a los 30 dds, seguido de los tratamientos 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg L⁻¹ de GA₃ a los 10 dds, terminando a los 36 dds y finalmente las semillas con 0.0 mg L⁻¹ de GA₃ iniciaron la germinación a los 15 dds finalizando a los 50 dds (Figura 3).

Se ha demostrado que uno de los mecanismos de acción del ácido giberélico consiste en un efecto directo sobre el potencial de crecimiento del embrión, favoreciendo su rápido crecimiento y desarrollo del tallo y hojas en los primeros días, por lo que, sin lugar a dudas, el suministro de giberelina es necesario para iniciar la activación o síntesis de varias enzimas que actuarán para la nutrición durante la

germinación y tiempo después (Bidwell, 2000; Debeaujon y Koornneef, 2000). La causa de la latencia de *G. sanctum* parece estar relacionada con una deficiencia de giberelina en la semilla, ya que se obtuvo un mayor porcentaje de germinación cuando se agregó ácido giberélico al medio. Araya et al. (2000), observaron una relación directa entre concentración de ácido giberélico y porcentaje de

germinación en semillas de *Alnus acuminata*, ya que se obtienen mayores porcentajes de germinación cuando el ácido giberélico se emplea a altas concentraciones, con 2.0 mg L⁻¹ de GA₃ obtuvieron 55% de germinación final, comparado con el testigo 25%. Cabe mencionar, que este trabajo sería el primero en evaluar el ácido giberélico como promotor del proceso germinativo *in vitro* de *G. sanctum*.

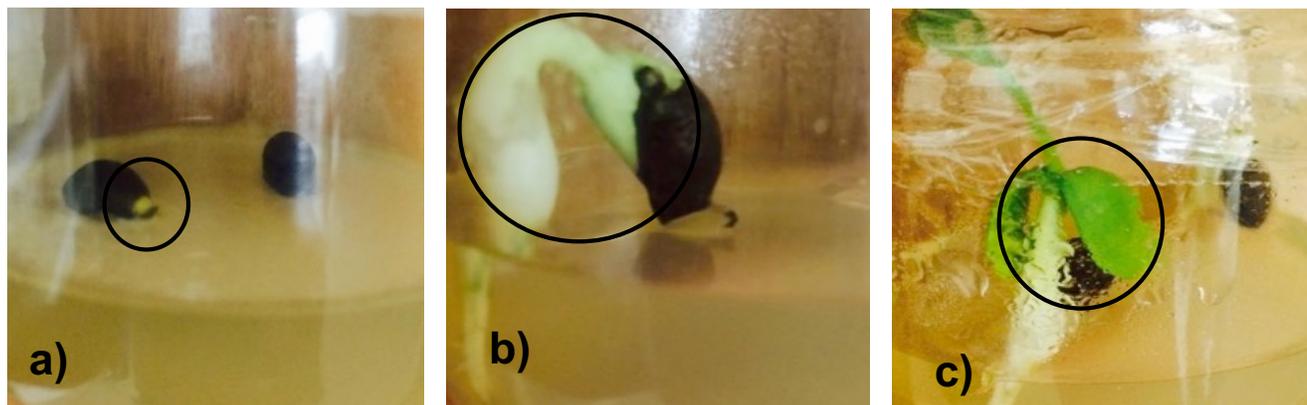


Figura 3. Proceso germinativo *in vitro* de las semillas de *Guaiacum sanctum* con 2.0 mg L⁻¹ de GA₃. Seis después de la siembra (a), a los 21 días al inicio de la germinación mostrando emergencia del hipocotilo proyectando los cotiledones hacia arriba (b) y a los 28 días, emergencia de las primeras hojas (c).

4. Conclusión

Se obtuvo 85% de germinación *in vitro* de semillas de *Guaiacum sanctum* usando 2 mg L⁻¹ de GA₃. La información generada en este estudio puede ser útil para la generación de un protocolo de cultivo *in vitro* que pueda contribuir con el rescate de *G. sanctum*, considerando que es una especie nativa de México y que se encuentra amenazada.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Araya E, Gómez L, Hidalgo N, Valverde R. 2000. Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de jaul (*Alnus acuminata*). *Agronomía Costarricense* 24(1): 75-80.
- Bidwell RGS. 2000. *Fisiología vegetal*. 1a. Edición. Editorial AGT, S.A. México.
- Bopana N, Saxena S. 2008. *In vitro* propagation of a high value medicinal plant: *Asparagus racemosus* Willd. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 44(6): 525-532.
- Cayuela L, Golicher DJ, Benayas JMR, González-Espinosa M, Ramírez-Marcial N. 2006. Fragmentation, disturbance and tree diversity conservation in tropical montane forests. *Journal of Applied Ecology* 43(6): 1172-1181.
- Debeaujon I, Koornneef M. 2000. Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiology* 122: 415-424.

- Espinoza-Ocaña L, Orantes-García C. 2014. Viabilidad y germinación de *Guaiacum sanctum* L. (Zygophyllaceae), árbol tropical amenazado. *Lacandonia* 8(1): 37-40.
- Flores GA, Álvarez MJG, Rodríguez OJL, Corona AA. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora*. *Foresta Veracruzana* 10(2): 27-33.
- Fuchs E, Hamrick JL. 2010. Genetic diversity in the endangered tropical tree, *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). *Journal of Heredity* 101(3): 284-286.
- Hartmann HT, Kester DE. 2001. *Propagación de plantas: principios y prácticas*. 1ª Edición. Editorial Continental. México.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources). 2022. The IUCN red list of threatened species. Version 2023-1. <http://www.iucnredlist.org>. Consultada el 12 de mayo de 2023.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2005. *International rules for seed testing. Rules and annexes*. *Seed Science and Technology* 4: 3-177.
- López-Toledo L, Burslem D, Martínez-Ramos M, García-Naranjo A. 2008. Non-detriment findings report on *Guaiacum sanctum* in México. International Expert Workshop on CITES Non-Detriment Findings. Cancún, México.
- López-Toledo L, Murillo-García A, Martínez-Ramos M, Pérez-Salicrup DR. 2011. Demographic effects of legal timber harvesting on *Guaiacum sanctum* L., an endangered neotropical tree: implications for conservation. *Interciencia* 36(9): 650-665.
- Pennington TD, Sarukhán J. 2005. *Árboles Tropicales de México. Manual para la identificación de las primeras especies*. 3ª Edición. Editorial Universidad Autónoma de México. México.

-
- Rivers MC. 2017. *Guaiacum sanctum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T32955A68085952. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T32955A68085952.en>. Consultada el 04 de enero de 2023.
- Siobhan M, McCourt P. 2003. Hormone cross-talk in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 25-31.
- Tigabu M, Odén P. 2001. Effect of scarification, gibberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose Albizia species from Ethiopia. *Seed Science and Technology* 29: 11-20.
- Valverde-Cerdas L, Rojas-Vargas A, Hine-Gómez A. 2008. *In vitro* propagation of *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata*, *Platymiscium pinnatum* and *Guaiacum sanctum*. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 18(2): 151-156.