

## Efecto de nitrato de plata en la germinación *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag.

Daniel Aguilar-Jiménez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8014-4167>

José Luis Rodríguez-De-la-O<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2331-9984>

<sup>1</sup>Programa Educativo de Agrobiotecnología, Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Prolongación Reforma No 168, Barrio de Santiago Mihuacán. Izúcar de Matamoros. Puebla. México. CP 74420.

<sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia, Área de Genética, Universidad Autónoma Chapingo. km 38,5, Car México-Texcoco. Edo México. México.

\*Autor para correspondencia e-mail: [yolot777@hotmail.com](mailto:yolot777@hotmail.com)

### RESUMEN

*Euphorbia nutans* Lag. es una planta herbácea que se encuentra en la Mixteca Poblana, México. Se considera una maleza, no se cultiva y se ignora su uso medicinal para tratar problemas gástricos y cicatrizar heridas. Esta situación puede causar su pérdida de la región. Además, presenta dificultades para su establecimiento *in vitro* mediante tejidos vegetales y semilla. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en la germinación *in vitro* de semillas de *E. nutans* en combinación con factores como la posición de semillas en el medio de cultivo, las condiciones de iluminación y el uso de reguladores del crecimiento. Se empleó el medio de cultivo MS para comparar tres posiciones de semillas, condiciones de iluminación: (16/8 h) y oscuridad, y  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de BA,  $\text{AG}_3$  y AIA. Los resultados mostraron que la germinación de las semillas se ve parcialmente favorecida dependiendo del regulador del crecimiento o de la iluminación. Sin embargo, en todos los casos, la germinación fue superior con  $\text{AgNO}_3$ , con el 100% de semillas germinadas desde la primera semana de cultivo. Las plántulas, alcanzaron la altura del recipiente en tres semanas de cultivo con diferencia significativa con los tratamientos sin  $\text{AgNO}_3$ . El nitrato de plata juega un papel primordial en la germinación *in vitro* de semillas de *E. nutans* y en el crecimiento de las plántulas obtenidas. Este es el primer trabajo sobre el manejo *in vitro* de *E. nutans*.

Palabras clave: fotoperiodo, medicinal, profundidad, reguladores del crecimiento vegetal

### Effect of silver nitrate on the *in vitro* germination of *Euphorbia nutans* Lag.

#### ABSTRACT

*Euphorbia nutans* Lag. it is a herbaceous plant found in the Mixteca Poblana, Mexico. It is considered a weed, it is not cultivated and its medicinal use to treat gastric problems and heal wounds is ignored. This situation can cause your loss of the region. In addition, it presents difficulties to *in vitro* establish from plant tissues and seeds. Therefore, the objective of this work was to determine the effect of silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) on the *in vitro* germination of *E. nutans* seeds in combination with factors such as the position of the seeds in the culture medium, lighting conditions and the use of growth regulators. The MS culture medium was used to compare three seed positions, lighting conditions: (16/8 h) and darkness, and  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  of BA,  $\text{AG}_3$  and AIA. The results showed that the germination of the seeds is partially favored depending on the growth regulator or lighting. However, in all cases, germination was higher with  $\text{AgNO}_3$ , with 100% of seeds germinated from the first week of culture. The seedlings reached the height of the container in three weeks of culture with a significant difference with the treatments without  $\text{AgNO}_3$ . Silver nitrate plays an essential role in the *in vitro* germination of *E. nutans* seeds and in the growth of the seedlings obtained. This is the first work on the *in vitro* management of *E. nutans*.

Keywords: medicinal, depth, photoperiod, plant growth regulators

## INTRODUCCIÓN

Desde el origen del ser humano, este ha mantenido un contacto íntimo con las plantas ya que de ellas depende parte de su subsistencia. A nivel mundial, las plantas son utilizadas por el 80% de la población para satisfacer y/o complementar sus necesidades médicas de acuerdo con estadísticas de la OMS. En México existen aproximadamente 4000 especies de plantas con flores que tienen atributos medicinales, cantidad que representa aproximadamente el 15% de la flora total; pero se estima que el estudio y la validación de los principios activos que contienen sólo se ha realizado en 5% de las especies (Ocegueda *et al.*, 2005).

En el estado de Puebla, México, se localiza una planta con nombre común ´siridonia´ (*Euphorbia nutans* Lag.). Esta especie pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, y es una de las plantas endémicas del país. Se caracteriza por poblar zonas tropicales, aunque también se puede hallar en otras zonas (Rzedowski y Rzedowski, 2001). En la Mixteca Poblana (Izúcar de Matamoros, Atlixco, Tehuiztzingo, Acatlán de Osorio, Tecamatlán, etcétera), ésta planta se encuentra de forma ruderal y arvense. Sin embargo, sólo es considerada como maleza en los terrenos de cultivo y caminos, donde se elimina de forma mecánica o con aplicación de herbicidas sin mostrar algún interés para aprovecharla. Posiblemente como su empleo medicinal para tratar problemas de gastritis y cicatrizar heridas sólo es conocido de forma empírica por pocas personas de la región de Izúcar de Matamoros y no existe algún estudio científico sobre su propagación y/o aprovechamiento, hay poco interés en esta especie. A tal efecto, Martínez *et al.* (2006) mencionan haber realizado un estudio de plantas medicinales en cuatro mercados del estado de Puebla (Atlixco, Tepeaca, Tecamachalco y mercado Hidalgo), y registraron 62 especies sin encontrarse a *E. nutans*. De igual forma, Martínez-Moreno *et al.* (2016) no la informan en un estudio de plantas medicinales en los mercados de Izúcar de Matamoros y de Acatlán de Osorio, Puebla. En este contexto, se considera a *E. nutans* como recurso fitogenético valioso, y por ello, es fundamental contar con un

protocolo para su propagación *in vitro*. Estas técnicas de propagación, aseguran material vegetal de calidad no sólo para multiplicación vegetal masiva (Pierik, 1990; Hurtado y Merino, 2000), sino también, para la obtención de metabolitos secundarios de interés biotecnológico, agrícola y/o farmacológico, como ya se ha demostrado en otras plantas como por ejemplo *Stevia rebaudiana* Bertoni (Magangana *et al.*, 2018; Aguilar-Jiménez *et al.*, 2019), y poder realizar otros estudios posteriores.

Sin embargo, en varios intentos previos para establecer bajo condiciones *in vitro* *E. nutans*, con explantes de tejidos de hoja, segmentos nodales y semillas en medio de cultivo MS en diferentes concentraciones, con antioxidantes y reguladores de crecimiento no se obtuvieron resultados satisfactorios durante 12 meses. En las pocas semillas que lograban germinar se observaban características parecidas a la respuesta a altas concentraciones de etileno tales como raíces e hipocótilos cortos, engrosamiento del hipocótilo y curvatura de la plúmula (Taiz y Zeiger, 2006). Además, las plántulas presentaban un color púrpura con abscisión de hojas y la consecuente muerte. Casos similares por problemas de oxidación, fueron referidos por Perales *et al.* (2016) en *Psidium guajava* L.

Informes de autores como Tagelsir *et al.* (2006) dieron a conocer que combinando carbón activado 1.5% con 1 mg l<sup>-1</sup> de nitrato de plata, así como por Ross *et al.* (2017) en *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. adicionando nitrato de plata 1 o 2 mg l<sup>-1</sup>, lograron reducir la oxidación de los explantes. Por ello, al conocer de la existencia de especies vegetales recalcitrantes, que presentan problemas para trabajarse *in vitro* por ser productoras de etileno, regulador de crecimiento que afecta la obtención de respuestas morfogénicas (Kumar *et al.*, 1998) al acoplarse a receptores de membrana mediante un ion cobre como ligando, como sucede en *Capsicum* spp. (Santana-Buzzy *et al.*, 2006; Ochoa-Alejo y Ramírez-Malangón, 2001; Santana-Buzzy *et al.*, 2012), se optó por evaluar el efecto de una de las sustancias que inhiben a la función del etileno (ion plata) (Taiz y Zeiger, 2006) sobre la muerte de los explantes y los problemas de germinación, así como la

respuesta *in vitro*. En este sentido, Santana-Buzzy *et al.* (2006), mencionan el empleo de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) para dicho fin en *Capsicum chinense* Jacq.

Por otra parte, existen algunos trabajos publicados con plantas de la familia *Euphorbiaceae* por Rambabu *et al.* (2005) y Kamatham *et al.* (2012) en *Givotia rottleriformis* Griff, Rambabu *et al.* (2006) en *Givotia rottleriformis* (var. Tel. Thella Poniki), Sri-Rama y Chandrasekhara (2014) en *Drypetes roxburghii* (Wall.) Hurursawa, que sugieren, que los reguladores de crecimiento y su concentración inducen diferentes respuestas morfogénicas en esta familia dependiendo del género, la especie y el tipo de explante. Posiblemente, en *E. nutans* las respuestas morfogénicas también varíen no sólo por la presencia de nitrato de plata. Atendiendo a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en la germinación *in vitro* de semillas de *E. nutans* en combinación con factores como la posición de semillas en el medio de cultivo, las condiciones de iluminación y el uso de reguladores del crecimiento. Este es el primer trabajo de investigación que aporta datos científicos sobre el manejo *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag., planta de uso medicinal para tratar problemas gástricos y auxiliar en cicatrizar heridas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Semillas de *E. nutans* fueron colectadas en Izúcar de Matamoros, Puebla, México, y llevadas al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México.

### *Desinfección de semillas*

Para el establecimiento *in vitro* de las semillas, se compararon dos métodos de desinfección. El primero consistió en lavar las semillas con agua y detergente por 1 a 2 minutos, se enjuagaron con agua potable, después se colocaron en etanol 70% (v/v) durante 1 minuto. Pasado ese tiempo se decantó el etanol, se enjuagaron con agua estéril y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) diluido al 15%

(v/v) (aproximadamente 1.0% cloro activo) por 15 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril en campana de flujo laminar de aire para colocar cinco semillas por frasco de cultivo.

El segundo método consistió en lavar las semillas con agua y detergente por 1 a 2 minutos, se enjuagaron con agua potable y se colocaron en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante 2 horas en agitación. Pasado ese tiempo, también cinco semillas fueron colocadas directamente en frascos de cultivo. En ambos métodos se emplearon cinco frascos con cinco semillas cada uno. Después de una semana, se observaron para verificar si había presencia de microorganismos contaminantes.

### *Medio de cultivo básico*

Se utilizó un medio de cultivo básico con las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) al 100% de su concentración. Se adicionaron  $0.4 \text{ mg l}^{-1}$  de tiamina,  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de mio-inositol,  $30 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa y como agente gelificante se emplearon  $7 \text{ g l}^{-1}$  de Agar-agar. Antes de la esterilización en autoclave durante 20 min a  $1.05 \text{ kg cm}^{-2}$ , el pH fue ajustado a  $5.7 \pm 0.01$  con NaOH o HCl 1 N.

Efecto de la posición de semillas en medio de cultivo con nitrato de plata

Se empleó el medio de cultivo descrito anteriormente. Se aproximó al volumen final y se dividió en dos partes iguales para agregar, a una de ellas,  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Ambos tratamientos se aforaron al volumen final por separado y se les ajustó pH a  $5.7 \pm 0.01$  antes de fundir el agar y esterilizar en autoclave. Se vertieron 20 ml por frasco de cultivo.

Posteriormente, las semillas de *E. nutans* se desinfectaron como se describió previamente y se colocaron en ambos tratamientos (cinco semillas por frasco) en tres profundidades de siembra: a) superficialmente en el medio de cultivo, b) ligeramente adentro del medio de cultivo y c) completamente adentro del medio de cultivo. Se consideraron cinco repeticiones por tratamiento y a cada frasco con cinco semillas como unidad experimental. Los datos para calcular el porcentaje de

germinación, se tomaron cada semana durante nueve semanas en el área de incubación a  $26 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 16/8 h ( $33.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Como criterio de germinación, se tomó la emisión de la radícula y/o la plúmula a partir del rompimiento de la testa.

#### Efecto de las condiciones de cultivo

Para evaluar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la germinación, se estableció un experimento completamente aleatorizado, donde se probó el medio de cultivo anteriormente expuesto y las condiciones de iluminación de fotoperiodo de 16/8 h ( $33.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad. Se aproximó al volumen final el medio de cultivo básico MS y se dividió en dos partes iguales para agregar, a una de ellas,  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Ambos tratamientos se aforaron por separado y se les ajustó pH a  $5.7 \pm 0.01$  antes de fundir el agar y esterilizar en autoclave. Se distribuyeron de forma individual 20 ml de medio nutritivo en cada recipiente.

Posteriormente, las semillas de *E. nutans* se desinfectaron como se describió previamente y se colocaron en ambos tratamientos (cinco semillas por recipiente) de forma superficial en el medio de cultivo. Se emplearon diez repeticiones por tratamiento y se consideró a cada frasco con cinco semillas como unidad experimental. Se registraron datos de germinación cada semana en el área de incubación donde se colocaron durante nueve semanas a  $26 \pm 2$  °C.

