

Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Horticultura Ambiental.



Evaluación de la germinación y caracterización morfológica e histoquímica de las semillas de *Turnera diffusa* Willd ex. Schult.

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciada en Horticultura Ambiental

**PRESENTA:**

Paola Scarlet Puga Guzmán

**DIRIGIDO POR:**

Dra. Emma Fabiola Magallán Hernández

Emma Fabiola Magallán Hernández

Presidente

Firma

Oliva del Carmen Ramírez Segura

Secretario

Firma

Santiago Vergara Pineda

Vocal

Firma

Mónica Elisa Queijeiro Bolaños

Suplente

Firma

Héctor Gordon Núñez Palenius

Suplente

Firma

Santiago de Querétaro, Querétaro, 2018.

## Resumen.

La damiana (*Turnera diffusa* Willd ex. Schult) es empleada en la medicina tradicional mexicana por sus propiedades afrodisiacas y como estimulante del sistema nervioso. Aunque es ampliamente utilizada en el mercado nacional e internacional no ha sido posible su propagación sexual bajo condiciones controladas que permitan aumentar el porcentaje de germinación para el establecimiento de cultivos comerciales. Se ha propuesto que diferentes especies del género *Turnera* presentan caracteres morfológicos que pueden estar implicados con la germinación de semillas y la ruptura de latencia. Asimismo, se cree que las hormigas juegan un papel importante en la germinación, por la presencia del eleosoma en las semillas. Los objetivos de este estudio fueron caracterizar las semillas de *T. diffusa* de manera morfológica e histoquímica, además, analizar la viabilidad de las semillas de *T. diffusa* y evaluar su germinación, simulando las condiciones ambientales de un hormiguero. Para la caracterización morfológica fueron seleccionadas 30 semillas al azar evaluando las variables de color, tamaño y peso. En la prueba histoquímica, se retiró el eleosoma a 60 semillas y se efectuaron tinciones para detectar la presencia de proteínas, aceites y almidón. Se llevó a cabo la prueba de tetrazolio a dos lotes de semillas colectados en los años 2016 y 2017, aplicando dos concentraciones de solución de tetrazolio y tres tiempos de exposición a 40°C. La germinación de *T. diffusa* se evaluó bajo nueve tratamientos; Al primer lote de semillas, se le retiró el eleosoma de forma mecánica y se mantuvo bajo condiciones de hormiguero dentro de una cámara bioclimática. Al segundo lote de semillas se le retiró el eleosoma de forma manual y permaneció a temperatura ambiente. El tercer lote de semillas conservó el eleosoma y fue almacenado a temperatura ambiente. Posteriormente, a cada tratamiento se adicionó AG<sub>3</sub> en concentraciones de 300 y 500 ppm y un control. Los resultados del estudio mostraron que las semillas de *T. diffusa* presentan un tamaño promedio de 0.725 mm de largo y 0.182 mm de ancho, el color de las semillas varía de café a negras cuando maduras y blanco amarillento en estado inmaduro y las semillas maduras e inmaduras tienen forma curvada. Asimismo, poseen un tejido denominado eleosoma que contiene proteínas, aceites y almidón. No existen diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad (60%) para las semillas de *T. diffusa* colectadas en los años 2016 y 2017 ( $p= 0.20$ ). En cambio, existen diferencias significativas entre todos los ensayos de germinación analizados. El tercer lote de semillas de *T. diffusa* tiene mayor porcentaje de germinación (36%) a 500 ppm de AG<sub>3</sub>. No existen diferencias significativas entre las concentraciones de 300 y 500 ppm de AG<sub>3</sub> ( $p= 0.54$ ). El comportamiento de la germinación en semillas ocurre en un periodo 6 y 39 días. La aplicación de AG<sub>3</sub> en la germinación de las semillas indica que presentan una latencia fisiológica la cual fue inhibida a concentraciones de 500 y 300 ppm.

Palabras clave

Plantas medicinales, propagación, eleosoma, latencia.

