

ESCARIFICACIÓN Y GERMINACIÓN *in vitro* DE SEMILLAS DE HELICONIAS

Scarification and *in vitro* germination of heliconia seeds

FC Gómez-Merino ✉, B Vidal-Morales, LI Trejo-Téllez, C Molinos da Silva

(FCMG) Colegion de Postgraduados - Campus Córdoba. Carr. Federal Córdoba-Veracruz km 348. Amatlán de los Reyes 94946, Veracruz México. fernandg@colpos.mx

Nota científica recibido: 6 de octubre de 2008, **aceptado:** 25 de mayo de 2010

RESUMEN. Semillas de *Heliconia bihai* L., *H. collinsiana* Griggs, *H. latispatha* Benthams y *H. psittacorum* L. f. fueron escarificadas usando tres métodos: remoción de testa, remoción de opérculo y extracción del embrión para su posterior germinación *in vitro*. Los tres métodos de escarificación incrementaron el porcentaje de germinación en semillas de *H. collinsiana* y *H. latispatha*. El mayor porcentaje de germinación (90 %) se observó en *H. collinsiana* cuando se extrajeron los embriones.

Palabras clave: Heliconiaceae, germinación *in vitro*, escarificación, opérculo.

ABSTRACT. Seeds of *Heliconia bihai* L., *H. collinsiana* Griggs, *H. latispatha* Benthams and *H. psittacorum* L. f. were scarified using three methods: seed coat removal, operculum removal, and extraction of the embryo to be germinated *in vitro* afterwards. The three scarification methods increased the germination percentage in *H. collinsiana* and *H. latispatha* seeds. The greatest germination percentage (90 %) was observed in *H. collinsiana* after the embryos were extracted.

Key words: Heliconiaceae, *in vitro* germination, scarification, operculum.

INTRODUCCIÓN

Las heliconias pertenecen a la familia Heliconiaceae, que sólo está representada por el género *Heliconia*, con más de 250 especies distribuidas principalmente en el centro y sur de América y en el Caribe (Gutiérrez BC 2000. Flora de Veracruz. Familia Heliconiaceae. Instituto de Ecología).

Actualmente, el cultivo de heliconias muestra una significativa expansión debido a la belleza de sus inflorescencias, que alcanzan precios muy altos en mercados nacionales e internacionales. La reducida oferta de propágulos hace aún más caros los costos de producción de estas plantas. Adicionalmente, en nuestro país no existen reportes actuales relacionados con el cultivo de semillas y tejidos para producir plantas sanas, para lo cual los métodos biotecnológicos pueden contribuir a resolver algunas limitantes en la producción estas especies como los largos periodos requeridos para la germinación de sus semillas (Viegas R 2005. Scientia Agrícola 1: 69-71) como

consecuencia de que se encuentran recubiertas por un endocarpo duro, lo que justifica la larga latencia y bajos porcentajes de germinación (Torres AC, Duval GF, Ribeiro DG, Mendes dos Santos MD 2005. Boletín de Pesquisa e Desenvolvimento 06: 6-12). Para romper dicha latencia y lograr mayor germinación, la escarificación manual ofrece un método confiable de tratamiento con el que se puede lograr un alto porcentaje de germinación, y que puede incluir la remoción de la testa, del opérculo o la extracción del embrión (Bassin JM, Bassin CC 2004. Seed Science Research 14:1-16). El opérculo es una proliferación del endostoma (tegumento interno alrededor del micrópilo), encontrado especialmente en monocotiledóneas. En esta investigación se probaron tres métodos de escarificación manual de semillas de cuatro especies de heliconias: *Heliconia bihai* L., *H. collinsiana* Griggs, *H. latispatha* Benthams, y *H. psittacorum* L. f., con el objetivo de evaluar su impacto sobre el porcentaje de germinación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

Las semillas fueron colectadas en plantaciones comerciales de los municipios de Córdoba y Fortín de las Flores, Veracruz, localizados entre 600 y 1000 msnm, respectivamente. La fase de germinación *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Campus Córdoba del Colegio de Postgraduados.

Material vegetal

Las especies utilizadas fueron *Heliconia bihai* L., *H. collinsiana* Griggs, *H. latispatha* Bentham y *H. psittacorum* L. f., de acuerdo a la clasificación taxonómica de Berry & Kress (1991) (Berry F, Kress WJ 1991. *Heliconia: an identification guide*. Smithsonian Institution Press). En la Tabla 1 se presentan características de las semillas empleadas en esta investigación.