#### Efecto de reguladores de crecimiento

Se emplearon semillas de *E. nutans* para establecer un experimento completamente aleatorizado, con ocho tratamientos con las sales inorgánicas MS 100% como medio de cultivo básico. Se adicionó en cada tratamiento por separado  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido indol acético (AIA), ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ ) y benciladenina (BA) más el tratamiento control (MS 100%), con ( $3.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) y sin nitrato de plata. Se ajustó pH a  $5.7 \pm 0.01$  a cada tratamiento antes de fundir el agar y esterilizar en autoclave. Se distribuyeron individualmente 10 ml en tubos de ensayo de 15x2.3 cm (KIMAX). A continuación, las semillas de *E.*

*nutans* fueron desinfectadas como se describió anteriormente y se colocaron (una semilla por recipiente) de forma superficial en cada tratamiento, para completar quince repeticiones por tratamiento. Se consideró a cada recipiente de cultivo con una semilla como unidad experimental. Los datos para calcular el porcentaje de germinación se tomaron cada semana de cultivo en incubación durante nueve semanas. Los datos para formación y longitud de brotes y raíz (cm) se tomaron a las seis semanas de cultivo en el área de incubación a  $26 \pm 2$  °C y un fotoperiodo de 16/8 h ( $33.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

#### Análisis de datos

Para el análisis de las variables asociadas a la germinación de semillas, se utilizó Microsoft Excel para expresar el porcentaje de germinación de cada tratamiento. Para la longitud de plántula y de raíces, los datos se sometieron a análisis de varianza. Se aplicó la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ) para definir si había diferencia significativa entre los efectos medios de los tratamientos. El paquete estadístico utilizado fue Minitab 17.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La desinfección de las semillas con etanol 70% (v/v) durante 1 minuto más Cloralex® diluido al 15% (v/v) durante 15 minutos y con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agitación por dos horas, resultaron adecuados para evitar la presencia tanto de hongos como bacterias en el medio de cultivo, y poder establecer *in vitro* las semillas. Estos resultados estuvieron en correspondencia con lo mencionado por Kondamudi *et al.* (2009), quienes refirieron que el éxito en el cultivo *in vitro* va dirigido hacia el control y erradicación de microorganismos nocivos que limiten o afecten las respuestas morfogénicas *in vitro* y en su defecto, cualquier estudio o proyecto de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

En este sentido, el empleo del etanol e hipoclorito de sodio ha sido informado ampliamente en procesos efectivos de desinfección por varios autores. Por ejemplo, el hipoclorito de sodio se ha utilizado para lograr el establecimiento *in vitro* de compuestas nativas silvestres a partir de semillas como informaron Pérez-Martínez y Castañeda-Garzón (2017).

Autores como Asma *et al.* (2008) refirieron además, adicionar Tween-20 como un agente tensioactivo. Aun así, en este trabajo fue suficiente el empleo de etanol más hipoclorito de sodio o peróxido de hidrógeno sin la adición de otro coadyuvante para la desinfección. Este resultado coincidió con lo informado por Bidarigh y Azarpour (2013), quienes describieron el empleo de etanol al 10% (v/v) por 30 segundos e hipoclorito de sodio comercial diluido al 30% (v/v) por 10 minutos para establecer *in vitro* explantes de *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. Por otra parte, el empleo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no sólo puede eliminar la presencia de microorganismos contaminantes, sino también, favorecer la germinación como señalaron Mayo-Mosqueda *et al.* (2017) al obtener mayor porcentaje de germinación (84.59%) en semillas de *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Linden & H. Wendland). Por lo tanto, este resultado puede indicar que con esos desinfectantes se logró disminuir la carga microbiana de los explantes iniciales.

En adición a lo anterior, para el empleo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debe tenerse en cuenta que es una especie reactiva de oxígeno y puede causar daños a las macromoléculas celulares al exceder la capacidad antioxidante celular (Halliwell y Whiteman, 2004). Esto indica que puede ser potencialmente dañino al estar en contacto directo con tejidos vegetales. Por ello, tal vez sólo sea recomendable emplearlo en esta especie como aquí se indica siempre y cuando se trate de semillas cigóticas, donde la testa puede evitar que el embrión sufra daños letales.

En el presente trabajo, ambos métodos fueron favorables y se obtuvo el 100% de semillas de *E. nutans* establecidas *in vitro*. Sin embargo, por el tiempo que dura cada método de desinfección, se recomienda el primero (etanol 70% v/v más hipoclorito de sodio comercial Cloralex diluido al 15% v/v). No obstante, existen otros métodos para lograr el establecimiento de explantes *in vitro* como informan Spinoso-Castillo *et al.* (2017), los cuales, también podrían valorarse para esta u otras especies.

Efecto de la posición de semillas en medio de cultivo

En el medio de cultivo sin nitrato de plata, se constató que la posición de la semilla en el

medio de cultivo influyó en la germinación de *E. nutans* conforme transcurrió el tiempo. Se observó el 26.7% de semillas germinadas a las nueve semanas de cultivo *in vitro*. Sin embargo, cuando se encontró presente el nitrato de plata (3 mg l<sup>-1</sup>) independientemente de la posición de la semilla el porcentaje de germinación se elevó a 70% en la primera semana de cultivo. A partir de la segunda semana se logró el 100% de germinación en dos de las posiciones y el 100% de semillas germinadas a las tres semanas de cultivo *in vitro* en todas las posiciones (Figura 1). Estos resultados sugieren que las semillas de *E. nutans* no necesitan de estratificación o escarificación para germinar de forma similar a lo referido por Zurita-Valencia *et al.* (2014) y Benavides *et al.* (2016) para otras especies. La germinación de las semillas se ve afectada también posiblemente por la presencia de etileno como indicaron Kende (1993), Kumar *et al.* (1998), Santana-Buzzy *et al.* (2005), Santana-Buzzy *et al.* (2006) y Santana-Buzzy *et al.* (2012). De ser así, también los problemas de fenolización o necrosis pueden ser por la presencia de etileno como se observó en este trabajo en las plántulas obtenidas de *E. nutans in vitro* en medio de cultivo sin AgNO<sub>3</sub> (Figura 4 A y B). Estos resultados coincidieron con lo publicado por Franck-Duchenne *et al.* (1998), Steinitz *et al.* (1999) y Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón (2001) para *Capsicum* spp., plantas que producen etileno y son recalcitrantes para el establecimiento *in vitro*. En este contexto, los resultados sugieren que, cuando se presentan problemas de necrosis (oxidación) o tejidos recalcitrantes para su establecimiento *in vitro*, no importan el tipo, combinación y concentración de antioxidantes empleados para prevenir o subsanar dicho inconveniente (Concepción *et al.*, 2005), si no se atiende el problema de la acumulación de etileno *in vitro*. Dicha afirmación se basa en lo ya informado por Taiz y Zeiger (2006) de que el nitrato de plata puede inhibir el efecto de etileno, y en los resultados obtenidos por Ross *et al.* (2017) cuando adicionaron 1 o 2 mg l<sup>-1</sup> de nitrato de plata al medio de cultivo, lo cual, redujo la oxidación y obtuvo un 70% de explantes vivos con yemas axilares desarrollados en brotes.

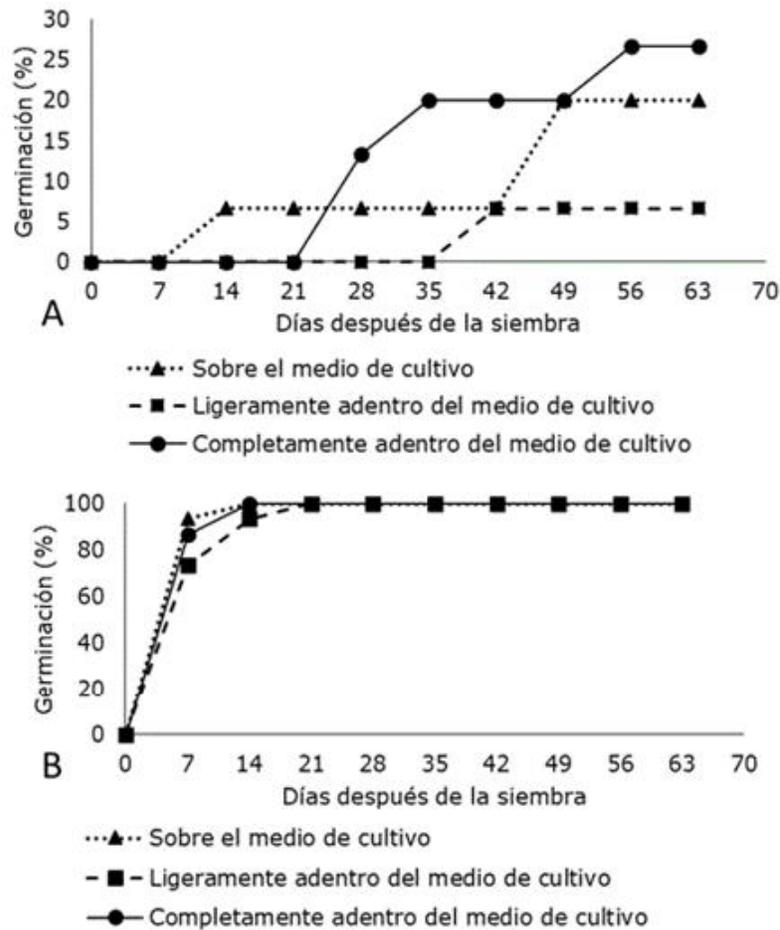


Figura 1. Germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. en diferente posición en el medio de cultivo. A) Medio de cultivo MS al 100% de su concentración sin  $\text{AgNO}_3$ . B) Medio de cultivo MS al 100% de su concentración con  $\text{AgNO}_3$  ( $3.0 \text{ mg l}^{-1}$ ). Cada punto representa el porcentaje calculado cada semana de incubación.

#### Efecto de las condiciones de cultivo

En el medio de cultivo MS sin nitrato de plata, los resultados demostraron que en *E. nutans*, la presencia de luz 16/8 h ( $33.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) estimuló la germinación *in vitro* de las semillas (22.8%) con respecto a la condición de obscuridad (5%) (Figura 2 A). Resultados parcialmente similares a lo informado por Sunandakumari *et al.* (2005) en *Euphorbia nivulia* Buch, donde al parecer, la presencia de luz fue un factor importante para estimular la germinación de semillas y la obtención de respuestas morfológicas. No obstante, la respuesta a la germinación de semillas expuestas a luz u obscuridad, puede depender también de la especie y de otro constituyente del medio de cultivo, pues Flores *et al.* (2017)

informaron el 90% de germinación de semillas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en condiciones de obscuridad sin carbón activado, con carbón activado y en obscuridad, la germinación se vio inhibida. En *E. nutans*, el porcentaje de germinación no aumentó a partir de las ocho semanas de cultivo, al contrario, las plántulas obtenidas en ambas condiciones de luz y obscuridad, murieron a las catorce semanas bajo condiciones *in vitro*. Esto parece indicar que, al ser especies silvestres, cuentan con algún mecanismo fisiológico que les permite germinar fácilmente en lugares expuestos.

En este contexto, se está de acuerdo parcialmente con Bello-Bello *et al.* (2017) en la importancia de la presencia de luz para la

obtención de respuestas morfológicas *in vitro*; lo cual, puede deberse a los diferentes espectros que la componen. Aunque no son variables consideradas para *E. nutans*, existen trabajos publicados sobre la importancia de ellos como el espectro de luz azul para estimular la biosíntesis de clorofila, la apertura de estomas, maduración de cloroplastos y la fotosíntesis (Tibbitts *et al.*, 1983), así como el espectro de luz roja para elongar tallo y causar cambios en la anatomía de la planta al incidir en el fitocromo de las células (Schuerger *et al.*, 1997). Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio con *E. nutans*, la germinación y respuestas morfológicas *in vitro* no dependen directamente de la luz u oscuridad, sino de la presencia de  $\text{AgNO}_3$  en el medio de cultivo (Figura 2 B), el cual, puede inhibir el efecto de la posible presencia de etileno (Taiz y Zeiger, 2006).

Efecto de reguladores de crecimiento

El porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *E. nutans*, en medio de cultivo MS al 100% de su concentración, con la incorporación de reguladores de crecimiento vegetal de forma separada y sin  $\text{AgNO}_3$ , mostró dependencia de  $\text{AG}_3$  con un 60% de semillas germinadas seguida de AIA con 33.33%.

