

Micropropagación *in vitro* de jabín (*Piscidia piscipula*) mediante semillas y esquejes

Orlando J. Martínez-Canto¹, Elma M. Dzul Martín¹, Julián Pech Pool¹, Alondra I. Alvarado Soberanis¹, Suemy T. Echeverría Echeverría¹, Juan Carlos Alamilla Magaña² y José H. Caamal Velázquez^{2*}

¹ Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 13, Prolongación Calle 50 Ex-Hacienda X'atkuil, C.P. 97139, Mérida, Yucatán, México

² Colegio de Posgraduados Campus Campeche, Km 17.5 carretera Haltunchen-Edzná, 24450 Champotón, Campeche, México
hcaamal@colpos.mx

Resumen

Dentro de la gran variedad de vegetación que conforma la península de Yucatán sobresale el jabín (*Piscidia piscipula*) perteneciente a la familia de las *Fabaceae*, que destaca por su importancia socioecológica y económica en la cultura maya, ya que florece en las épocas de mayor sequía en la región lo que es aprovechado en la apicultura para la elaboración de miel de gran demanda. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología aplicable a las semillas y esquejes de *P. piscipula*, donde se logre la desinfección y germinación de plántulas de esta especie, en condiciones *in vitro*. Tanto semillas como esquejes se obtuvieron de la misma región y en el mismo período de tiempo. Para el protocolo aplicado a la desinfección de semillas de *P. piscipula*, se logró una desinfección del 61% del total de muestras, mientras que el 30% presentó contaminación por hongos, y el 9% por bacterias; del total de semillas no infectadas, el 34% logró germinar hasta llegar a la etapa de plántulas a los cinco días de sembradas, esto en frascos de cultivo con medio Murashigue & Skoog adicionado con nutrientes, bajo condiciones controladas en un cuarto de cultivo fotoperiódico. Del total de semillas evaluadas solamente lograron germinar aquellas con una coloración más oscura, o bien, semillas maduras, mientras que las semillas con una coloración más tenue, no germinaron. El protocolo utilizado para la desinfección de esquejes de *P. piscipula* no arrojó resultados positivos, ya que el 100% de las muestras presentó contaminación por hongos a los tres días de sembrado.

Palabras clave— desinfección, melífera, germinación, plántulas.

Abstract

Among the great variety of vegetation that conforms the Yucatan Peninsula, the jabin (*Piscidia piscipula*), which belongs to the *Fabaceae* family, stands out for its socioecological and economic importance in the Mayan culture, since it blooms in the times of greatest drought in the region, which is used in beekeeping for the production of honey that is in great demand. The objective of this work was to develop a methodology applicable to seeds and cuttings of *P. piscipula*, where the disinfection and germination of seedlings of this species are achieved, under *in vitro* conditions. Both, seeds and cuttings, were obtained from the same region and at the same time. For the protocol applied to the disinfection of *P. piscipula* seeds, 61% of the total samples were disinfected, while 30% were contaminated by fungi and 9% by bacteria; of the total number of non-infected seeds, 34% germinated to the seedling stage five days after sowing, in culture flasks with Murashigue and Skoog medium added with nutrients, under controlled conditions in a photoperiodic culture room. Of the total seeds evaluated, only those with a dark (black) coloration, or mature seeds, germinated, while seeds with a fainter coloration did not germinate. The protocol used for the disinfection of *P. piscipula* cuttings did not yield positive results, since 100% of the samples showed fungal contamination three days after sowing.

Keywords— disinfection, melliferous, germination, seedlings.

I. INTRODUCCIÓN

La diversidad de especies que conforman la selva baja caducifolia en la península de Yucatán está influenciada por diversos factores bióticos y abióticos, tales como el clima, el tipo de suelo, la topografía de la región, las precipitaciones anuales, así como la estacionalidad y las limitaciones en la dispersión de las semillas, resultando factores claves en la distribución de la riqueza arbórea [1]. Dentro de toda esta vegetación destacan, por su importancia económica y biológica, las especies de la familia *Fabaceae*, predominantes en las zonas boscosas, secas y tropicales de la región del sureste de México [2]. Dentro de este grupo de fabáceas sobresale el jabín, o ha'abin en lengua maya, (*Piscidia piscipula*) considerada una especie de alto valor ecológico y multipropósito debido a su codominancia y abundancia en las selvas de la península de