### Summary

The "damiana" (*Turnera diffusa* Willd ex Schult) is used in traditional Mexican medicine for its properties against muscle and nervous weakness, for its aphrodisiac properties, and as a stimulant of the nervous system. Although "damiana" is widely used in the national and international markets, its sexual propagation, under controlled conditions, has not been possible. This propagation system would be highly desirable, to increase the germination percentage for its establishment as a crop. It has been shown that different *Turnera* species present morphological characters that might be involved with seed germination and dormancy rupture. The objective of this study were characterize *T. diffusa* seeds morphological and histochemical form, in addition, analyze viability of *T. diffusa* seeds and evaluate their germination simulating the environmental conditions of an ant hill. For morphological characterization, 30 seeds were randomly selected, evaluating variables of color, size and weight. In histochemical test, eleosome was removed to 60 seeds and stains were made to detect protein presence, oils and starch. Tetrazolium test was carried out on two batches of seeds collected in 2016 and 2017, applying two concentrations of tetrazolium solution and three exposure times at 40 ° C. *T. diffusa* germination was evaluated under nine treatments; For the first batch of seeds, eleosome was removed mechanically and kept under anthill conditions within a bioclimatic chamber. The eleosome was manually removed from the second batch of seeds and remained environmental temperature. The third batch of seeds conserved eleosome and was stored at room temperature. Subsequently, AG<sub>3</sub> was added to each treatment in concentrations of 300 and 500 ppm and a control. Mature and immature seeds depicted significant differences in seed width ( $p = 0.0191$ ). The color varies from dark brown to black when ripe and yellowish white in an immature state. The seeds have a tissue called eleosome that contains lipids, proteins and starches. There were no significant differences on viability percentage for the stored and non-stored *T. diffusa* seeds ( $p = 0.20$ ). *T. diffusa* had a greater percentage of germination (36%) without ant nest conditions with eleosoma at 500 ppm GA<sub>3</sub>. There were no significant differences between 300 and 500 ppm GA<sub>3</sub> ( $p = 0.54$ ) treatments. Mature and immature seeds depicted significant differences in seed width ( $p = 0.0191$ ). The color varies from dark brown to black when ripe and yellowish white in an immature state. The seeds have a tissue called eleosome that contains lipids, proteins and starches. There were no significant differences on viability percentage for the stored and non-stored *T. diffusa* seeds ( $p = 0.20$ ). The behavior of germination in seeds is irregular since it occurs in a period from six to

39 days. The GA<sub>3</sub> effect on seed germination indicated that they present a latency which was inhibited at concentrations of 300 ppm GA<sub>3</sub>.

### **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP-SEP) y a la Facultad de Ciencias Naturales por brindarme los recursos y el espacio para llevar a cabo esta tesis. A los Doctores y maestros de la Universidad Autónoma de Querétaro que me instruyeron en la estructuración y mejora de este trabajo. Al igual, agradezco a la Dra. Gabriela Castaño de la Universidad Autónoma de México campus Juriquilla por su asesoramiento A mi familia por acompañarme y brindarme apoyo durante toda mi carrera.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. MARCO TEÓRICO .....	9
2.1 Viabilidad y germinación de semillas.....	9
2.2 Características morfológicas de las semillas que intervienen en la germinación .....	11
2.3 Las plantas medicinales.....	11
3. ESPECIE DE ESTUDIO .....	12
3.1 Su uso en la medicina tradicional.....	14
4. ANTECEDENTES .....	15
5. HIPÓTESIS .....	19
6. OBJETIVO GENERAL.....	20
6.1 Objetivos específicos .....	20
7. METODOLOGÍA .....	20
7.1 Material biológico .....	20
7.2 Caracterización morfológica de las semillas .....	21
7.3 Pruebas histoquímicas del eleosoma de la semilla.....	21
7.4 Prueba de viabilidad .....	22
7.5 Evaluación de la germinación de semillas de <i>T. diffusa</i> . Tratamiento pre germinativo: condiciones de hormiguero .....	23
7.5.1 Evaluación de la germinación de semillas de <i>T. diffusa</i> : evaluación de ruptura de latencia .....	23
7.6 Análisis estadístico .....	24
8. RESULTADOS.....	25
8.1 Caracterización morfológica.....	25
.....	27
8.2 Prueba histoquímica al eleosoma de la semilla.....	28
8.3 Análisis de viabilidad .....	29
8.4 Germinación de semillas de <i>T. diffusa</i> .....	31
DISCUSIÓN. ....	34
9. ....	34
10. CONCLUSIÓN .....	38

11. LITERATURA CITADA.....	39
----------------------------	----

## ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Tratamientos de la evaluación de la germinación de semillas de <i>T. diffusa</i> . Tratamiento pre germinativo, X= almacenamiento en condiciones ambientales, ✓=bajo condiciones de hormiguero. Presencia de eleosoma, X= sin presencia, ✓=Presencia del eleosoma. Giberelinas, concentraciones de 300 ppm, 500 ppm y control= sin aplicación. ....	24
Cuadro 2. Características morfológicas de las semillas maduras e inmaduras de <i>T. diffusa</i> . ....	26
Cuadro 3. Contrastes por pares del porcentaje de germinación de los tratamientos pre germinativos y las concentraciones de AG <sub>3</sub> . ....	32