Aun cuando  $\text{AG}_3$  favoreció el 13.3% de la germinación a partir de la segunda semana de cultivo *in vitro*, el 60% de germinación correspondió a la novena semana (Figura 3 A). Con base en el mayor porcentaje de germinación obtenido con  $\text{AG}_3$ , estos resultados coinciden con lo publicado por Rambabu *et al.* (2005), quienes también emplearon  $\text{AG}_3$  para promover la germinación de semillas de *Givotia rottleriformis* Griff

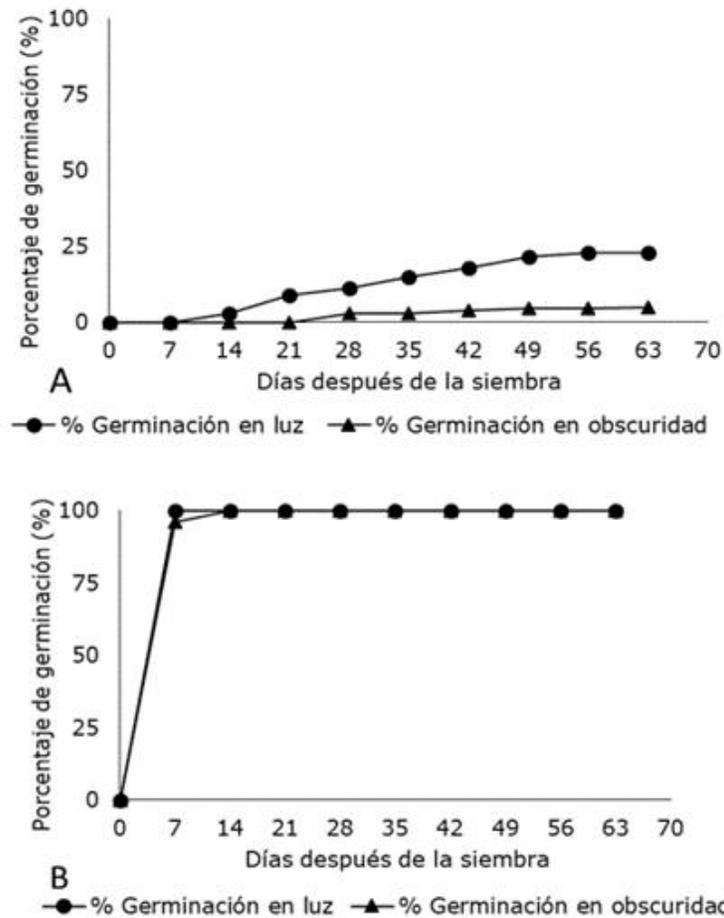


Figura 2. Germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. bajo condiciones de luz y oscuridad. A) Semillas colocadas en medio de cultivo MS al 100% de su concentración sin nitrato de plata. B) Semillas colocadas en medio de cultivo MS al 100% de su concentración con  $\text{AgNO}_3$  ( $3 \text{ mg l}^{-1}$ ). Cada punto representa el porcentaje calculado cada semana de incubación.

(Euphorbiaceae) y alcanzaron 90% de semillas germinadas en comparación con el control con sólo 5%. Aparte, Sri-Rama y Chandrasekhara (2014), emplearon semillas frescas de *Drypetes roxburghii* (Euphorbiaceae) y  $AG_3$  e informaron una germinación de  $83.30 \pm 0.63\%$  removiendo la testa de las semillas cultivadas en un medio de cultivo MS con  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de  $AG_3$  + 0.01% de carbón activado. Igualmente, Fidemann *et al.* (2016) mencionaron el uso de  $AG_3$  para optimizar la germinación de semillas de *Capsicum baccatum* L. pero en concentración más elevada ( $1.88 \text{ mg l}^{-1}$ ) que la empleada en *E. nutans*. Esto sugiere que se realicen otros experimentos con mayores concentraciones de  $AG_3$ . La respuesta de germinación en semillas con  $AG_3$  se debe a su participación efectiva movilizando reservas nutritivas al activar la síntesis de  $\alpha$ -amilasas, enzimas hidrolíticas que van a romper macromoléculas (almidón) y de esta forma pasan al embrión para poder ser utilizadas y así estimular la germinación. Por otra parte, el resultado obtenido con AIA, posiblemente se deba al efecto que tiene este regulador del crecimiento vegetal en la despolimerización de la pared celular y la estimulación radicular, con lo cual, el embrión puede tomar más nutrientes para su activación (Taiz y Zeiger, 2006).

El efecto de BA en la germinación de semillas, tuvo una respuesta similar al tratamiento control. Este resultado difiere de lo informado por Rangel-Estrada *et al.* (2015) al emplear BA para activar la yema axilar y multiplicar brotes *in vitro* de *Euphorbia pulcherrima* y a lo referido por Perales *et al.* (2016), donde BA favoreció la multiplicación de *Psidium guajava* L. Esto sugiere, que BA podría actuar en la activación celular de tejidos diferenciados y no en la germinación de semillas cigóticas de *E. nutans*. Finalmente, los resultados logrados en *E. nutans* coincidieron con Nikam y Barmukh (2009) al obtener el 80.87% y 46% de germinación en semillas de *Santalum album* L. tratadas y no tratadas con  $AG_3$ , respectivamente; y con lo publicado por Pérez-Martínez y Castañeda-Garzón (2017) en semillas de compuestas nativas silvestres, siendo  $AG_3$  el regulador del crecimiento que mejor favoreció el porcentaje de germinación comparado con 6-Bencilaminpurina (BAP) y AIA.

Sin embargo, al igual que en el ensayo anterior la mayor eficiencia y porcentaje de

germinación *in vitro* de semillas de *E. nutans*, dependió directamente de la presencia de  $AgNO_3$  y no de reguladores de crecimiento vegetal en el medio de cultivo (Figura 3 B). Por lo tanto, si en estudios posteriores se comprueba la presencia de etileno y la inhibición de su efecto *in vitro* en *E. nutans* con la aplicación de  $AgNO_3$  como se demostró en chile habanero (*Capsicum annum* L.) por Santana-Buzzy *et al.* (2006), Bello-Bello *et al.* (2010), Yupaporn y Sompong (2012) y Alva y Oropeza (2013), esto puede sugerir que el etileno influye directamente en la biosíntesis o efecto de otros reguladores de crecimiento vegetal en la germinación de semillas de *E. nutans*.

Por otra parte, los datos que corresponden a longitud de plántulas y raíces de semillas de *E. nutans* germinadas en los diferentes tratamientos con  $AgNO_3$ , mostraron diferencia significativa (Tukey,  $p=0.05$ ) con respecto a los tratamientos sin  $AgNO_3$ . Estos resultados estuvieron en correspondencia con los descritos por Santana-Buzzy *et al.* (2006) y Bello-Bello *et al.* (2010) sobre el efecto favorable de  $AgNO_3$  *in vitro* para mitigar daños por efecto de etileno. No obstante, si la presencia de  $AgNO_3$  favorece la longitud de plantas y de raíz en *E. nutans in vitro*, en este trabajo se muestra que esas respuestas morfogénicas van a depender del tipo de regulador de crecimiento empleado, y posiblemente de la concentración y combinación de éstos en el medio de cultivo (Tabla 1).

Así mismo, se observó deformación de raíces y gravitropismo negativo durante la emergencia de plántulas en los tratamientos sin  $AgNO_3$ . Estos resultados fueron similares a los informados por Rambabu *et al.* (2006) en plántulas de *Givotia rottleriformis* obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro*, las cuales presentaron ciertas anomalías. En *E. nutans*, no se observó la formación de callo en ninguno de los tratamientos ni en cualquiera de las condiciones estudiadas para obtener plantas a partir de semillas germinadas *in vitro*. Sin embargo, las plántulas obtenidas en todos los tratamientos sin  $AgNO_3$  presentaron coloración púrpura y características parecidas a la triple respuesta a la presencia de etileno tales como hipocótilos y raíces cortas, curvatura de la plúmula e hipocótilos engrosados (Taiz y Zeiger, 2006) (Figura 4).

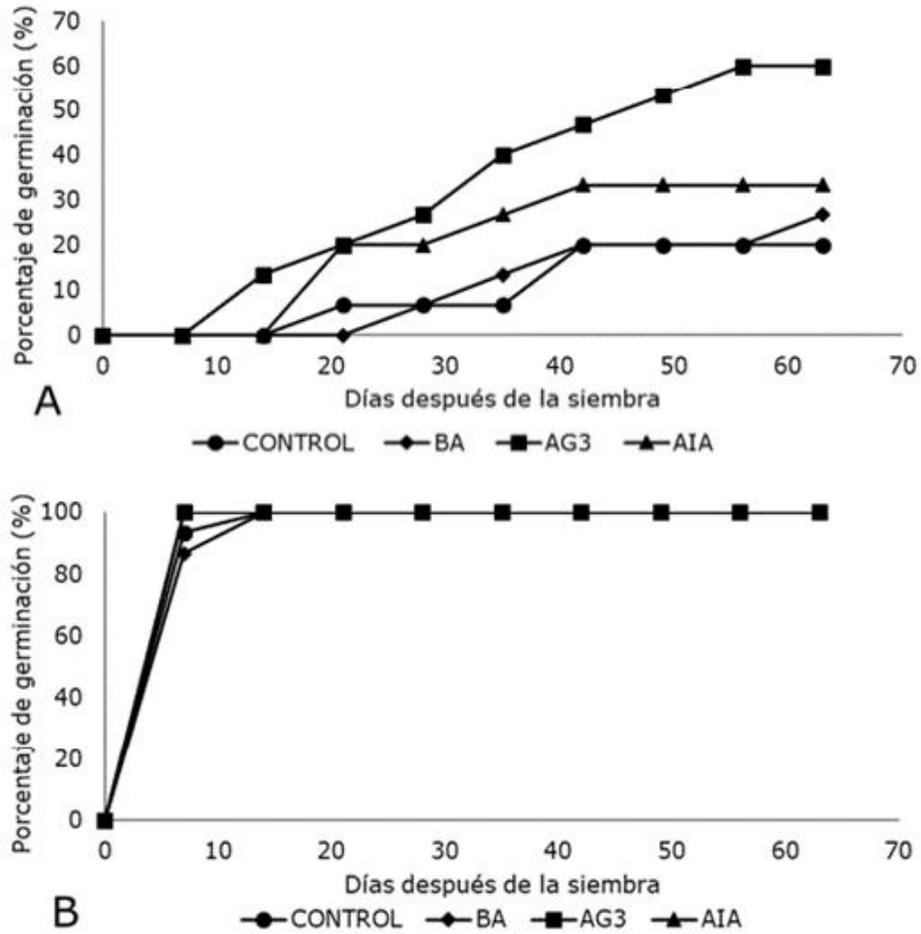


Figura 3. Efecto de tres reguladores de crecimiento vegetal (1 mg l<sup>-1</sup>) en la germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. A) Tratamientos sin AgNO<sub>3</sub> B) Tratamiento con AgNO<sub>3</sub> (3 mg l<sup>-1</sup>).

Tabla 1. Longitud de plántulas y raíz obtenidas de la germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. con y sin AgNO<sub>3</sub>.

Tratamiento	Media aritmética	
	Longitud de plántula (cm)	Longitud de raíces (cm)
AIA con AgNO <sub>3</sub>	9.46 ± 0.37 a	6.28 ± 1.16 ab
AG <sub>3</sub> con AgNO <sub>3</sub>	9.31 ± 0.41 a	4.11 ± 1.46 c
Control con AgNO <sub>3</sub>	8.97 ± 0.53 ab	6.81 ± 0.91 a
BA con AgNO <sub>3</sub>	8.26 ± 0.75 b	5.11 ± 1.00 bc
AG <sub>3</sub> sin AgNO <sub>3</sub>	1.26 ± 0.72 c	0.42 ± 0.25 d
AIA sin AgNO <sub>3</sub>	0.95 ± 0.86 cd	0.29 ± 0.27 d
BA sin AgNO <sub>3</sub>	0.46 ± 0.61 cd	0.29 ± 0.68 d
Control sin AgNO <sub>3</sub>	0.38 ± 0.61 d	0.12 ± 0.19 d

Valores en cada variable que tienen la misma letra, no son significativamente diferentes (Tukey, p = 0.05)

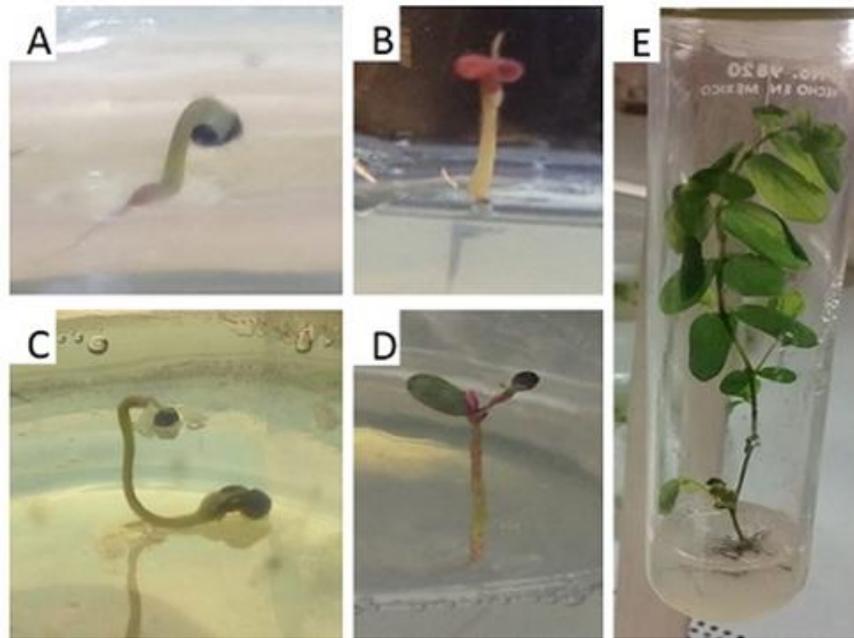


Figura 4. Plántulas de *Euphorbia nutans* Lag. a partir de semillas germinadas *in vitro*. A y B) Plántulas con posible triple respuesta a etileno C) Plántula con gravitropismo negativo D) Plántula emergida a los 5 días de cultivo con  $\text{AgNO}_3$ , E) Plántula obtenida en medio de cultivo con  $\text{AgNO}_3$  a las tres semanas *in vitro*.