Yucatán. Este árbol puede medir hasta 20 m de altura por 50 cm de diámetro, presenta brotes de hojas de forma alternada y compuestas, flores blancas en los meses secos de marzo y abril, y frutos en forma de vainas fuertemente aladas que no llegan a abrir [3]. Se utiliza en los sistemas silvopastoriles y tradicionales, como forraje en el ganado ovino y caprino por su alto contenido en proteína cruda y debido a que su follaje se mantiene verde en épocas de sequía. Como especie maderable se usa en la elaboración de postes y soportes de construcciones, en la obtención de leña y carbón. También se usa en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos, y en ceremonias mágico-religiosas [4], [5]. Otra de las cualidades que distingue a *P. piscipula* es que es considerada como una importante especie melífera y polínifera dentro de la diversa vegetación que cubre la Península de Yucatán, catalogada como la región de mayor producción de miel anual en México,

aportando el 35% de la producción nacional, y logrando una calidad de exportación internacional hacia Alemania, Bélgica, Estados Unidos, Reino Unido y Arabia Saudita, entre otros países, logrando que la apicultura se convierta en una actividad rentable [6]. La producción de miel en la región que conforman Yucatán y Campeche tiene un origen multifloral; sin embargo, se puede obtener miel de especies específicas consideradas como el sostén de la apicultura maya, como *P. piscipula*, *Gymnopodium floribundum* (ts'its'ilche' en maya) o *Viguiera dentata* (taj o tajonal en maya) [7]. Por la época de floración de *P. piscipula*, que se desarrolla en los meses más secos (abril y mayo) y las propiedades de la especie, la miel que se obtiene de su florescencia posee un color característico que va de ámbar ligero a ámbar oscuro, de 49 a 87 mm Pfund (unidades de colorimetría utilizadas para determinar el color de la miel), una textura líquida-sólida, cristalización lenta, con un contenido de humedad bajo debido a la sequía de la época, un olor caramelizado, así como un sabor dulce, con ligeras notas ácidas y picantes; en general se le considera una miel fuerte, lo que genera un aumento en su demanda y en su precio [8].

En trabajos previos con *P. piscipula* la evidencia indica que se pueden aplicar diversos tratamientos pre-germinativos para inhibir el mecanismo de dormancia y acelerar la germinación, esto es mediante el tratamiento con ácido sulfúrico y agua hirviendo para lograr la escarificación de las semillas, choques térmicos, uso de fitohormonas y variación de temperaturas [2]; sin embargo, no existe información sobre la obtención, *in vitro*, de plántulas de *P. piscipula*, en un ambiente controlado de laboratorio, así como un adecuado seguimiento de su desarrollo hasta lograr su adaptación en vivero. Por todo esto, el objetivo del presente estudio fue aportar conocimientos básicos, aplicables, sobre la micropropagación del jabin, desde las etapas de semillas o esquejes, hasta lograr la fase de plántula.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Área de estudio.

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de biotecnología del Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 13 (CBTA 13), localizado en la población de X'matkuil (20°51'41"N 89°37'28"O), subcomisaría del municipio de Mérida, a 10 km de esta capital, en el estado de Yucatán, dentro de la Zona Sujeta a Conservación Ecológica Reserva Cuxtal. Dicha localidad tiene una altura de 10 m sobre el nivel del mar, y predomina el clima tropical de sabana, con presencia de calor todos los meses, con una temperatura media anual de 32 °C, precipitación media anual de 449 mm y humedad media de 71 % [9].

B. Colecta de muestras vegetales.

Tanto las semillas, como los esquejes de *P. piscipula*, fueron obtenidos de las inmediaciones del CBTA 13. Se recolectaron semillas jóvenes y maduras, diferenciadas por la coloración (claras y oscuras, respectivamente), durante el mes de mayo; por otro lado, los cortes de esquejes se tomaron de un árbol adulto y se realizaron por la mañana para evitar la

deshidratación de las muestras, en el mismo centro de estudio durante el mismo periodo de colecta de semillas.

C. Desinfección de muestras.

Para la desinfección de semillas, se siguió la metodología propuesta por [10], con algunas modificaciones, donde se seleccionaron según la talla y el color, y fueron sometidas a un sistema de desinfección superficial realizado en una campana de flujo laminar. Primeramente, se lavaron con agua de grifo durante 5 min y se mantuvieron sumergidas en hipoclorito de sodio (NaClO) al 20%, y posteriormente al 30%, durante 20 min cada uno. Posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y se sembraron un total de 50 semillas, entre jóvenes y maduras; cinco semillas en cada frasco de vidrio de 7 cm de altura, con un diámetro de boca de 5.2 cm, base de cultivo de 6 cm y un volumen total de 60 ml. Cada frasco con medio basal de cultivo Murashige y Skoog (MS) [11], adicionado con 30 g/L de sacarosa y 2.5 g/L de phytagel, con un pH de 5.7; todo previamente esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min. Finalmente, las muestras se colocaron en un cuarto en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad, a una temperatura constante de 24 °C ± 2 °C.