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. A. Hábito de <i>Turnera diffusa</i> Wild ex. Schult. B. Detalle de las hojas. C. Detalle de las Flores. D. Detalles de frutos inmaduros.....	13
Figura 2. Mapa de distribución de <i>T. diffusa</i> en México. Fuente: Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB), INEGI, 2015. ....	13
Figura 3. A. Media de la variable largo. B, media de la variable ancho de semillas maduras e inmaduras de <i>T. diffusa</i> . Diferencias significativas entre las medidas de ancho de semillas maduras e inmaduras $t= 0.019$ , $g.l.= 57.884$ de <i>T. diffusa</i> .....	26
Figura 4. Características morfológicas de las semillas y frutos de <i>T. diffusa</i> . A. coloración y forma semillas maduras e inmaduras e inmaduras. Ar, detalle de arilo en las semillas maduras e inmaduras. B. Frutos maduros e inmaduros en forma de cápsulas trivalvada. ....	27
Figura 5 .A. Detalle de la unión de la semilla con el eleosoma. Tr= tricomas de los frutos de <i>T.diffusa</i> B. vista general de la semilla de <i>T. diffusa</i> . Detalle del eleosoma sobre la semilla de <i>T. diffusa</i> .....	27
Figura 6. Características histoquímicas al eleosoma de la semilla de <i>T. diffusa</i> . A. tinción con lugol de contenidos de almidón en las células epidérmicas del eleosoma. B. tinción con de contenidos proteínicos en la epidermis del eleosoma. C. Tinción con Sudan III, de gránulos de aceites en las células epidérmicas de <i>T. diffusa</i> . Aumento 40x.....	28
Figura 7. Porcentaje de tinción en semillas viables de <i>T. diffusa</i> colectadas en año 2016. ....	30

Figura 8. Embriones de *T. diffusa* sometidos a la prueba de tetrazolio bajo concentraciones de 0.5% y 1%. A. Semilla viables de *T. diffusa* bajo concentración de 1% durante 2h. B. Semillas inviables de *T. diffusa* bajo concentración de 0.5% por 1 h..... 30

Figura 9. Porcentaje de tinción en semillas viables de *T. diffusa* sin almacenamiento, colectadas en el años 2017..... 30

Figura 10. Porcentaje de germinación de semillas de *T. diffusa* bajo dos distintos tratamientos pregerminativos: simulación de condiciones de hormiguero (18°C, 70% Hr, 24 h oscuridad) y temperatura ambiente, con dos concentraciones de AG3, 300, 500 y un control sin aplicación de. Lote 1, condiciones de hormiguero sin presencia de eleosoma. Lote 2, sin condiciones de hormiguero con presencia de eleosoma. Lote 3 sin condiciones de hormiguero sin eleosoma. .... 33

Figura 11. Velocidad de germinación de las semillas de *T. diffusa* en un periodo de a 40 días. Lote 1, condiciones de hormiguero sin presencia de eleosoma. Lote 2, sin condiciones de hormiguero con presencia de eleosoma. Lote 3 sin condiciones de hormiguero sin eleosoma ..... 34

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas y medicinales (PAMs) han formado parte fundamental de la riqueza biológica y cultural de la humanidad gracias a su capacidad de prevenir y combatir enfermedades (Kunklinski, 2003). En México se reconocen 23,314 especies de plantas vasculares (Villaseñor, 2016) y se estima que entre 3,000-5,000 especies tienen alguna propiedad curativa, lo que equivale aproximadamente al 12.5% del total de la riqueza florística del país (Juárez-Rosete, 2013). Por lo anterior, las PAMs constituyen uno de los principales recursos terapéuticos tanto en el medio rural como suburbano (Osuna, 2000).

La demanda comercial de las PAMs ha centrado el interés de los recolectores, productores, industrias e instituciones en la obtención de productos derivados y estudios fitoquímicos (Osuna, 2000). Sin embargo, no existen datos recientes sobre el desarrollo de cultivos y volumen de extracción de las PAMs. En México, las PAMs que se cultivan son en su mayoría especies introducidas y se estima que el 75% de las PAMs nativas se aprovechan a través de la recolección silvestre y solo el 1% de estas plantas ha sido estudiadas con enfoque agronómico (Juárez-Rosete, 2013). En este contexto, para la mayoría de las especies nativas no hay programas de manejo y estudios que permitan la introducción de dichas especies como cultivos comerciales. Este es el caso de *Turnera diffusa* Willd.ex Schult conocida comúnmente como damiana.

La damiana (*T. diffusa*), es una planta arbustiva, anual de la familia botánica Passifloraceae (APG VI, 2016) la cual se distribuye de manera natural en las regiones áridas y semiáridas de México. *T. diffusa* presenta un alto valor comercial debido a que es empleada en diversos productos a nivel industrial, como licores, tés y en general en la medicina tradicional mexicana. Sin embargo, a la fecha no ha sido posible desarrollar el cultivo comercial a través de semilla por falta de protocolos que logren un porcentaje de germinación suficiente para la producción masiva de plantas (Alcaráz, 2008). Por este motivo, el estudio de la germinación de sus semillas permitirá establecer condiciones adecuadas para implementar un cultivo.