#### CONCLUSIONES

Los protocolos de desinfección con el empleo de etanol 70% (v/v) e hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) diluido al 15% (v/v) y peróxido de hidrógeno permiten el establecimiento *in vitro* de semillas de *E. nutans* y evitan la presencia de contaminantes microbianos en el medio de cultivo. Además, la adición de  $\text{AgNO}_3$  ( $3 \text{ mg l}^{-1}$ ) al medio de cultivo favorece la germinación *in vitro* de semillas a partir de la primera semana de cultivo y su combinación con AIA la longitud de las plántulas y de la raíz. Estos resultados sirven de base para la propagación *in vitro* de *E. nutans*.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT por financiar los estudios de postgrado de Daniel Aguilar Jiménez, primer autor; a la M. en C. Ernestina Cedillo Portugal, Profesora-investigadora del Departamento de Preparatoria Agrícola, Herbario Jorge Espinosa Salas de la Universidad Autónoma Chapingo, y al Dr. Víctor W. Steinmann, Botánico-investigador en el Instituto de Ecología del Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán por contribuir en la

identificación de la especie. Los financistas no tuvieron participación en el diseño del estudio, la colecta y análisis de los datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

#### Conflicto de interés

Los autores declararon no tener ningún conflicto de interés con respecto a la investigación, autoría y/o publicación de este artículo.

#### Contribución de los autores

Conceptualización DAJ, Conservación de datos DAJ, Análisis formal DAJ, Adquisición de fondos JLRO, Investigación DAJ y JLRO, Metodología DAJ y JLRO, Administración del proyecto DAJ y JLRO, Recursos JLRO, Supervisión JLRO, Validación DAJ y JLRO, Visualización DAJ, Escritura – primera redacción DAJ, Escritura – revisión y edición DAJ y JLRO.

#### REFERENCIAS

Aguilar-Jiménez D, Rodríguez-De-la-O JL, Piña-Guillén J, Silva-Díaz V (2019) *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* and preliminary analysis of steviosides. Rev Mex Cienc Agríc 10(1): 197-204; doi: 10.29312/remexca.v10i1.1543

- Alva TS, Oropeza M (2013) Effect of culture medium consistence and silver nitrate on micropropagation of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. Revista Colombiana de Biotecnología 15(2): 55-62
- Asma N, Kashif A, Saifullah K (2008) *In vitro* propagation of *Croton* (*Codiaeum variegatum*). Pakistan Journal of Botany 40(1): 99-104
- Bello-Bello JJ, Canto-Flick, A, Balam-Uc E, Gómez-Uc E, L-Robert M, Iglesias-Andreu LG, Santana-Buzzy N (2010) Improvement of *in vitro* proliferation and elongation of habanero pepper shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by temporary immersion. Hortscience 45(7): 1093-1098; doi: 10.21273/HORTSCI.45.7.1093
- Bello-Bello JJ, Pérez-Sato JA, Cruz-Cruz CA, Martínez-Estrada E (2017) Light-Emitting Diodes: Progress in Plant Micropropagation. En: Jacob-Lopes E (ed). Chlorophyll, pp. 93-104. IntechOpen, Rijeka; doi: 10.5772/67913
- Benavides T, Córdova A, Vaca I (2016) Propagación *in vitro* de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth. para la obtención de plantas completas. LA GRANJA: Revista de Ciencias de la Vida 24(2): 150-158; doi: 10.17163/lgr.n24.2016.12
- Bidarigh S, Azarpour E (2013) Effect of BA and GA<sub>3</sub> application on poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) under *in-vitro* conditions. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 5(10): 1053-1057
- Concepción O, Nápoles L, Pérez A, Peralta N, Hernández M, Trujillo R (2005) Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.) relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. Cultivos tropicales 26(1): 33-39
- Fidemann T, Nascimento LB, Moraes MC, Bertão MR, Fernández-Núñez EG (2016) Optimizing *in vitro* germination of *Capsicum baccatum* L. seeds through a multifactorial experimental design. American International Journal of Biology 4(2): 1-22; doi: 10.15640/aijb.v4n2a1
- Flores CO, Cuéllar ZJF, Montes de Godoy ME, Gámez PMR, González AMT, Guevara VM, Aguilar RN (2017) Germinación *in vitro* de semillas de *Vanilla planifolia* Jacks y comparación de métodos de micropropagación. Avances en Investigación Agropecuaria 21(2): 69-83
- Franck-Duchenne M, Wang Y, Ben TS, Beachy RN (1998) *In vitro* stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53: 79-84
- Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? British Journal of Pharmacology 142: 231-255
- Hurtado MDV, Merino MME (2000) Cultivo de Tejidos Vegetales 5ª reimpression. Trillas SA de CV, México DF; ISBN: 968-24-2159-4
- Kamatham S, Rajesh Y, Padmaja G (2012) Temperature pre-treatment of seeds for overcoming the zygotic embryo dormancy of *Givotia rottleriformis* Griff. under *in vitro* conditions. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology 6(1): 19-23
- Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol 44: 283-307; doi: 10.1146/annurev.pp.44.060193.001435
- Kondamudi R, Sri-Rma MK, Pullaiah T (2009) Euphorbiaceae - a critical review on plant tissue culture. Tropical and Subtropical Agroecosystems 10(3): 313-335
- Kumar PP, Lakshmanan P, Thorpe TA (1998) Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro* Cell Dev Biol Plant 34: 94-103
- Magangana TP, Stander MA, Makunga NP (2018) Effect of nitrogen and phosphate on *in vitro* growth and metabolite profiles of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae). Plant Cell Tissue Organ Culture 134(1): 141-151
- Martínez MD, Alvarado FR, Mendoza CM, Basurto PF (2006) Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México. Bol Soc Bot Méx 79: 79-87
- Martínez-Moreno D, Valdéz-Eleuterio G, Basurto-Peña F, Andrés-Hernández AR, Rodríguez-Ramírez T, Figueroa-Castillo A (2016) Plantas medicinales de los mercados

- de Izúcar de Matamoros y Acatlán de Osorio, Puebla. Polibotánica 41: 153-178; doi: 10.18387/polibotanica.41.10
- Mayo-Mosqueda A, Espinosa-Moreno J, Centurión-Hidalgo D, Cazares-Camero JG (2017) Estrategias para mejorar la germinación de semillas de *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Linden & H. Wendland). Polibotánica 43: 1-10
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497; doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nikam TD, Barmukh RB (2009) GA<sub>3</sub> enhances *in vitro* seed germination in *Santalum album*. *Seed Sci & Technol* 37: 276-280; doi: 10.15258/sst.2009.37.2.02
- Ocegueda S, Moreno E, Koleff P (2005) Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica CONABIO. *Biodiversitas* 62: 12-15
- Ochoa-Alejo N, Ramírez-Malagón R (2001) *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 37: 701-729; doi: 10.1007/s11627-001-0121-z
- Perales AL, Silos EH, Lorenzo VL, Perales SC, Flores BS (2016) Propagación *in vitro* de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de segmentos nodales. *Rev Mex Cienc Agríc* 7(2): 375-386
- Pérez-Martínez BA, Castañeda-Garzón SL (2017) Establecimiento *in vitro* de compuestas nativas silvestres a partir del cultivo de semillas. *Foresta Veracruzana* 19(2): 1-10
- Pierik RLM (1990) Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid; ISBN: 10:8471142678
- Rambabu M, Ujjwala D, Ugandhar T, Praveen M, Upender M, Swamy NR (2005) Effect of GA<sub>3</sub> on enhancement of *in vivo* seed germination in *Givotia rottleriformis* (Euphorbiaceae) an endangered forest tree. *Indian Forestry* 131(1): 25-30
- Rambabu M, Upender DU, Ugandhar T, Praveen M, Rama SN (2006) *In vitro* zygotic embryo culture of an endangered forest tree *Givotia rottleriformis* and factors affecting its germination and seedling growth. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 418-421; doi: 10.1079/IVP2006804
- Rangel-Estrada SE, Canul-Ku J, Osuna-Canizalez FJ, García-Perez F, Rosario-Montes P, Vences-Hernández ASB, Hernández-Meneses E (2015) Regeneración *in vitro* de híbridos de nochebuena vía organogénesis. *Rev Mex Cienc Agríc* 6(7): 1571-1585
- Ross S, Arriaga ME, Pechi E (2017) Establecimiento *in vitro* de Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) nativa de Uruguay. *Agrociencia Uruguay* 21(1): 15-23
- Rzedowski GC, Rzedowski J (2001) Flora fanerogámica del Valle de México 2a ed. Instituto de Ecología, AC y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán)
- Santana-Buzzy N, Bello-Bello JJ, Iglesias-Andreu L, Zúñiga-Aguilar JJ, Canto-Flick A, Avilés-Viñas SA, Lecona-Guzmán CA, Solís-Marroquín D, Gómez-Uc E, Balam-Uc E, Arcos-Ortega GF, Mijangos-Cortés JO (2012) Tissue culture of *Capsicum* species. En: Russo VM (ed). *Peppers: Botany, Production and Uses*, pp. 72-86. CAB International, Wallingford; doi: 10.1079/9781845937676.0072
- Santana-Buzzy N, Canto-Flick A, Barahona-Pérez F, Montalvo-Peniche MC, Zapata-Castillo PY, Solís-Ruiz A, Zaldívar-Collí A, Gutiérrez-Alonso O, Miranda-Ham ML (2005) Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience* 40(6): 1829-1831; doi: 10.21273/HORTSCI.40.6.1829
- Santana-Buzzy N, Canto-Flick A, Iglesias-Andreu LG, Montalvo-Peniche MC, López-Puc G, Barahona-Pérez F (2006) Improvement of *in vitro* culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience* 4(2): 405-409; doi: 10.21273/HORTSCI.41.2.405
- Schuerger AC, Brown CS, Stryjewski EC (1997) Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) grown under red light emitting diodes supplemented with blue or far red light. *Annals of Botany* 79(3): 273-282; doi: 10.1006/anbo.1996.0341

- Spinoso-Castillo JL, Chavez-Santoscoy RA, Bogdanchikova N, Pérez-Sato JA, Morales-Ramos V, Bello-Bello JJ (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 129(2): 195-207; doi: 10.1007/s11240-017-1169-8
- Sri-Rama MK, Chandrasekhara RM (2014) Micropropagation and conservation strategies of the potentially medicinal and economically important tropical deciduous tree - *Drypetes roxburghii* (Wall.) Hurursawa. *Journal of Medicinal Plant Research* 8(24): 870-880; doi: 10.5897/JMPR2014.5394
- Steinitz B, Wolf D, Matzevitch-Josef T, Zelcer A (1999) Regeneration *in vitro* and genetic transformation of pepper (*Capsicum* spp.). The current state of the art. *Capsicum and Eggplant Plant Newsletter* 18: 9-15
- Sunandakumari C, Zhang CL, Martin KP, Slater A, Madhusoodanan PV (2005) Effect of auxins on indirect *in vitro* morphogenesis and expression of *gusA* transgene in a lectinaceous medicinal plant, *Euphorbia nivulia* Buch.-Ham. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 41(5): 695-699; doi: 10.1079/IVP2005651
- Tagelsir I, El-Fatih M, Abdelghaffar E (2006) Enhancement or growth and control of browning of tissue cultures of guava (*Psidium guajava* L.). *Sudan J SC TECH* 7(1): 1-10
- Taiz L, Zeiger E (2006) *Fisiología Vegetal Volumen 2*. Publicacions de la Universitat Jaume 1, Los Angeles California; ISBN: 978-84-8021-601-2
- Tibbitts TW, Morgan DC, Warrington IJ (1983) Growth of lettuce, spinach, mustard, and wheat plants under four combinations of high pressure sodium, metal halide, and tungsten halogen lamps at equal PPFD. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108(4): 622–630
- Yupaporn S, Sompong Te-chato (2012) The effect of peptone and silver nitrate on *in vitro* shoot formation in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. *Journal of Agricultural Technology* 8(4): 1509-1516
- Zurita-Valencia W, Gómez-Cruz JE, Atrián-Mendoza E, Hernández-García A, Granados-García ME, García-Magaña JJ, Salgado-Garciglia R, Sánchez-Vargas NM (2014) Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (Tiliaceae). *Polibotánica* 38: 129-134

Recibido: 17-10-2020

Aceptado: 19-11-2020

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.