En la desinfección de esquejes se trabajó con el protocolo propuesto por [12], con algunas modificaciones. Una vez recolectadas las muestras se sumergieron en fungicida (Clorotalonil) 1 ml/L por 10 min, seguidamente se remojaron en solución jabonosa al 1% durante 5 min, y con hipoclorito de sodio (NaClO) al 20%, y posteriormente al 30%, durante 20 min en cada solución. Finalmente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, todo esto dentro de una campana de flujo laminar. Fueron colocadas cinco muestras en cada frasco con las mismas características del procedimiento anterior, así como el medio de cultivo con los mismos nutrientes, para un total de 20 esquejes. Finalmente, los frascos fueron colocados en un cuarto con fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad, a una temperatura constante de 24 °C ± 2 °C.

D. Análisis de los resultados.

Un total de 50 semillas fueron evaluadas en este trabajo, entre jóvenes y adultas, así como 20 esquejes de jabin. Con los datos arrojados por las variables de respuesta se realizó un análisis, a través de Excel, donde se determinó el porcentaje de cada muestra germinada, así como de muestras contaminadas por bacterias u hongos.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de 50 semillas sembradas para la germinación *in vitro* de *P. piscipula* el 61% de muestras estuvo libre de contaminación (Fig. 2A), de las cuales 34% del total de muestras logró germinar a los 5 días posteriores a la plantación (Fig. 2B). El 30% presentó una contaminación por hongos (Fig. 2C), mientras que el 9% restante evidenció una contaminación causada por bacterias (Fig. 2D) (Tabla 1). Se observó que las semillas que lograron la germinación corresponden a una coloración más oscura o semillas adultas (Fig. 2E), mientras que las semillas con una coloración más clara, o semillas jóvenes, no lograron germinar (Fig. 2E); lo cual, podría deberse

a que las semillas adultas encuentran las condiciones apropiadas en el medio de cultivo para lograr desarrollarse como un nuevo individuo. Uno de los grandes problemas de la micropropagación es la contaminación microbiana de vegetales, donde las bacterias, hongos y levaduras, se originan de dos formas, ya sea colonizando la superficie o el interior del explante (endófitos), o bien, al ser introducidos durante el trabajo manual del laboratorio [13]. Los protocolos de desinfección no siempre son capaces de eliminar totalmente los microorganismos presentes en los tejidos de las plantas, algunos tienen la capacidad de permanecer dentro de espacios intra o intercelulares, o en estructuras conductoras, quedando protegidos de los agentes químicos [14]. Es posible detectar la presencia de microorganismos desde la fase *in vitro*, principalmente si la planta donante es extraída directamente del campo y ha estado expuesta a enfermedades, plagas, polvo y otros agentes contaminantes sin ningún tipo de control [15]. [16] determinaron el porcentaje de asepsia en semillas de *Hieronima alchorneoides* al someterlas a diferentes concentraciones de NaClO, indicando que durante 20 min al 5,5% del compuesto químico se lograba un 38% de desinfección, mientras que si se incubaban por 30 min este porcentaje aumentaba hasta 61%, resultados que coinciden con lo aquí reportado, así mismo señalan que la contaminación observada fue principalmente bacteriana, y; que si se inducía la escarificación de las semillas con ácido sulfúrico concentrado durante 10 min, previa a la desinfección de 30 min se lograba un 100% de embriones establecidos, posiblemente debido al reblandecimiento del epidermo de la semilla. [17] evaluaron la capacidad de germinación *in vitro* del cirimo (*Tilia mexicana*) al desinfectar las semillas con lavados de agua y detergente, y lograr la escarificación mediante temperatura y ácido clorhídrico (HCl) previo al cultivo en medio MS, reportando mejores resultados al tratar las semillas con HCl durante 5 min con un porcentaje de germinación del 74%, mientras que con la temperatura el mejor resultado fue del 22%. De igual manera, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados por [2] que evaluaron diferentes tratamientos aplicados a semillas de jabín. Encontrando que la mejor técnica para estimular la germinación fue mantener las semillas sumergidas en agua a 100 °C durante tres minutos, con lo que se logró 55% de la emergencia de las plántulas.