Diseño del experimento

De cada una de las cuatro especies de heliconias en estudio se seleccionaron los frutos maduros y se extrajeron las semillas de forma manual, las cuales se lavaron con agua corriente y jabón en polvo por 20 min, con el auxilio de un agitador magnético. Después fueron inmersas en solución con Captan® (ingrediente activo: captan) a una concentración de 3 g L⁻¹ durante 15 min. En seguida se enjuagaron con agua estéril (dentro de una campana de flujo laminar) hasta eliminar residuos. Subsecuentemente las semillas fueron lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 15 %, 10 gotas de Microdin® y dos gotas de Tween 20® por cada 100 ml de agua, durante 15 min. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua esterilizada y en seguida se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v) en agua por 1 h. Finalmente se aplicaron los tratamientos de escarificación como sigue: un tratamiento testigo (T0) en el que las semillas no fueron escarificadas; un segundo tratamiento (T1) consistente en remover con bisturí la testa las semillas; un tercer tratamiento (T2) en el que se removió el opérculo de las semillas también con bisturí; y un cuarto tratamiento en el que los embriones de las semillas fueron extraídos removiendo progresivamente

la testa y el endospermo, hasta alcanzar el embrión. En todos los tratamientos se utilizaron 50 semillas que posterior a su escarificación fueron sembradas en medio MS (Murashige T, Skoog F 1962. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497). Una vez hechos los tratamientos de escarificación, las semillas fueron depositadas en frascos de vidrio de 500 ml de capacidad conteniendo 40 ml del medio MS al 50 % de concentración para su germinación *in vitro*. Las semillas o embriones establecidos en medio de cultivo *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de incubación con ambiente controlado: luz blanca fría con una radiación de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; fotoperíodo de 16/8 h, y temperatura de 24 °C. Se midió el porcentaje de germinación de las cuatro especies a las seis semanas después de establecidos los tratamientos, en un experimento factorial 2⁴ (factor variedad, a cuatro niveles; y factor método de escarificación, a cuatro niveles) con distribución completamente al azar, en el que se analizó el efecto simple de los factores de estudio y de su interacción sobre el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas.

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos, se realizó el análisis de varianza correspondiente y las medias entre tratamientos fueron comparadas por la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad de error, utilizando el paquete estadístico SAS (SAS 2004. *SAS/STAT User's guide*. Ver. 9.1. SAS Institute, Inc. Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presenta el efecto de la interacción entre factores (variedad y tratamiento de escarificación) sobre el porcentaje de germinación *in vitro* medido seis semanas después del establecimiento en los medios de cultivo. Es claro que semillas de *H. bihai* y *H. psittacorum* no logran germinar o su germinación es casi nula tanto en el tratamiento testigo (sin escarificación) como en los tratamientos de escarificación. Cuando no se da ningún tratamiento de escarificación, las semillas de *H. latispatha* no logran germinar; sin embargo, el porcentaje de germinación aumenta cuando las semillas son tratadas por algún método de escarificación, incluyendo

Tabla 1. Características de las semillas empleadas en la investigación.
Table 1. Characteristics of the seeds under study.

Especie	Tamaño de la semilla en cm		Peso de la semilla en g	Color
	Ancho	Largo		
<i>H. collinsiana</i>	0.48	0.85	0.0814	Gris claro
<i>H. latispatha</i>	0.41	0.77	0.0379	Gris oscuro
<i>H. psittacorum</i>	0.30	0.61	0.0269	Gris claro
<i>H. bihai</i>	0.28	0.76	0.0274	Negra