## Efecto de nitrato de plata en la germinación *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag.

Daniel Aguilar-Jiménez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8014-4167>

José Luis Rodríguez-De-la-O<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2331-9984>

<sup>1</sup>Programa Educativo de Agrobiotecnología, Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Prolongación Reforma No 168, Barrio de Santiago Mihuacán. Izúcar de Matamoros. Puebla. México. CP 74420.

<sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia, Área de Genética, Universidad Autónoma Chapingo. km 38,5, Car México-Texcoco. Edo México. México.

\*Autor para correspondencia e-mail: [yolot777@hotmail.com](mailto:yolot777@hotmail.com)

### RESUMEN

*Euphorbia nutans* Lag. es una planta herbácea que se encuentra en la Mixteca Poblana, México. Se considera una maleza, no se cultiva y se ignora su uso medicinal para tratar problemas gástricos y cicatrizar heridas. Esta situación puede causar su pérdida de la región. Además, presenta dificultades para su establecimiento *in vitro* mediante tejidos vegetales y semilla. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en la germinación *in vitro* de semillas de *E. nutans* en combinación con factores como la posición de semillas en el medio de cultivo, las condiciones de iluminación y el uso de reguladores del crecimiento. Se empleó el medio de cultivo MS para comparar tres posiciones de semillas, condiciones de iluminación: (16/8 h) y oscuridad, y 1.0 mg l<sup>-1</sup> de BA, AG<sub>3</sub> y AIA. Los resultados mostraron que la germinación de las semillas se ve parcialmente favorecida dependiendo del regulador del crecimiento o de la iluminación. Sin embargo, en todos los casos, la germinación fue superior con  $\text{AgNO}_3$ , con el 100% de semillas germinadas desde la primera semana de cultivo. Las plántulas, alcanzaron la altura del recipiente en tres semanas de cultivo con diferencia significativa con los tratamientos sin  $\text{AgNO}_3$ . El nitrato de plata juega un papel primordial en la germinación *in vitro* de semillas de *E. nutans* y en el crecimiento de las plántulas obtenidas. Este es el primer trabajo sobre el manejo *in vitro* de *E. nutans*.

Palabras clave: fotoperiodo, medicinal, profundidad, reguladores del crecimiento vegetal

### Effect of silver nitrate on the *in vitro* germination of *Euphorbia nutans* Lag.

#### ABSTRACT

*Euphorbia nutans* Lag. it is a herbaceous plant found in the Mixteca Poblana, Mexico. It is considered a weed, it is not cultivated and its medicinal use to treat gastric problems and heal wounds is ignored. This situation can cause your loss of the region. In addition, it presents difficulties to *in vitro* establish from plant tissues and seeds. Therefore, the objective of this work was to determine the effect of silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) on the *in vitro* germination of *E. nutans* seeds in combination with factors such as the position of the seeds in the culture medium, lighting conditions and the use of growth regulators. The MS culture medium was used to compare three seed positions, lighting conditions: (16/8 h) and darkness, and 1.0 mg l<sup>-1</sup> of BA, AG<sub>3</sub> and AIA. The results showed that the germination of the seeds is partially favored depending on the growth regulator or lighting. However, in all cases, germination was higher with  $\text{AgNO}_3$ , with 100% of seeds germinated from the first week of culture. The seedlings reached the height of the container in three weeks of culture with a significant difference with the treatments without  $\text{AgNO}_3$ . Silver nitrate plays an essential role in the *in vitro* germination of *E. nutans* seeds and in the growth of the seedlings obtained. This is the first work on the *in vitro* management of *E. nutans*.

Keywords: medicinal, depth, photoperiod, plant growth regulators

## INTRODUCCIÓN

Desde el origen del ser humano, este ha mantenido un contacto íntimo con las plantas ya que de ellas depende parte de su subsistencia. A nivel mundial, las plantas son utilizadas por el 80% de la población para satisfacer y/o complementar sus necesidades médicas de acuerdo con estadísticas de la OMS. En México existen aproximadamente 4000 especies de plantas con flores que tienen atributos medicinales, cantidad que representa aproximadamente el 15% de la flora total; pero se estima que el estudio y la validación de los principios activos que contienen sólo se ha realizado en 5% de las especies (Ocegueda *et al.*, 2005).

En el estado de Puebla, México, se localiza una planta con nombre común ´siridonia´ (*Euphorbia nutans* Lag.). Esta especie pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, y es una de las plantas endémicas del país. Se caracteriza por poblar zonas tropicales, aunque también se puede hallar en otras zonas (Rzedowski y Rzedowski, 2001). En la Mixteca Poblana (Izúcar de Matamoros, Atlixco, Tehuiztzingo, Acatlán de Osorio, Tecamatlán, etcétera), ésta planta se encuentra de forma ruderal y arvense. Sin embargo, sólo es considerada como maleza en los terrenos de cultivo y caminos, donde se elimina de forma mecánica o con aplicación de herbicidas sin mostrar algún interés para aprovecharla. Posiblemente como su empleo medicinal para tratar problemas de gastritis y cicatrizar heridas sólo es conocido de forma empírica por pocas personas de la región de Izúcar de Matamoros y no existe algún estudio científico sobre su propagación y/o aprovechamiento, hay poco interés en esta especie. A tal efecto, Martínez *et al.* (2006) mencionan haber realizado un estudio de plantas medicinales en cuatro mercados del estado de Puebla (Atlixco, Tepeaca, Tecamachalco y mercado Hidalgo), y registraron 62 especies sin encontrarse a *E. nutans*. De igual forma, Martínez-Moreno *et al.* (2016) no la informan en un estudio de plantas medicinales en los mercados de Izúcar de Matamoros y de Acatlán de Osorio, Puebla. En este contexto, se considera a *E. nutans* como recurso fitogenético valioso, y por ello, es fundamental contar con un

protocolo para su propagación *in vitro*. Estas técnicas de propagación, aseguran material vegetal de calidad no sólo para multiplicación vegetal masiva (Pierik, 1990; Hurtado y Merino, 2000), sino también, para la obtención de metabolitos secundarios de interés biotecnológico, agrícola y/o farmacológico, como ya se ha demostrado en otras plantas como por ejemplo *Stevia rebaudiana* Bertoni (Magangana *et al.*, 2018; Aguilar-Jiménez *et al.*, 2019), y poder realizar otros estudios posteriores.

Sin embargo, en varios intentos previos para establecer bajo condiciones *in vitro* *E. nutans*, con explantes de tejidos de hoja, segmentos nodales y semillas en medio de cultivo MS en diferentes concentraciones, con antioxidantes y reguladores de crecimiento no se obtuvieron resultados satisfactorios durante 12 meses. En las pocas semillas que lograban germinar se observaban características parecidas a la respuesta a altas concentraciones de etileno tales como raíces e hipocótilos cortos, engrosamiento del hipocótilo y curvatura de la plúmula (Taiz y Zeiger, 2006). Además, las plántulas presentaban un color púrpura con abscisión de hojas y la consecuente muerte. Casos similares por problemas de oxidación, fueron referidos por Perales *et al.* (2016) en *Psidium guajava* L.

Informes de autores como Tagelsir *et al.* (2006) dieron a conocer que combinando carbón activado 1.5% con 1 mg l<sup>-1</sup> de nitrato de plata, así como por Ross *et al.* (2017) en *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. adicionando nitrato de plata 1 o 2 mg l<sup>-1</sup>, lograron reducir la oxidación de los explantes. Por ello, al conocer de la existencia de especies vegetales recalcitrantes, que presentan problemas para trabajarse *in vitro* por ser productoras de etileno, regulador de crecimiento que afecta la obtención de respuestas morfogénicas (Kumar *et al.*, 1998) al acoplarse a receptores de membrana mediante un ion cobre como ligando, como sucede en *Capsicum* spp. (Santana-Buzzy *et al.*, 2006; Ochoa-Alejo y Ramírez-Malangón, 2001; Santana-Buzzy *et al.*, 2012), se optó por evaluar el efecto de una de las sustancias que inhiben a la función del etileno (ion plata) (Taiz y Zeiger, 2006) sobre la muerte de los explantes y los problemas de germinación, así como la

respuesta *in vitro*. En este sentido, Santana-Buzzy *et al.* (2006), mencionan el empleo de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) para dicho fin en *Capsicum chinense* Jacq.

Por otra parte, existen algunos trabajos publicados con plantas de la familia *Euphorbiaceae* por Rambabu *et al.* (2005) y Kamatham *et al.* (2012) en *Givotia rottleriformis* Griff, Rambabu *et al.* (2006) en *Givotia rottleriformis* (var. Tel. Thella Poniki), Sri-Rama y Chandrasekhara (2014) en *Drypetes roxburghii* (Wall.) Hurursawa, que sugieren, que los reguladores de crecimiento y su concentración inducen diferentes respuestas morfogénicas en esta familia dependiendo del género, la especie y el tipo de explante. Posiblemente, en *E. nutans* las respuestas morfogénicas también varíen no sólo por la presencia de nitrato de plata. Atendiendo a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en la germinación *in vitro* de semillas de *E. nutans* en combinación con factores como la posición de semillas en el medio de cultivo, las condiciones de iluminación y el uso de reguladores del crecimiento. Este es el primer trabajo de investigación que aporta datos científicos sobre el manejo *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag., planta de uso medicinal para tratar problemas gástricos y auxiliar en cicatrizar heridas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Semillas de *E. nutans* fueron colectadas en Izúcar de Matamoros, Puebla, México, y llevadas al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México.

### *Desinfección de semillas*

Para el establecimiento *in vitro* de las semillas, se compararon dos métodos de desinfección. El primero consistió en lavar las semillas con agua y detergente por 1 a 2 minutos, se enjuagaron con agua potable, después se colocaron en etanol 70% (v/v) durante 1 minuto. Pasado ese tiempo se decantó el etanol, se enjuagaron con agua estéril y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) diluido al 15%

(v/v) (aproximadamente 1.0% cloro activo) por 15 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril en campana de flujo laminar de aire para colocar cinco semillas por frasco de cultivo.

El segundo método consistió en lavar las semillas con agua y detergente por 1 a 2 minutos, se enjuagaron con agua potable y se colocaron en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante 2 horas en agitación. Pasado ese tiempo, también cinco semillas fueron colocadas directamente en frascos de cultivo. En ambos métodos se emplearon cinco frascos con cinco semillas cada uno. Después de una semana, se observaron para verificar si había presencia de microorganismos contaminantes.

### *Medio de cultivo básico*

Se utilizó un medio de cultivo básico con las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) al 100% de su concentración. Se adicionaron  $0.4 \text{ mg l}^{-1}$  de tiamina,  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de mio-inositol,  $30 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa y como agente gelificante se emplearon  $7 \text{ g l}^{-1}$  de Agar-agar. Antes de la esterilización en autoclave durante 20 min a  $1.05 \text{ kg cm}^{-2}$ , el pH fue ajustado a  $5.7 \pm 0.01$  con NaOH o HCl 1 N.

Efecto de la posición de semillas en medio de cultivo con nitrato de plata

Se empleó el medio de cultivo descrito anteriormente. Se aproximó al volumen final y se dividió en dos partes iguales para agregar, a una de ellas,  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Ambos tratamientos se aforaron al volumen final por separado y se les ajustó pH a  $5.7 \pm 0.01$  antes de fundir el agar y esterilizar en autoclave. Se vertieron 20 ml por frasco de cultivo.

Posteriormente, las semillas de *E. nutans* se desinfectaron como se describió previamente y se colocaron en ambos tratamientos (cinco semillas por frasco) en tres profundidades de siembra: a) superficialmente en el medio de cultivo, b) ligeramente adentro del medio de cultivo y c) completamente adentro del medio de cultivo. Se consideraron cinco repeticiones por tratamiento y a cada frasco con cinco semillas como unidad experimental. Los datos para calcular el porcentaje de

germinación, se tomaron cada semana durante nueve semanas en el área de incubación a  $26 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 16/8 h ( $33.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Como criterio de germinación, se tomó la emisión de la radícula y/o la plúmula a partir del rompimiento de la testa.

#### Efecto de las condiciones de cultivo

Para evaluar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la germinación, se estableció un experimento completamente aleatorizado, donde se probó el medio de cultivo anteriormente expuesto y las condiciones de iluminación de fotoperiodo de 16/8 h ( $33.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad. Se aproximó al volumen final el medio de cultivo básico MS y se dividió en dos partes iguales para agregar, a una de ellas,  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Ambos tratamientos se aforaron por separado y se les ajustó pH a  $5.7 \pm 0.01$  antes de fundir el agar y esterilizar en autoclave. Se distribuyeron de forma individual 20 ml de medio nutritivo en cada recipiente.

Posteriormente, las semillas de *E. nutans* se desinfectaron como se describió previamente y se colocaron en ambos tratamientos (cinco semillas por recipiente) de forma superficial en el medio de cultivo. Se emplearon diez repeticiones por tratamiento y se consideró a cada frasco con cinco semillas como unidad experimental. Se registraron datos de germinación cada semana en el área de incubación donde se colocaron durante nueve semanas a  $26 \pm 2$  °C.