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Viabilidad y germinación de semillas

La semilla es un óvulo fecundado que posee un embrión, tejido de reserva (endospermo) y una cubierta seminal protectora, además, es la unidad estructural de reproducción, propagación y dispersión de las angiospermas y gimnospermas. Lleva a cabo una función primordial en la regeneración, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas y desde un enfoque agronómico, es esencial para el ser humano debido a que constituye uno de sus principales alimentos, por este motivo, se ha recurrido al almacenamiento de semillas, asegurando la preservación de especies y variedades de plantas útiles (Doria, 2010). Las semillas para la producción hortícola suelen tener un costo elevado, por lo que el agricultor debe estimar la viabilidad y el potencial de germinación de las semillas para la siembra en campo (Rodríguez-Quillón, 2008).

La viabilidad de las semillas puede ser estimada con la prueba de tetrazolio (cloruro de 2, 3, 5-trifenil-2H-tetrazolio). Es una prueba bioquímica que determina la viabilidad por la tinción roja que aparece en las semillas cuando son sumergidas en la solución de tetrazolio, en cambio, cuando hay ausencia de tinción se consideran como semillas inviables (Hartmann, 2002). El protocolo para determinar la viabilidad varía entre las especies, no todas las semillas responden igual a la prueba, ya que se basa en la actividad de las deshidrogenasas de la respiración que reducen químicamente la solución incolora de tetrazolio a formazán (1, 3, 5-trifenilformazán) de color rojo-rosado, de esta manera, es posible identificar tejido vivo, parcialmente dañado o muerto (Rodríguez-Quillón, 2008). Sin embargo, existen factores intrínsecos y extrínsecos que influyen en el porcentaje de germinación que se pueda obtener de las semillas.

A menudo, en semillas hortícolas, se recurre a ensayos de germinación para determinar la viabilidad de un lote de semillas, pero, en realidad, los resultados de estos ensayos pueden ser equívocos con respecto a la viabilidad de las semillas. En ocasiones, si una semilla no germina, no quiere decir que sus tejidos estén muertos, esto se debe a que existen semillas viables que pueden

estar afectadas por algún tipo de latencia que impida su germinación (Rodríguez-Quillón, 2008).

La latencia o dormancia es una condición en la cual las semillas no germinan, incluso cuando las condiciones del ambiente (agua, temperatura, luz y aireación) son permisivas para la germinación. La latencia se ha atribuido a un desbalance hormonal; el más descrito se refiere a la relación entre el ácido abscísico (ABA) producido por el embrión y el ácido giberélico ( $AG_3$ ), es decir, una alta concentración del ABA o una baja sensibilidad al  $AG_3$  inhibe la germinación. Márquez, 2013 ha propuesto que el cociente ABA/ $AG_3$  y no la cantidad absoluta de cada uno de ellos es la que determina el rompimiento o mantenimiento de la latencia.

Actualmente, se reconocen dos categorías determinadas por el tiempo en que se establece la latencia: primaria y secundaria. La latencia primaria o endógena se presenta desde el momento de la diseminación de semillas, mientras que la latencia secundaria o inducida se desarrolla después de la diseminación, debido a que condiciones adversas producen en la semilla cambios metabólicos reversibles. La latencia primaria puede deberse a cinco causas que radican en el embrión, las cuales son: 1) inmadurez morfológica, 2) inmadurez fisiológica, 3) latencia morfofisiológica, 4) latencia física (externa al embrión), y 5) combinación de distintos tipos de latencia (Márquez, 2013).

Las semillas dormantes previenen la germinación inmediata e incluso regulan el tiempo, las condiciones y el lugar en el que la germinación ocurra, particularmente en tiempos desfavorables durante las estaciones del año (Márquez, 2013). En la propagación de plantas, la tasa de germinación de una especie es resultado de la domesticación, las especies cultivadas presentan poca o nula latencia, en contraste, en las semillas de especies silvestres, la germinación está influenciada mayormente por su entorno.

## 2.2 Características morfológicas de las semillas que intervienen en la germinación

En la formación de las semillas, el embrión, tejido de reserva y cubierta seminal pueden continuar su desarrollo, detenerlo, o en algunos casos desaparecer durante el desarrollo, asimismo, las semillas pueden presentar estructuras especiales conocidas como apéndices seminales (Hartmann, 2002). Un ejemplo de apéndices seminales en la semilla son los eleosomas,

Font Quer (2001) define eleosoma para designar las reservas de materias nutritivas (como aceites y proteínas) exteriores a la semilla. El eleosoma se considera una adaptación para promover la dispersión de semillas (Cuautle, 2004) ya que los animales que intervienen en la diseminación, principalmente hormigas, buscan a las semillas para utilizar su eleosoma como alimento.