En la metodología probada para la desinfección y micropropagación por esquejes de *P. piscipula* no se observaron buenos resultados ya que el 100% de las muestras resultó con hongos a los tres días de sembrado en medio MS (Tabla 1; Fig. 2F). Los resultados aquí registrados coinciden con lo reportado por [18], donde la desinfección de ápices de papa con NaClO al 2% durante 15 min previamente, además de ser sumergidos en etanol al 70% durante 5 min, fue suficiente para prevenir la contaminación, pues el 100% de los ápices tratados se contaminó por hongos. No obstante, debido a la evidencia reportada en trabajos previos, las metodologías que involucran al NaClO siguen siendo las más aplicadas para la desinfección, siendo necesario la experimentación en cuanto a concentraciones, dependiendo del modelo de estudio, para lograr mejores resultados.

TABLA 1.
MICROPOPAGACIÓN *in vitro* DE *P. piscipula*

Muestra	Infección por hongos	Infección por bacterias	No Germinación	
			infectadas	%
Semillas	30	9	61	34
Esquejes	100	0	0	0

Porcentaje de germinación de semillas y esquejes, por medio *in vitro*; así como la contaminación causada por hongo y bacterias, en las diferentes muestras.

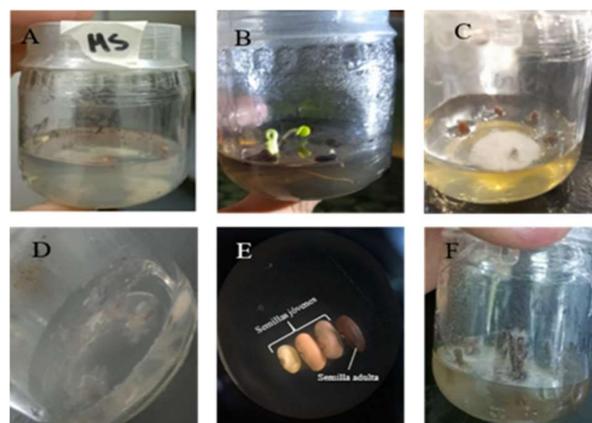


Fig. 2. Proceso de desinfección y germinación de semillas de *P. Piscipula*. A) Semillas sin contaminación, B) germinación de semillas adultas, C) contaminación de semillas por hongos, D) contaminación de semillas por bacterias, E) semillas jóvenes y adultas, F) contaminación de esquejes por hongos.

IV. CONCLUSIÓN

La metodología establecida en este trabajo para la desinfección de semillas de *P. piscipula* resultó alentadora, ya que inhibió la infección ocasionada por bacterias u hongos en más de la mitad de las muestras, siempre y cuando las semillas se encuentren con una coloración característica y en su etapa adulta; sin embargo, solamente se logró la germinación de menos de la mitad del total de muestras sembradas; lo que nos sugiere que este protocolo es una opción para la desinfección de la semilla de *P. piscipula*, pero se debe seguir trabajando para aumentar y garantizar el número de germinaciones posibles. En lo que respecta a la micropropagación por esquejes, el total de las muestras presentó contaminación por hongos, y por consiguiente no se logró el desarrollo de brotes a partir de segmentos del tallo, por lo que la metodología sugerida en este estudio no es la correcta. En la literatura primaria se carece de información confiable y rigurosa sobre el cultivo *in vitro* de *P. piscipula*, por lo que la producción de nuevo contenido básico, con fundamento técnico y científico, es necesaria para la generación de nuevos conocimientos sobre la reproducción de esta especie.

REFERENCIAS

[1] B. Dzib-Castillo, C. Chanatásig-Vaca y N. González- Valdivia. "Estructura y composición en dos comunidades arbóreas de la selva baja caducifolia y mediana subcaducifolia en Campeche, México", Revista