#### Efecto de reguladores de crecimiento

Se emplearon semillas de *E. nutans* para establecer un experimento completamente aleatorizado, con ocho tratamientos con las sales inorgánicas MS 100% como medio de cultivo básico. Se adicionó en cada tratamiento por separado  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido indol acético (AIA), ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ ) y benciladenina (BA) más el tratamiento control (MS 100%), con ( $3.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) y sin nitrato de plata. Se ajustó pH a  $5.7 \pm 0.01$  a cada tratamiento antes de fundir el agar y esterilizar en autoclave. Se distribuyeron individualmente 10 ml en tubos de ensayo de 15x2.3 cm (KIMAX). A continuación, las semillas de *E.*

*nutans* fueron desinfectadas como se describió anteriormente y se colocaron (una semilla por recipiente) de forma superficial en cada tratamiento, para completar quince repeticiones por tratamiento. Se consideró a cada recipiente de cultivo con una semilla como unidad experimental. Los datos para calcular el porcentaje de germinación se tomaron cada semana de cultivo en incubación durante nueve semanas. Los datos para formación y longitud de brotes y raíz (cm) se tomaron a las seis semanas de cultivo en el área de incubación a  $26 \pm 2$  °C y un fotoperiodo de 16/8 h ( $33.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

#### Análisis de datos

Para el análisis de las variables asociadas a la germinación de semillas, se utilizó Microsoft Excel para expresar el porcentaje de germinación de cada tratamiento. Para la longitud de plántula y de raíces, los datos se sometieron a análisis de varianza. Se aplicó la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ) para definir si había diferencia significativa entre los efectos medios de los tratamientos. El paquete estadístico utilizado fue Minitab 17.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La desinfección de las semillas con etanol 70% (v/v) durante 1 minuto más Cloralex® diluido al 15% (v/v) durante 15 minutos y con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agitación por dos horas, resultaron adecuados para evitar la presencia tanto de hongos como bacterias en el medio de cultivo, y poder establecer *in vitro* las semillas. Estos resultados estuvieron en correspondencia con lo mencionado por Kondamudi *et al.* (2009), quienes refirieron que el éxito en el cultivo *in vitro* va dirigido hacia el control y erradicación de microorganismos nocivos que limiten o afecten las respuestas morfogénicas *in vitro* y en su defecto, cualquier estudio o proyecto de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

En este sentido, el empleo del etanol e hipoclorito de sodio ha sido informado ampliamente en procesos efectivos de desinfección por varios autores. Por ejemplo, el hipoclorito de sodio se ha utilizado para lograr el establecimiento *in vitro* de compuestas nativas silvestres a partir de semillas como informaron Pérez-Martínez y Castañeda-Garzón (2017).

Autores como Asma *et al.* (2008) refirieron además, adicionar Tween-20 como un agente tensioactivo. Aun así, en este trabajo fue suficiente el empleo de etanol más hipoclorito de sodio o peróxido de hidrógeno sin la adición de otro coadyuvante para la desinfección. Este resultado coincidió con lo informado por Bidarigh y Azarpour (2013), quienes describieron el empleo de etanol al 10% (v/v) por 30 segundos e hipoclorito de sodio comercial diluido al 30% (v/v) por 10 minutos para establecer *in vitro* explantes de *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. Por otra parte, el empleo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no sólo puede eliminar la presencia de microorganismos contaminantes, sino también, favorecer la germinación como señalaron Mayo-Mosqueda *et al.* (2017) al obtener mayor porcentaje de germinación (84.59%) en semillas de *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Linden & H. Wendland). Por lo tanto, este resultado puede indicar que con esos desinfectantes se logró disminuir la carga microbiana de los explantes iniciales.

En adición a lo anterior, para el empleo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debe tenerse en cuenta que es una especie reactiva de oxígeno y puede causar daños a las macromoléculas celulares al exceder la capacidad antioxidante celular (Halliwell y Whiteman, 2004). Esto indica que puede ser potencialmente dañino al estar en contacto directo con tejidos vegetales. Por ello, tal vez sólo sea recomendable emplearlo en esta especie como aquí se indica siempre y cuando se trate de semillas cigóticas, donde la testa puede evitar que el embrión sufra daños letales.

En el presente trabajo, ambos métodos fueron favorables y se obtuvo el 100% de semillas de *E. nutans* establecidas *in vitro*. Sin embargo, por el tiempo que dura cada método de desinfección, se recomienda el primero (etanol 70% v/v más hipoclorito de sodio comercial Cloralex diluido al 15% v/v). No obstante, existen otros métodos para lograr el establecimiento de explantes *in vitro* como informan Spinoso-Castillo *et al.* (2017), los cuales, también podrían valorarse para esta u otras especies.

Efecto de la posición de semillas en medio de cultivo

En el medio de cultivo sin nitrato de plata, se constató que la posición de la semilla en el

medio de cultivo influyó en la germinación de *E. nutans* conforme transcurrió el tiempo. Se observó el 26.7% de semillas germinadas a las nueve semanas de cultivo *in vitro*. Sin embargo, cuando se encontró presente el nitrato de plata (3 mg l<sup>-1</sup>) independientemente de la posición de la semilla el porcentaje de germinación se elevó a 70% en la primera semana de cultivo. A partir de la segunda semana se logró el 100% de germinación en dos de las posiciones y el 100% de semillas germinadas a las tres semanas de cultivo *in vitro* en todas las posiciones (Figura 1). Estos resultados sugieren que las semillas de *E. nutans* no necesitan de estratificación o escarificación para germinar de forma similar a lo referido por Zurita-Valencia *et al.* (2014) y Benavides *et al.* (2016) para otras especies. La germinación de las semillas se ve afectada también posiblemente por la presencia de etileno como indicaron Kende (1993), Kumar *et al.* (1998), Santana-Buzzy *et al.* (2005), Santana-Buzzy *et al.* (2006) y Santana-Buzzy *et al.* (2012). De ser así, también los problemas de fenolización o necrosis pueden ser por la presencia de etileno como se observó en este trabajo en las plántulas obtenidas de *E. nutans in vitro* en medio de cultivo sin AgNO<sub>3</sub> (Figura 4 A y B). Estos resultados coincidieron con lo publicado por Franck-Duchenne *et al.* (1998), Steinitz *et al.* (1999) y Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón (2001) para *Capsicum* spp., plantas que producen etileno y son recalcitrantes para el establecimiento *in vitro*. En este contexto, los resultados sugieren que, cuando se presentan problemas de necrosis (oxidación) o tejidos recalcitrantes para su establecimiento *in vitro*, no importan el tipo, combinación y concentración de antioxidantes empleados para prevenir o subsanar dicho inconveniente (Concepción *et al.*, 2005), si no se atiende el problema de la acumulación de etileno *in vitro*. Dicha afirmación se basa en lo ya informado por Taiz y Zeiger (2006) de que el nitrato de plata puede inhibir el efecto de etileno, y en los resultados obtenidos por Ross *et al.* (2017) cuando adicionaron 1 o 2 mg l<sup>-1</sup> de nitrato de plata al medio de cultivo, lo cual, redujo la oxidación y obtuvo un 70% de explantes vivos con yemas axilares desarrollados en brotes.

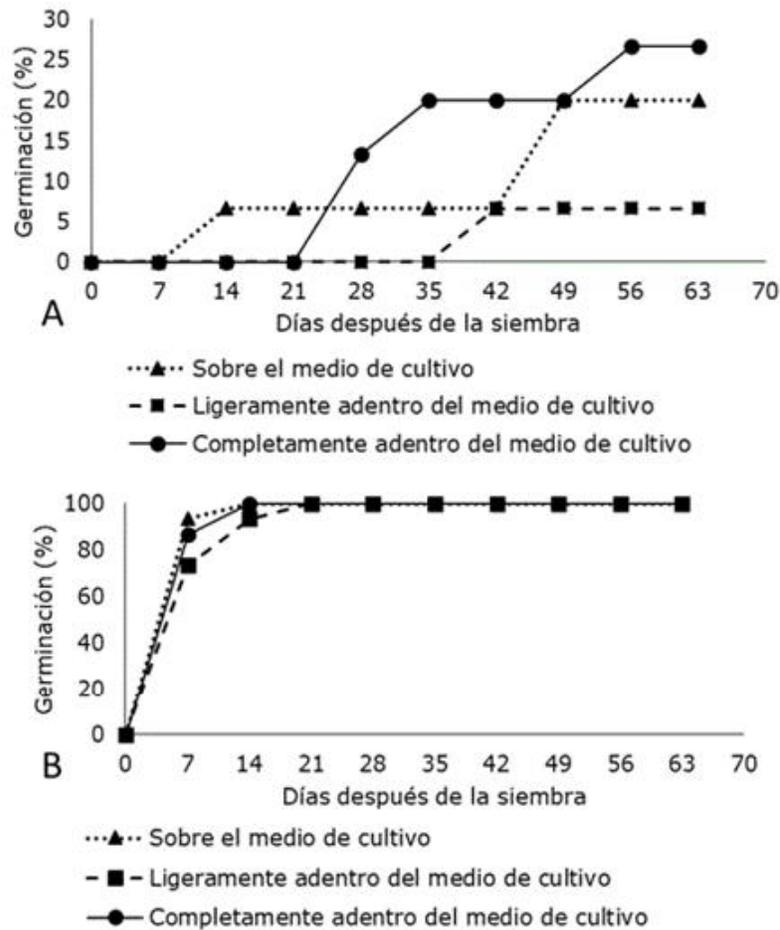


Figura 1. Germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. en diferente posición en el medio de cultivo. A) Medio de cultivo MS al 100% de su concentración sin AgNO<sub>3</sub>. B) Medio de cultivo MS al 100% de su concentración con AgNO<sub>3</sub> (3.0 mg l<sup>-1</sup>). Cada punto representa el porcentaje calculado cada semana de incubación.

#### Efecto de las condiciones de cultivo

En el medio de cultivo MS sin nitrato de plata, los resultados demostraron que en *E. nutans*, la presencia de luz 16/8 h (33.78  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) estimuló la germinación *in vitro* de las semillas (22.8%) con respecto a la condición de obscuridad (5%) (Figura 2 A). Resultados parcialmente similares a lo informado por Sunandakumari *et al.* (2005) en *Euphorbia nivulia* Buch, donde al parecer, la presencia de luz fue un factor importante para estimular la germinación de semillas y la obtención de respuestas morfológicas. No obstante, la respuesta a la germinación de semillas expuestas a luz u obscuridad, puede depender también de la especie y de otro constituyente del medio de cultivo, pues Flores *et al.* (2017)

informaron el 90% de germinación de semillas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en condiciones de obscuridad sin carbón activado, con carbón activado y en obscuridad, la germinación se vio inhibida. En *E. nutans*, el porcentaje de germinación no aumentó a partir de las ocho semanas de cultivo, al contrario, las plántulas obtenidas en ambas condiciones de luz y obscuridad, murieron a las catorce semanas bajo condiciones *in vitro*. Esto parece indicar que, al ser especies silvestres, cuentan con algún mecanismo fisiológico que les permite germinar fácilmente en lugares expuestos.

En este contexto, se está de acuerdo parcialmente con Bello-Bello *et al.* (2017) en la importancia de la presencia de luz para la

obtención de respuestas morfológicas *in vitro*; lo cual, puede deberse a los diferentes espectros que la componen. Aunque no son variables consideradas para *E. nutans*, existen trabajos publicados sobre la importancia de ellos como el espectro de luz azul para estimular la biosíntesis de clorofila, la apertura de estomas, maduración de cloroplastos y la fotosíntesis (Tibbitts *et al.*, 1983), así como el espectro de luz roja para elongar tallo y causar cambios en la anatomía de la planta al incidir en el fitocromo de las células (Schuerger *et al.*, 1997). Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio con *E. nutans*, la germinación y respuestas morfológicas *in vitro* no dependen directamente de la luz u oscuridad, sino de la presencia de  $\text{AgNO}_3$  en el medio de cultivo (Figura 2 B), el cual, puede inhibir el efecto de la posible presencia de etileno (Taiz y Zeiger, 2006).

Efecto de reguladores de crecimiento

El porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *E. nutans*, en medio de cultivo MS al 100% de su concentración, con la incorporación de reguladores de crecimiento vegetal de forma separada y sin  $\text{AgNO}_3$ , mostró dependencia de  $\text{AG}_3$  con un 60% de semillas germinadas seguida de AIA con 33.33%.