la extracción de embriones. En lo que se refiera a las semillas de *H. collinsiana*, éstas logran germinar aún sin tratamiento de escarificación. La comparación de medias entre tratamientos refleja cinco grupos estadísticamente diferentes (ANOVA $F = 100.44$, $p < 0.0001$). Las medias más bajas se observan en *H. bihai* y *H. psittacorum* en cualquiera de los tratamientos; a este mismo grupo pertenecen los datos correspondientes a *H. latispatha* tanto en el tratamiento testigo como en el tratamiento de remoción de la testa. El tratamiento de remoción del opérculo en *H. latispatha* y el testigo de *H. collinsiana* comprenden un segundo grupo de datos diferentes estadísticamente a los demás. Un tercer grupo de datos lo conforman los tratamientos de remoción de testa y extracción de embriones de las especies *H. collinsiana* y *H. latispatha*, respectivamente. Un cuarto grupo de datos se encuentra representado por las medias obtenidas en el tratamiento de remoción de opérculo en semillas de *H. collinsiana*. Los datos del tratamiento de extracción de embriones de semillas de *H. collinsiana* revela la existencia de un quinto grupo de datos estadísticamente diferente a los demás, el cual presenta el mayor porcentaje de germinación. En promedio, la germinación de *H. bihai* y *H. psittacorum* fue muy marginal (de tan solo 0.5 % o menor) y no se presentan diferencias significativas entre tratamientos de estas dos especies. En cambio, para el caso de *H. latispatha*, se observa un incremento en el porcentaje de germinación que va del 0 % en el testigo (T0), cerca del 4 % cuando se remueve la testa (T1), mayor al 5 % cuando se remueve el opérculo (T2), y hasta 23.5 % cuando la testa y el endospermo son removidos para extraer el embrión (T3). Para el caso de *H. collinsiana* se observa que las semillas pueden germinar aún

sin tratamiento de escarificación (T0). Sin embargo, el porcentaje de germinación aumenta significativamente a medida que las semillas son tratadas con diferentes técnicas de escarificación, hasta llegar a cerca del 90 % cuando se siembran embriones. Estas diferencias pueden ser explicadas por el hecho de que las heliconias muestran diferentes grados de desarrollo de los embriones al momento que madura el fruto (Simão GD, Scatena LV 2003. Brazilian Archives of Biology and Technology. 46: 65-72).

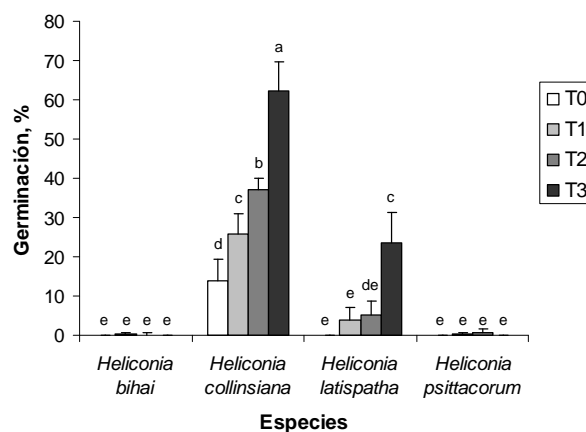


Figura 1. Porcentaje de germinación de semillas de cuatro especies de heliconias. (Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). Las líneas en las columnas indican la desviación estándar del conjunto de datos).

Figure 1. Germination percentage of seeds of four species of Heliconia. (Different letters above the columns indicate significant differences among treatments (Tukey $p \leq 0.05$). The lines on the columns indicate the standard deviation of the data).

Cuando sólo se removió la testa (T1), las semillas de *H. collinsiana* y *H. latispatha* también lograron germinar, aunque en un porcentaje menor: Para el caso de *H. latispatha* se logró un porcen-

Tabla 2. Porcentaje de germinación de semillas y embriones de heliconias, de acuerdo a la especie (A) y al tratamiento a que fueron sometidas (B) (Letras distintas al lado de las medias indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$)).

Table 2. Germination percentage of the Heliconia seeds and embryos of the different species (A) and treatments (B). (Different letters beside the means indicate significant differences among treatments (Tukey, $p \leq 0.05$)).

A. Especie	Porcentaje de germinación
<i>H. collinsiana</i>	34.75 a
<i>H. latispatha</i>	8.13 b
<i>H. psittacorum</i>	0.19 c
<i>H. bihai</i>	0.06 c
B. Tratamiento de escarificación	Porcentaje de germinación
T0	3.50 c
T1	7.50 b
T2	10.69 b
T3	21.44 a
Diferencia mínima significativa (DMS)	3.37

taje de germinación de 3.8 %, mientras que en *H. collinsiana* hubo un 25.8 % de semillas sin testa germinadas.

En la Tabla 2 se observan los efectos simples de los factores de estudio sobre los porcentajes de germinación por especie; es decir los resultados obtenidos por especie independientemente del tratamiento de escarificación, y los porcentajes de germinación por tratamiento de escarificación, independiente a la especie.