- Mexicana de Biodiversidad, 85, 2014, pp: 167-178, 2014, DOI: 10.7550/rmb.38706
- [2] N. González-Valdivia, B. Dzib-Castillo, J. Carballo-Hernández. “Emergencia y crecimiento de plántulas de *Piscidia piscipula* (L.) en condiciones de vivero”, Acta Universitaria, Multidisciplinary Scientific Journal, Vol 30, 2020, <https://doi.org/10.15174/au.2020.2595>
- [3] J. C. Trejo-Torres, W. J. Hayden, R. M. Pasos-Enríquez, L. A. Carvajal-Mejía, J. M. Callaghan. “Difusión ambiental de la Reserva Biocultural Estatal Puuc”, Catálogo de la flora de Kaxil Kiuic, Kaxil Kiuic A.C. & Programa de Pequeñas Donaciones – FMAM-México-PNUD, 2014, pp: 28, http://kaxilkiuic.org.mx/wp-content/uploads/2020/07/Catalogo_de_la_Flora_deKaxil_Kiuic_Trejo-et-al_FINAL_reducido_compressed.pdf
- [4] P. G. González, J. Ventura, G. S. Castañeda, G. I. Ortíz, J. F. Torres, C. A. Sandoval. “Uso y preservación del recurso del monte de la selva baja caducifolia de la península de Yucatán”, Universidad de Colima, México, pp: 40, 2019, ISBN: 978-607-8549-54-2
- [5] J. C. Cuevas, M. Aquino, R. de la C. Kú, I. J. Morales. “Ecuaciones alométricas aditivas para estimar biomasa aérea y concentración de carbono de *Piscidia piscipula* (L.) Sarg”, Madera y Bosques, Vol. 8, 2022, doi: 10.21829/myb.2022.2832356
- [6] Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). “Panorama Agroalimentario 2020”. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), México, 2020, <https://sursureste.org.mx/wp-content/uploads/2022/08/Miel-Panorama-Agroalimentario-2022>.
- [7] C. Canché-Collí, L. N. López, R. Rodríguez, A. Canto. “El jabín y los secretos de su néctar”, Ecofronteras, Vol. 26, 2022, pp: 2-5, E-ISSN 2448-8577.
- [8] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). “Plan rector para promover una denominación de origen de mieles de la Península de Yucatan”, Agencia Española de Cooperación Internacional para el desarrollo, México, 2011, <https://atlasnacionaldelasabejasmx.github>
- [9] Enlaces y Comunicaciones del Sureste. “Cuxtal Ecological Reserve”. The Matrix. Archivado desde el original el 3 de marzo de 2016. Consultado el 3 de agosto de 2023. <https://web.archive.org/web/20160303230526/http://thematrix.sureste.com/cityview/merida2/tours/cuxtal1.htm>
- [10] D. A. Pérez-Martínez, S. A. Castañeda-Garzón. “Establecimiento in vitro de compuestas nativas silvestres a partir del cultivo de semillas”, Foresta Veracruzana 19, No. 2, 2017, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=497536560>
- [11] T. Murashige & F. Skoog. “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”, Physiology Plantarum, 15: 473-497, 1962, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- [12] J. C. Bedoya-Pérez, C. J. Sánchez-Jaramillo, S. M. Bermúdez-Gómez, S. Ramírez. “Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo in vitro de *Aloysia tryphilla*”, Biotecnología en el Sector Agropecuario e Industrial, vol. 14 (2) 2016, pp: 38-46, DOI:10.18684/BSAA(14)38-46
- [13] Y. Hernández, M. E. González. “Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes”, Cultivos Tropicales, Vol. 31, 2010, ISSN 0258-5936.
- [14] E. F. George, M. A. Hall, G. J. De-Klerk. Plant propagation by tissue culture, 3rd. ed., Part 1, Chapter 5, Exegetics Ltd, 2008, pp: 130-143.
- [15] M. Ramírez, E. Salazar. “Establecimiento in vitro de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.)”, Revista de la Facultad de Agronomía, vol. 14, 1997, p. 497-506.
- [16] A. Abdelnour, M. E. Aguilar, L. Valverde. “Micropropagación de pilón (*Hieronyma alchorneoides*)”, Agronomía Costarricense, vol. 35 (2), 2011, pp: 9-19, ISSN:0377-9424 / 2011, www.mag.go.cr/revagr/index.html
- [17] W. Zurita-Valencia, E. Gómez-Cruz, E. Atrián-Mendoza, A. Hernández-García, M. E. Granados-García, J. J. García-Magaña, R. Salgado-Garciglia, N. M. Sánchez-Vargas. “Establecimiento de un método eficiente de germinación in vitro y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* schlechtt.) (*Tiliaceae*)”, Polibotánica, No. 38, 2014, versión impresa ISSN 1405-2768
- [18] S. Pérez, N. E. Leyva, M. A. Magallanes, A. P. Arce, A. Méndez. “Hongos contaminantes en el establecimiento in vitro de ápices de papa”, Cultivos Tropicales, vol. 37 (4), 2016, pp: 84-86, DOI: 10.13140/RG.2.2.26063.69284