Aun cuando  $\text{AG}_3$  favoreció el 13.3% de la germinación a partir de la segunda semana de cultivo *in vitro*, el 60% de germinación correspondió a la novena semana (Figura 3 A). Con base en el mayor porcentaje de germinación obtenido con  $\text{AG}_3$ , estos resultados coinciden con lo publicado por Rambabu *et al.* (2005), quienes también emplearon  $\text{AG}_3$  para promover la germinación de semillas de *Givotia rottleriformis* Griff

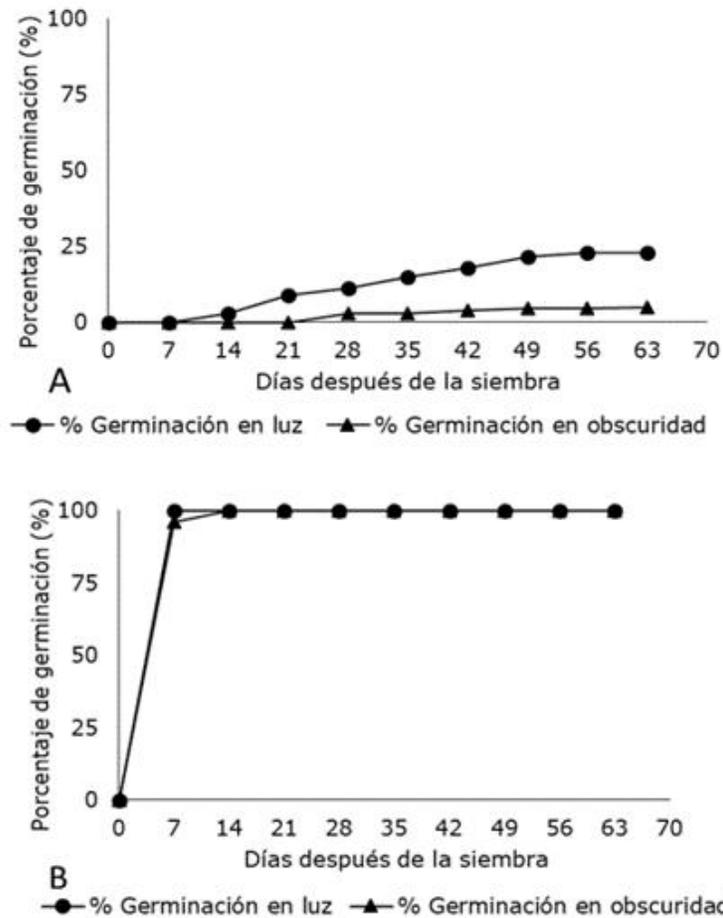


Figura 2. Germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. bajo condiciones de luz y oscuridad. A) Semillas colocadas en medio de cultivo MS al 100% de su concentración sin nitrato de plata. B) Semillas colocadas en medio de cultivo MS al 100% de su concentración con  $\text{AgNO}_3$  ( $3 \text{ mg l}^{-1}$ ). Cada punto representa el porcentaje calculado cada semana de incubación.

(Euphorbiaceae) y alcanzaron 90% de semillas germinadas en comparación con el control con sólo 5%. Aparte, Sri-Rama y Chandrasekhara (2014), emplearon semillas frescas de *Drypetes roxburghii* (Euphorbiaceae) y  $AG_3$  e informaron una germinación de  $83.30 \pm 0.63\%$  removiendo la testa de las semillas cultivadas en un medio de cultivo MS con  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de  $AG_3$  + 0.01% de carbón activado. Igualmente, Fidemann *et al.* (2016) mencionaron el uso de  $AG_3$  para optimizar la germinación de semillas de *Capsicum baccatum* L. pero en concentración más elevada ( $1.88 \text{ mg l}^{-1}$ ) que la empleada en *E. nutans*. Esto sugiere que se realicen otros experimentos con mayores concentraciones de  $AG_3$ . La respuesta de germinación en semillas con  $AG_3$  se debe a su participación efectiva movilizando reservas nutritivas al activar la síntesis de  $\alpha$ -amilasas, enzimas hidrolíticas que van a romper macromoléculas (almidón) y de esta forma pasan al embrión para poder ser utilizadas y así estimular la germinación. Por otra parte, el resultado obtenido con AIA, posiblemente se deba al efecto que tiene este regulador del crecimiento vegetal en la despolimerización de la pared celular y la estimulación radicular, con lo cual, el embrión puede tomar más nutrientes para su activación (Taiz y Zeiger, 2006).

El efecto de BA en la germinación de semillas, tuvo una respuesta similar al tratamiento control. Este resultado difiere de lo informado por Rangel-Estrada *et al.* (2015) al emplear BA para activar la yema axilar y multiplicar brotes *in vitro* de *Euphorbia pulcherrima* y a lo referido por Perales *et al.* (2016), donde BA favoreció la multiplicación de *Psidium guajava* L. Esto sugiere, que BA podría actuar en la activación celular de tejidos diferenciados y no en la germinación de semillas cigóticas de *E. nutans*. Finalmente, los resultados logrados en *E. nutans* coincidieron con Nikam y Barmukh (2009) al obtener el 80.87% y 46% de germinación en semillas de *Santalum album* L. tratadas y no tratadas con  $AG_3$ , respectivamente; y con lo publicado por Pérez-Martínez y Castañeda-Garzón (2017) en semillas de compuestas nativas silvestres, siendo  $AG_3$  el regulador del crecimiento que mejor favoreció el porcentaje de germinación comparado con 6-Bencilaminpurina (BAP) y AIA.

Sin embargo, al igual que en el ensayo anterior la mayor eficiencia y porcentaje de

germinación *in vitro* de semillas de *E. nutans*, dependió directamente de la presencia de  $AgNO_3$  y no de reguladores de crecimiento vegetal en el medio de cultivo (Figura 3 B). Por lo tanto, si en estudios posteriores se comprueba la presencia de etileno y la inhibición de su efecto *in vitro* en *E. nutans* con la aplicación de  $AgNO_3$  como se demostró en chile habanero (*Capsicum annum* L.) por Santana-Buzzy *et al.* (2006), Bello-Bello *et al.* (2010), Yupaporn y Sompong (2012) y Alva y Oropeza (2013), esto puede sugerir que el etileno influye directamente en la biosíntesis o efecto de otros reguladores de crecimiento vegetal en la germinación de semillas de *E. nutans*.

Por otra parte, los datos que corresponden a longitud de plántulas y raíces de semillas de *E. nutans* germinadas en los diferentes tratamientos con  $AgNO_3$ , mostraron diferencia significativa (Tukey,  $p=0.05$ ) con respecto a los tratamientos sin  $AgNO_3$ . Estos resultados estuvieron en correspondencia con los descritos por Santana-Buzzy *et al.* (2006) y Bello-Bello *et al.* (2010) sobre el efecto favorable de  $AgNO_3$  *in vitro* para mitigar daños por efecto de etileno. No obstante, si la presencia de  $AgNO_3$  favorece la longitud de plantas y de raíz en *E. nutans in vitro*, en este trabajo se muestra que esas respuestas morfogénicas van a depender del tipo de regulador de crecimiento empleado, y posiblemente de la concentración y combinación de éstos en el medio de cultivo (Tabla 1).

Así mismo, se observó deformación de raíces y gravitropismo negativo durante la emergencia de plántulas en los tratamientos sin  $AgNO_3$ . Estos resultados fueron similares a los informados por Rambabu *et al.* (2006) en plántulas de *Givotia rottleriformis* obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro*, las cuales presentaron ciertas anomalías. En *E. nutans*, no se observó la formación de callo en ninguno de los tratamientos ni en cualquiera de las condiciones estudiadas para obtener plantas a partir de semillas germinadas *in vitro*. Sin embargo, las plántulas obtenidas en todos los tratamientos sin  $AgNO_3$  presentaron coloración púrpura y características parecidas a la triple respuesta a la presencia de etileno tales como hipocótilos y raíces cortas, curvatura de la plúmula e hipocótilos engrosados (Taiz y Zeiger, 2006) (Figura 4).

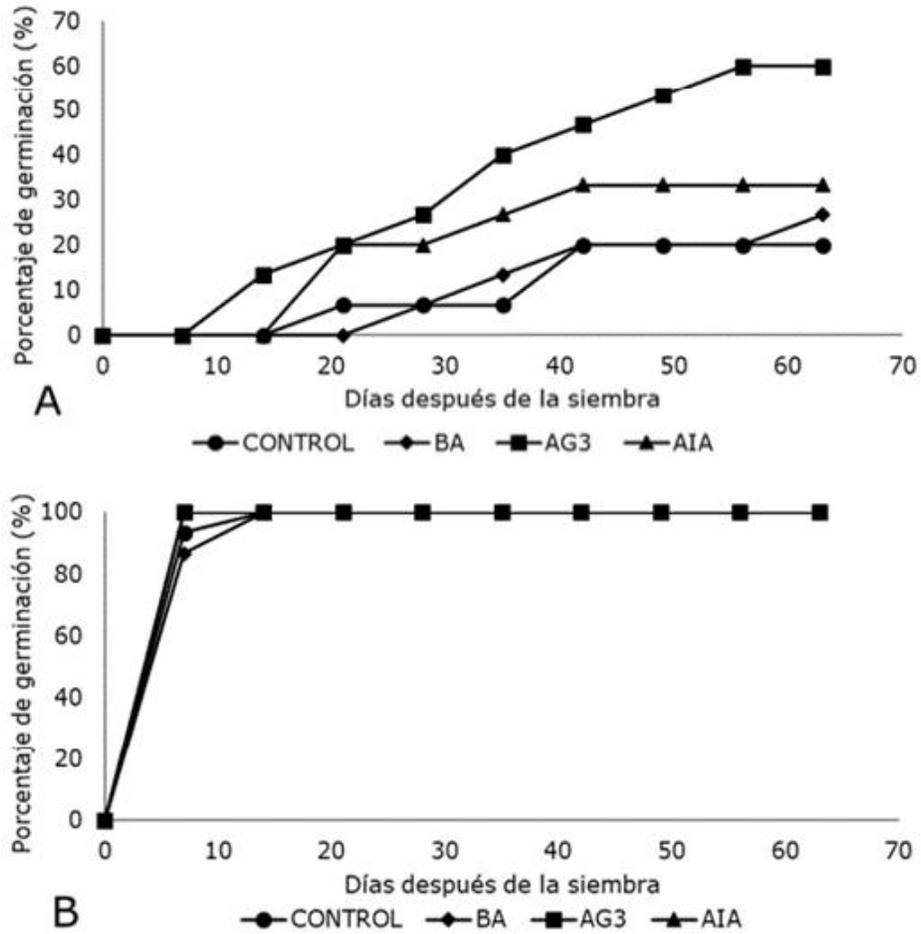


Figura 3. Efecto de tres reguladores de crecimiento vegetal ( $1\text{ mg l}^{-1}$ ) en la germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. A) Tratamientos sin  $AgNO_3$  B) Tratamiento con  $AgNO_3$  ( $3\text{ mg l}^{-1}$ ).

Tabla 1. Longitud de plántulas y raíz obtenidas de la germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. con y sin  $AgNO_3$ .

Tratamiento	Media aritmética	
	Longitud de plántula (cm)	Longitud de raíces (cm)
AIA con $AgNO_3$	$9.46 \pm 0.37$ a	$6.28 \pm 1.16$ ab
AG <sub>3</sub> con $AgNO_3$	$9.31 \pm 0.41$ a	$4.11 \pm 1.46$ c
Control con $AgNO_3$	$8.97 \pm 0.53$ ab	$6.81 \pm 0.91$ a
BA con $AgNO_3$	$8.26 \pm 0.75$ b	$5.11 \pm 1.00$ bc
AG <sub>3</sub> sin $AgNO_3$	$1.26 \pm 0.72$ c	$0.42 \pm 0.25$ d
AIA sin $AgNO_3$	$0.95 \pm 0.86$ cd	$0.29 \pm 0.27$ d
BA sin $AgNO_3$	$0.46 \pm 0.61$ cd	$0.29 \pm 0.68$ d
Control sin $AgNO_3$	$0.38 \pm 0.61$ d	$0.12 \pm 0.19$ d

Valores en cada variable que tienen la misma letra, no son significativamente diferentes (Tukey,  $p = 0.05$ )

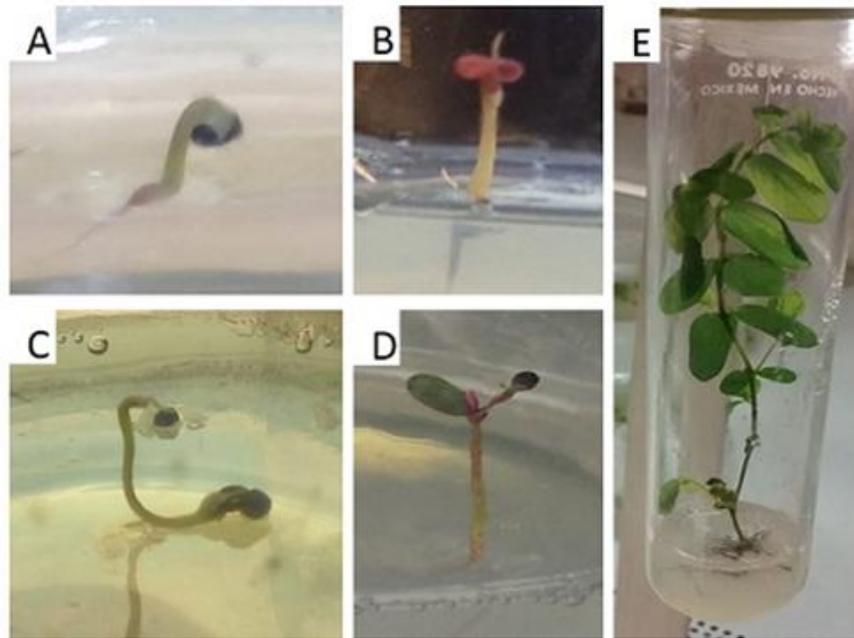


Figura 4. Plántulas de *Euphorbia nutans* Lag. a partir de semillas germinadas *in vitro*. A y B) Plántulas con posible triple respuesta a etileno C) Plántula con gravitropismo negativo D) Plántula emergida a los 5 días de cultivo con  $\text{AgNO}_3$ , E) Plántula obtenida en medio de cultivo con  $\text{AgNO}_3$  a las tres semanas *in vitro*.