Frecuentemente, cuando las hormigas realizan la colecta de semillas para su alimentación, las transportan intactas a su nido, donde remueven y consumen el eleosoma, entonces las semillas pueden ser desechadas del hormiguero sin haber sufrido alteración notable. De esta manera las plantas también pueden verse beneficiadas ya sea como protección, dispersión de semillas, polinización o con el éxito de la germinación de semillas en el suelo del hormiguero. El éxito de la germinación debido a las hormigas puede ocurrir debido a otros beneficios indirectos, por ejemplo, la colonización de nuevos hábitats por la dispersión de semillas y la disminución de la competencia entre plántulas (Fernández, 2003, Rocha, 2018). Un ejemplo de semillas con eleosoma son especies del género *Turnera*.

## 2.3 Las plantas medicinales

Una planta medicinal se define como aquella que contiene en cualquiera de sus órganos, principios activos que ejercen una acción terapéutica en la salud, los cuales pueden ser usados para la obtención de nuevos fármacos (Kunklinski, 2003). Actualmente, el consumo de las PAMs ha ido en aumento por el conocimiento de sus propiedades y extensas aplicaciones dentro de la medicina alternativa.

Para el año 2012, en México se registran 8,351 ha para la producción comercial de hierbas aromáticas y medicinales. Las especies más producidas por su demanda en el mercado mundial fueron; la albahaca (*Occimum basilicum* L.), lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.), manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), menta (*Mentha x piperita* L.), salvia (*Salvia pratensis* L.), tomillo (*Thymus vulgaris* L.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y zacate limón (*Cymbopogon citratus* DC. Stapf., Juárez-Rosete, 2013). Sin embargo, para la mayoría de PAMs la generación de información sobre su cultivo es todavía incipiente, ya que la forma de explotación extractiva es la más utilizada para su comercialización (USAID, 2010) tal es el caso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

### 3. ESPECIE DE ESTUDIO

*Turnera diffusa* Willd. ex Schult es una planta arbustiva aromática al estrujarse debido a sus aceites esenciales. Puede medir hasta dos m de altura y presenta un tronco ramificado; hojas alternas o verticiladas simples que miden de 10 a 25 mm de largo, sus flores miden de 8 a 12 mm de largo, son amarillas, solitarias y con cinco pétalos (Figura 1). Es conocida comúnmente como damiana, hierba de la pastora, hierba del venado y pastorcilla (Alvarado-Cárdenas, 2006). *T.diffusa* pertenecía a la familia botánica Turneraceae *sensu* Cronquist (1981) la cual cuenta con 227 especies, con tres géneros distribuidos en el continente americano (*Piriqueta*, *Erblichia* y *Turnera*). Sin embargo, con base en la clasificación APG IV (2016) actualmente se encuentra en la familia Passifloraceae.

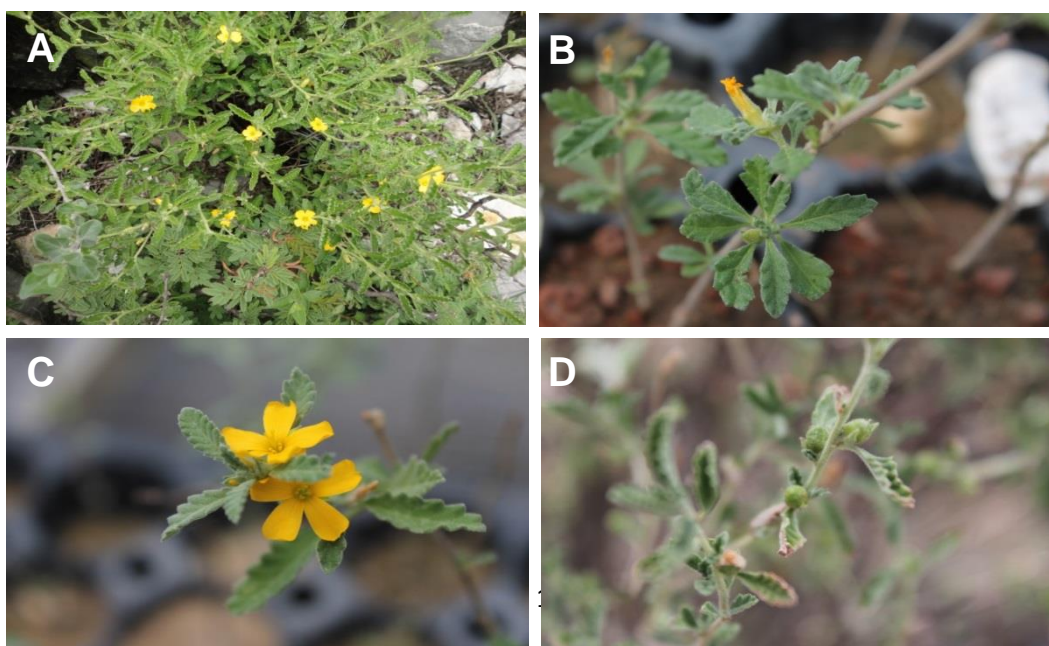


Figura 1. A. Hábito de *Turnera diffusa* Wild ex. Schult. B. Detalle de las hojas. C. Detalle de las Flores. D. Detalles de frutos inmaduros.