Es evidente que entre las especies del género *Heliconia* evaluadas existen grandes diferencias en el porcentaje de germinación con y sin tratamientos de escarificación. Las especies *H. bihai* y *H. psittacorum* presentan el porcentaje más bajo de germinación de semillas, aún con tratamientos de escarificación. Se ha reportado que en algunas especies de heliconias, la escarificación no acelera la germinación de semillas (Viegas R 2005. Scientia Agrícola 1: 69-71). Sin embargo, en el caso de *H. latispatha* y *H. collinsiana* la escarificación logra incrementar el porcentaje de germinación. De estas dos especies, el mayor porcentaje de germinación se observa en *H. collinsiana*, y dicho porcentaje se incrementa al tratar las semillas con alguna técnica de escarificación. A pesar de que se obtuvo un porcentaje alto de germinación, éste es menor al reportado en otro estudio (Castañeda CO 2002. Germinación *in*

vitro de heliconia (*Heliconia collinsiana* Griggs var. *Collinsiana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana), en el que se observó 100 % de semillas germinadas. El porcentaje de germinación de semillas de heliconias puede variar de un año a otro de acuerdo a los regímenes de humedad predominantes, ya que cuando las etapas de madurez de los frutos coinciden con etapas húmedas del año, los embriones logran desarrollarse bien, con lo que se logran mayores porcentajes de germinación (Simão GD, Scatena LV 2003. Brazilian Archives of Biology and Technology. 46: 65-72; Bruna EM 2009. Nature 42: 139-140), y fue precisamente este el caso de los años en que se colectaron las semillas de las especies aquí reportadas (2001, con mayor precipitación y 2007 con menor precipitación en las regiones de colecta de las semillas; datos no mostrados).

En el ambiente natural donde se desarrollan las heliconias, el periodo que toman las semillas para germinar puede oscilar entre tres meses y tres años, lo cual depende del grado del desarrollo del embrión en el momento de la madurez fisiológica del fruto (Delouche JC 2002. Revista SEED News. 6: 1-3). La larga latencia parece ser un mecanismo común en la mayoría de las heliconias (Bruna EM, Nardi O, Strauss SY, Harrison S 2002. Journal of Ecology. 90: 639-649). Por ejemplo, en *H. velloziana* se ha observado que en condiciones naturales, la

semilla puede tardar en germinar cuatro meses, y en casos extremos hasta seis meses; una vez que la semilla germina, la raíz primaria aparece a los ocho a 10 días después, mientras que después de 16 días de la germinación se desarrollan segundas estructuras foliares (Simão GD, Scatena LV 2003. Brazilian Archives of Biology and Technology. 46: 65-72; Simão GD, Scatena LV 2004. Acta Botanica Brasileira. 18: 261-270). Para el caso de la presente investigación, los embriones extraídos de semillas de *H. collinsiana* lograron germinar 12 días después de su establecimiento en medio de cultivo *in vitro*, y comenzaron a producir raíces primarias cinco días después de su germinación, lo cual representa un gran avance en acelerar con éxito la germinación de estas semillas.

En especies de familias evolutivamente cercanas a la Heliconiaceae como lo es la familia Musaceae, la remoción del opérculo no incrementa ni acelera la germinación, posiblemente porque el agua alcanza el embrión pero éste no logra absorberla (Bruna EM, Ribeiro MBN 2002. Journal of Tropical Ecology 21: 127-131). La dificultad de las semillas de *H. psittacorum* y *H. bihai* para germinar es debida a que éstas presentan una testa dura y un endocarpio grueso que funciona como una capa que protege al embrión contra condiciones desfavorables

del ambiente, insectos predadores y el tracto digestivo de dispersores como aves y roedores (Delouche JC 2002. Revista SEED News. 6: 1-3). En algunas monocotiledóneas con frutos dehiscentes, la función protectora está dada por el pericarpio, aunque en la mayoría de ellas dicha protección está determinada por la testa de la semilla. Sin embargo, esta protección que ofrece la testa también representa una barrera para el embrión, haciendo difícil una rápida germinación (Rodrigues P 2005. Scientia Agricola 62: 69-71).

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que la escarificación de semillas incrementa el porcentaje de germinación en las especies *Heliconia collinsiana* y *H. latispatha*. Las especies *H. bihai* y *H. psittacorum* presentan niveles muy bajos o nulos de germinación, aún con tratamientos de escarificación. En semillas de *H. collinsiana* el porcentaje de germinación alcanza casi el 90 % cuando los embriones son extraídos para establecerlos en cultivo *in vitro*. Este último resultado representa una alternativa para la reproducción de esta especie y una estrategia para el desarrollo de sistemas de producción de semillas de la misma hasta ahora dependiente de importaciones.