#### CONCLUSIONES

Los protocolos de desinfección con el empleo de etanol 70% (v/v) e hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) diluido al 15% (v/v) y peróxido de hidrógeno permiten el establecimiento *in vitro* de semillas de *E. nutans* y evitan la presencia de contaminantes microbianos en el medio de cultivo. Además, la adición de  $\text{AgNO}_3$  ( $3 \text{ mg l}^{-1}$ ) al medio de cultivo favorece la germinación *in vitro* de semillas a partir de la primera semana de cultivo y su combinación con AIA la longitud de las plántulas y de la raíz. Estos resultados sirven de base para la propagación *in vitro* de *E. nutans*.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT por financiar los estudios de postgrado de Daniel Aguilar Jiménez, primer autor; a la M. en C. Ernestina Cedillo Portugal, Profesora-investigadora del Departamento de Preparatoria Agrícola, Herbario Jorge Espinosa Salas de la Universidad Autónoma Chapingo, y al Dr. Víctor W. Steinmann, Botánico-investigador en el Instituto de Ecología del Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán por contribuir en la

identificación de la especie. Los financistas no tuvieron participación en el diseño del estudio, la colecta y análisis de los datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

#### Conflicto de interés

Los autores declararon no tener ningún conflicto de interés con respecto a la investigación, autoría y/o publicación de este artículo.

#### Contribución de los autores

Conceptualización DAJ, Conservación de datos DAJ, Análisis formal DAJ, Adquisición de fondos JLRO, Investigación DAJ y JLRO, Metodología DAJ y JLRO, Administración del proyecto DAJ y JLRO, Recursos JLRO, Supervisión JLRO, Validación DAJ y JLRO, Visualización DAJ, Escritura – primera redacción DAJ, Escritura – revisión y edición DAJ y JLRO.

#### REFERENCIAS

Aguilar-Jiménez D, Rodríguez-De-la-O JL, Piña-Guillén J, Silva-Díaz V (2019) *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* and preliminary analysis of steviosides. Rev Mex Cienc Agríc 10(1): 197-204; doi: 10.29312/remexca.v10i1.1543

- Alva TS, Oropeza M (2013) Effect of culture medium consistence and silver nitrate on micropropagation of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. Revista Colombiana de Biotecnología 15(2): 55-62
- Asma N, Kashif A, Saifullah K (2008) *In vitro* propagation of *Croton* (*Codiaeum variegatum*). Pakistan Journal of Botany 40(1): 99-104
- Bello-Bello JJ, Canto-Flick, A, Balam-Uc E, Gómez-Uc E, L-Robert M, Iglesias-Andreu LG, Santana-Buzzy N (2010) Improvement of *in vitro* proliferation and elongation of habanero pepper shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by temporary immersion. Hortscience 45(7): 1093-1098; doi: 10.21273/HORTSCI.45.7.1093
- Bello-Bello JJ, Pérez-Sato JA, Cruz-Cruz CA, Martínez-Estrada E (2017) Light-Emitting Diodes: Progress in Plant Micropropagation. En: Jacob-Lopes E (ed). Chlorophyll, pp. 93-104. IntechOpen, Rijeka; doi: 10.5772/67913
- Benavides T, Córdova A, Vaca I (2016) Propagación *in vitro* de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth. para la obtención de plantas completas. LA GRANJA: Revista de Ciencias de la Vida 24(2): 150-158; doi: 10.17163/lgr.n24.2016.12
- Bidarigh S, Azarpour E (2013) Effect of BA and GA<sub>3</sub> application on poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) under *in-vitro* conditions. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 5(10): 1053-1057
- Concepción O, Nápoles L, Pérez A, Peralta N, Hernández M, Trujillo R (2005) Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.) relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. Cultivos tropicales 26(1): 33-39
- Fidemann T, Nascimento LB, Moraes MC, Bertão MR, Fernández-Núñez EG (2016) Optimizing *in vitro* germination of *Capsicum baccatum* L. seeds through a multifactorial experimental design. American International Journal of Biology 4(2): 1-22; doi: 10.15640/aijb.v4n2a1
- Flores CO, Cuéllar ZJF, Montes de Godoy ME, Gámez PMR, González AMT, Guevara VM, Aguilar RN (2017) Germinación *in vitro* de semillas de *Vanilla planifolia* Jacks y comparación de métodos de micropropagación. Avances en Investigación Agropecuaria 21(2): 69-83
- Franck-Duchenne M, Wang Y, Ben TS, Beachy RN (1998) *In vitro* stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53: 79-84
- Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? British Journal of Pharmacology 142: 231-255
- Hurtado MDV, Merino MME (2000) Cultivo de Tejidos Vegetales 5ª reimpression. Trillas SA de CV, México DF; ISBN: 968-24-2159-4
- Kamatham S, Rajesh Y, Padmaja G (2012) Temperature pre-treatment of seeds for overcoming the zygotic embryo dormancy of *Givotia rottleriformis* Griff. under *in vitro* conditions. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology 6(1): 19-23
- Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol 44: 283-307; doi: 10.1146/annurev.pp.44.060193.001435
- Kondamudi R, Sri-Rma MK, Pullaiah T (2009) Euphorbiaceae - a critical review on plant tissue culture. Tropical and Subtropical Agroecosystems 10(3): 313-335
- Kumar PP, Lakshmanan P, Thorpe TA (1998) Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro* Cell Dev Biol Plant 34: 94-103
- Magangana TP, Stander MA, Makunga NP (2018) Effect of nitrogen and phosphate on *in vitro* growth and metabolite profiles of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae). Plant Cell Tissue Organ Culture 134(1): 141-151
- Martínez MD, Alvarado FR, Mendoza CM, Basurto PF (2006) Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México. Bol Soc Bot Méx 79: 79-87
- Martínez-Moreno D, Valdéz-Eleuterio G, Basurto-Peña F, Andrés-Hernández AR, Rodríguez-Ramírez T, Figueroa-Castillo A (2016) Plantas medicinales de los mercados

- de Izúcar de Matamoros y Acatlán de Osorio, Puebla. Polibotánica 41: 153-178; doi: 10.18387/polibotanica.41.10
- Mayo-Mosqueda A, Espinosa-Moreno J, Centurión-Hidalgo D, Cazares-Camero JG (2017) Estrategias para mejorar la germinación de semillas de *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Linden & H. Wendland). Polibotánica 43: 1-10
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497; doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nikam TD, Barmukh RB (2009) GA<sub>3</sub> enhances *in vitro* seed germination in *Santalum album*. *Seed Sci & Technol* 37: 276-280; doi: 10.15258/sst.2009.37.2.02
- Ocegueda S, Moreno E, Koleff P (2005) Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica CONABIO. *Biodiversitas* 62: 12-15
- Ochoa-Alejo N, Ramírez-Malagón R (2001) *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 37: 701-729; doi: 10.1007/s11627-001-0121-z
- Perales AL, Silos EH, Lorenzo VL, Perales SC, Flores BS (2016) Propagación *in vitro* de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de segmentos nodales. *Rev Mex Cienc Agríc* 7(2): 375-386
- Pérez-Martínez BA, Castañeda-Garzón SL (2017) Establecimiento *in vitro* de compuestas nativas silvestres a partir del cultivo de semillas. *Foresta Veracruzana* 19(2): 1-10
- Pierik RLM (1990) Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid; ISBN: 10:8471142678
- Rambabu M, Ujjwala D, Ugandhar T, Praveen M, Upender M, Swamy NR (2005) Effect of GA<sub>3</sub> on enhancement of *in vivo* seed germination in *Givotia rottleriformis* (Euphorbiaceae) an endangered forest tree. *Indian Forestry* 131(1): 25-30
- Rambabu M, Upender DU, Ugandhar T, Praveen M, Rama SN (2006) *In vitro* zygotic embryo culture of an endangered forest tree *Givotia rottleriformis* and factors affecting its germination and seedling growth. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 418-421; doi: 10.1079/IVP2006804
- Rangel-Estrada SE, Canul-Ku J, Osuna-Canizalez FJ, García-Perez F, Rosario-Montes P, Vences-Hernández ASB, Hernández-Meneses E (2015) Regeneración *in vitro* de híbridos de nochebuena vía organogénesis. *Rev Mex Cienc Agríc* 6(7): 1571-1585
- Ross S, Arriaga ME, Pechi E (2017) Establecimiento *in vitro* de Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) nativa de Uruguay. *Agrociencia Uruguay* 21(1): 15-23
- Rzedowski GC, Rzedowski J (2001) Flora fanerogámica del Valle de México 2a ed. Instituto de Ecología, AC y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán)
- Santana-Buzzy N, Bello-Bello JJ, Iglesias-Andreu L, Zúñiga-Aguilar JJ, Canto-Flick A, Avilés-Viñas SA, Lecona-Guzmán CA, Solís-Marroquín D, Gómez-Uc E, Balam-Uc E, Arcos-Ortega GF, Mijangos-Cortés JO (2012) Tissue culture of *Capsicum* species. En: Russo VM (ed). *Peppers: Botany, Production and Uses*, pp. 72-86. CAB International, Wallingford; doi: 10.1079/9781845937676.0072
- Santana-Buzzy N, Canto-Flick A, Barahona-Pérez F, Montalvo-Peniche MC, Zapata-Castillo PY, Solís-Ruiz A, Zaldívar-Collí A, Gutiérrez-Alonso O, Miranda-Ham ML (2005) Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience* 40(6): 1829-1831; doi: 10.21273/HORTSCI.40.6.1829
- Santana-Buzzy N, Canto-Flick A, Iglesias-Andreu LG, Montalvo-Peniche MC, López-Puc G, Barahona-Pérez F (2006) Improvement of *in vitro* culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience* 4(2): 405-409; doi: 10.21273/HORTSCI.41.2.405
- Schuerger AC, Brown CS, Stryjewski EC (1997) Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) grown under red light emitting diodes supplemented with blue or far red light. *Annals of Botany* 79(3): 273-282; doi: 10.1006/anbo.1996.0341

- Spinoso-Castillo JL, Chavez-Santoscoy RA, Bogdanchikova N, Pérez-Sato JA, Morales-Ramos V, Bello-Bello JJ (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 129(2): 195-207; doi: 10.1007/s11240-017-1169-8
- Sri-Rama MK, Chandrasekhara RM (2014) Micropropagation and conservation strategies of the potentially medicinal and economically important tropical deciduous tree - *Drypetes roxburghii* (Wall.) Hurursawa. *Journal of Medicinal Plant Research* 8(24): 870-880; doi: 10.5897/JMPR2014.5394
- Steinitz B, Wolf D, Matzevitch-Josef T, Zelcer A (1999) Regeneration *in vitro* and genetic transformation of pepper (*Capsicum* spp.). The current state of the art. *Capsicum and Eggplant Plant Newsletter* 18: 9-15
- Sunandakumari C, Zhang CL, Martin KP, Slater A, Madhusoodanan PV (2005) Effect of auxins on indirect *in vitro* morphogenesis and expression of *gusA* transgene in a lectinaceous medicinal plant, *Euphorbia nivulia* Buch.-Ham. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 41(5): 695-699; doi: 10.1079/IVP2005651
- Tagelsir I, El-Fatih M, Abdelghaffar E (2006) Enhancement or growth and control of browning of tissue cultures of guava (*Psidium guajava* L.). *Sudan J SC TECH* 7(1): 1-10
- Taiz L, Zeiger E (2006) Fisiología Vegetal Volumen 2. Publicacions de la Universitat Jaume 1, Los Angeles California; ISBN: 978-84-8021-601-2
- Tibbitts TW, Morgan DC, Warrington IJ (1983) Growth of lettuce, spinach, mustard, and wheat plants under four combinations of high pressure sodium, metal halide, and tungsten halogen lamps at equal PPFD. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108(4): 622–630
- Yupaporn S, Sompong Te-chato (2012) The effect of peptone and silver nitrate on *in vitro* shoot formation in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. *Journal of Agricultural Technology* 8(4): 1509-1516
- Zurita-Valencia W, Gómez-Cruz JE, Atrián-Mendoza E, Hernández-García A, Granados-García ME, García-Magaña JJ, Salgado-Garciglia R, Sánchez-Vargas NM (2014) Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (Tiliaceae). *Polibotánica* 38: 129-134

Recibido: 17-10-2020

Aceptado: 19-11-2020

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.