En condiciones naturales, las plantas de damiana florecen de julio a noviembre y es durante el periodo de lluvias cuando se lleva a cabo la germinación (Osuna, 2000). Tiene una amplia distribución en el continente americano, desde California y Texas en el sur de los Estados Unidos de América, Centro América y Sudamérica, hasta Bolivia. En México se distribuye en regiones de climas áridos y semiáridos, en los estados de Baja California Sur, Chihuahua, Estado de México, Guerrero, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (Figura 2, Magallán, *et al*, 2015).

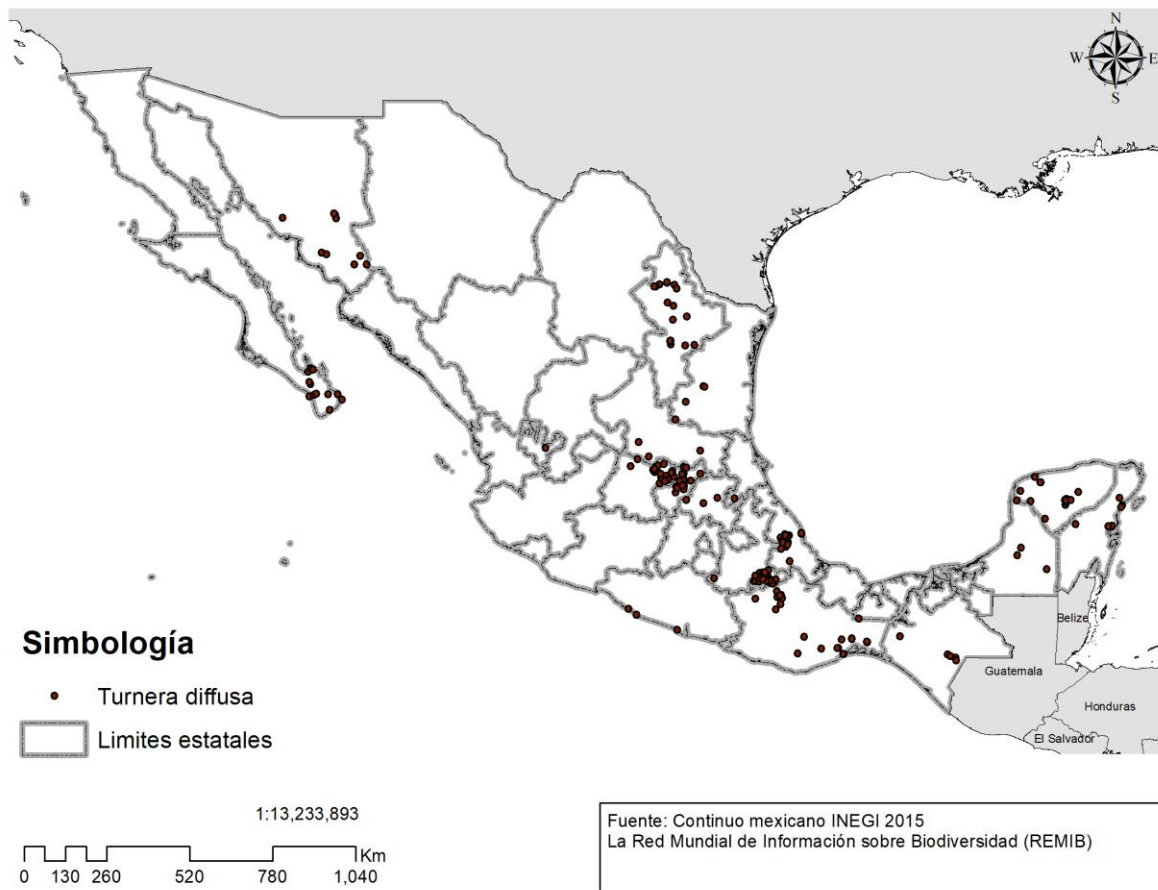


Figura 2. Mapa de distribución de *T. diffusa* en México. Fuente: Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB), INEGI, 2015.

Las poblaciones silvestres de damiana se distribuyen frecuentemente en sierras altas, llanuras y cañones, en regiones de roca caliza, en altitudes de 1000 a 2100 m s. n. m. Se asocia a climas de tipo semicálido a templado y en menor proporción en climas cálidos. Se distribuye en un intervalo de precipitación de 500 a 1000 mm y la temperatura media anual es de 14 a 24°C. No es tolerante a suelos inundables o arcillosos. Se asocia a vegetación de selva baja caducifolia, pastizal, matorral xerófilo y vegetación secundaria de bosque de *Quercus* (Magallán, *et al*, 2015).

### 3.1 Su uso en la medicina tradicional

La damiana es aprovechada a nivel mundial por sus virtudes afrodisiacas y estimulantes del sistema nervioso central, empleándose en varias formas farmacéuticas como cápsulas, infusiones, extractos, licores, aceites esenciales y productos cosméticos (Belmares, 2013). En México es reconocida por sus propiedades en el tratamiento de catarro, tos, dolor de cabeza y contra trastornos gastrointestinales.

En una investigación reciente sobre la fitoquímica de damiana se encontraron alrededor de 35 compuestos, de los cuales se identificaron 0.2 a 0.9% de aceites volátiles, 14% de resina, aproximadamente 3.5% de taninos, 6% de almidón, además de distintos compuestos fenólicos y una sustancia llamada *damianina*, que es la causante principal de darle un sabor amargo (Villasana, 2009).

Sus aceites esenciales tienen una alta capacidad antioxidante y un análisis bioquímico de las hojas de damiana mostró un alto contenido de zinc, magnesio y vitamina E (Soriano, 2013). Suresh y Sharma (2006) mostraron que el compuesto Apigenin aislado en las hojas de la damiana es el causante principal de dar un efecto antiansiolítico (Belmares, 2013). Sin embargo, aunque existen estudios sobre la composición química de diferentes compuestos presentes en las hojas de la damiana, se desconoce cuál de ellos es responsable del efecto afrodisíaco.

La damiana representa un ingreso económico para la población debido a su comercialización a nivel nacional e internacional, no obstante, la damiana se obtiene mayormente a través de la colecta de poblaciones silvestres. Ante la falta de manejo del recurso, se percibe una disminución progresiva de las poblaciones de damiana, así como una falta de producción continua y fluctuación del precio en el mercado (Alcaráz, 2008).

#### **4. ANTECEDENTES**

Los estudios acerca de la caracterización de semillas han constituido un aporte al reconocimiento de las especies en campo, lo cual es importante para el manejo de las especies como recursos forestales no maderables y en la domesticación de plantas nativas para distintos usos (Lovey, 2010). Uno de los primeros estudios sobre caracterización morfológica y anatómica de semillas en la familia Turneraceae fue llevado a cabo por Corner (1976), concluyendo que las semillas de la familia Turneraceae son reticuladas, con arilo funicular, procedentes de óvulos anátropos, con tegumento externo biestratificado y tegumento interno de tres capas, además, hace referencia a una testa no especializada y tegmen con un estrato de células esclerosadas.

La morfología de las semillas se ha estudiado únicamente a nivel de familia y las investigaciones más relevantes se limitan a estudios anatómicos. Gonzales (2013) describe e ilustra la cubierta seminal de diversas especies de la familia Turneraceae, entre ellas *T. diffusa*. Para dicha especie, encontró que la pared externa de la semilla es recta con un exostoma hemisférico y presenta un arilo papiloso con varias papilas alineadas. El color de las semillas maduras del género *Turnera* varía de negras a castaño-oscuros (10YR 2/1 a 10YR 3/2) y mostraron un tamaño de 1.5-4.90 x 0.7-2.7 mm. Gonzales (2013) usa el término arilo para los apéndices carnosos de las semillas del género *Turnera* y menciona que la inserción del arilo a las semillas es hilar en la mayoría de las especies. El hilo es la cicatriz que deja en la semilla la abscisión del funículo. El crecimiento laminar del arilo se produce después de la fecundación (Gonzales, 2013).

Se han llevado a cabo diversos estudios sobre el arilo que presentan las semillas de especies del género *Turnera*, ya que se ha comprobado que existe una interacción ecológica con hormigas que puede influir en el proceso de germinación. Cuautle (2004) denominó al arilo de las semillas como eleosoma y analizó el efecto de la germinación de las semillas de *Turnera ulmifolia* (Turneraceae) por manipulación de la hormiga *Forelius analis*. Las semillas fueron sujetas a los tratamientos de manipulación directa en los hormigueros de *F. analis*, remoción mecánica del eleosoma y un entierro de las semillas a 1, 2, 3 y 5 cm de profundidad. Los resultados de las pruebas de germinación indicaron que *T. ulmifolia* presentó bajos porcentajes de germinación (0-26%), mostrando que el tratamiento de manipulación en los hormigueros de *F. analis* obtuvo un porcentaje de germinación significativamente mayor (26%) mientras que el porcentaje de germinación de las semillas con y sin eleosoma fue de 4% y 6% respectivamente. En cuanto al entierro de las semillas, la germinación fue mayor a una profundidad de 1 cm (18%), seguido de la profundidad de 3 cm (6%), las semillas enterradas a los 5 cm de profundidad no logran germinar (Cuautle, 2004).

La relación que existe entre la germinación de semillas y el consumo de eleosomas por hormigas, fue estudiada por Tschinkel, (2016), donde menciona que la preferencia que tienen las hormigas a cierto tipo de semillas depende al tamaño corporal de la hormiga, la disponibilidad, el valor calórico y la toxicidad. Analizó que las semillas que usan como alimento son de tamaño pequeño, mientras que las que almacenan en sus hormigueros son semillas grandes. Tschinkel, (2016) llevó a cabo experimentos sobre la germinación de semillas, simulando en laboratorio las condiciones ambientales de un hormiguero (10°, 15°, 24° y 32° C) habiendo encontrado que las semillas germinan bajo condiciones que se aproximan a las de los nidos de hormigas (15 y 24°C).

La germinación y la interacción semilla- hormiga fue estudiado por Rocha, *et al* (2018) para la especie *T. subulata* (Turneraceae). La evaluación de la germinación se llevó a cabo bajo cinco tratamientos; prueba de germinación con semillas intactas, remoción de eleosoma por las hormigas *Brachymyrmex* sp.,



*Camponotus blandus*, *Dorymyrmex* sp., *Crematogaster obscurata* y *Solenopsis invicta*, remoción del eleosoma de forma manual, escarificación con agua caliente y escarificación manual, además evaluó el consumo del eleosoma por las especies de hormigas asociadas a la planta. En la germinación de semillas, ninguna de las especies de hormigas y de los tratamientos propuestos contribuyó significativamente en el incremento de la germinación de las semillas. El eleosoma de las semillas fue consumido por todas las especies de hormigas, sin embargo ninguna de ellas lo consume totalmente. Los resultados del estudio de Rocha (2018) sugieren que el consumo del eleosoma por estas especies de hormigas no determinan un factor importante en la germinación de *T. subulata*.

En referencia a la propagación y el cultivo de la especie *T. diffusa*, la propagación por medio de semillas ha sido el menos exitoso. Viesca (1983) evaluó la germinación y ruptura de latencia de las semillas de *T. diffusa* bajo cuatro tratamientos; semillas intactas, escarificación con ácido sulfúrico, dos concentraciones de  $AG_3$  (200 ppm y 800 ppm) a dos diferentes tiempos de inmersión en la solución (24 y 48 horas). En su estudio concluye que la germinación de las semillas ocurre de forma lenta e irregular en comparación a las plantas domesticadas en un periodo de 30 días. La latencia de las semillas de damiana es superada con la aplicación de  $AG_3$  obteniéndose los mejores resultados con una concentración de 800 ppm (25% de germinación).

Sobre la escarificación de semillas, Viesca, (1983) menciona que se obtiene el mismo efecto en la germinación si se escarifica o no en ácido sulfúrico al 94% durante dos minutos; sin embargo, el ácido sulfúrico ejerce un efecto negativo sobre el desarrollo inicial de las plántulas. Un tiempo de inmersión de 24 horas en solución de  $AG_3$  ejerce mejor efecto sobre la germinación en comparación con 48 horas y concluye que la longitud de plántula es directamente proporcional a la concentración de  $AG_3$  (para 200 ppm, 1.57 y para 800 ppm 2.24 cm).

Baja California Sur tiene la principal producción de damiana, innovando sus métodos de propagación con el uso de métodos *in vitro* o cultivo de tejidos.

Alcaráz (2008) llevó a cabo este proceso que permite obtener una planta completa a partir de cualquier parte de sus tejidos en condiciones artificiales totalmente controladas. La propagación *in vitro* de damiana consiste en tomar una fracción de la planta que se lava, descontamina y se siembra en frascos de cultivo con una solución nutritiva a base de sales minerales, hormonas y una fuente de carbono, con un agente gelificante (agar), posteriormente los cultivos se mantienen en un cuarto con luz continua y temperatura constante entre los 25 y 27°C. Las plantas de damiana obtenidas mediante cultivo de tejidos tienden a perder humedad cuando son trasplantadas, esto provoca marchitamiento y en ocasiones la muerte de las plantas. Actualmente con este método se ha obtenido una sobrevivencia de 73.9% a 83.4% y una sobrevivencia al trasplante de un 45 a un 66%. Ante los resultados obtenidos de la reproducción por semillas, en el norte del país el método al que más se ha recurrido ha sido la propagación vegetativa, por medio de estacas.

Martínez (2013) menciona que el método para propagación de *T. diffusa* más eficaz es por medio de varetas. El material vegetativo debe provenir de poblaciones silvestres sanas, de 20 cm de largo y grosor homogéneo, donde el mejor sustrato para enraizamiento utilizado es de textura migajón arenosa. Las vareas deben establecerse en camas 1.0 m de ancho por 0.75 m de altura, bajo media sombra, las cuales, deben tener una cubierta de plástico formando un túnel la cual es sostenida por una estructura metálica, lo anterior con el propósito de crear un microclima que propicie un efecto de invernadero, lo cual favorece el brote y el enraizamiento de varetas.

Martínez (2013) encontró los meses adecuados para el enraizamiento de las estacas de damiana, los cuales comprenden de fines de noviembre a fines de diciembre y de marzo a mayo, observándose que fuera de ellas, el enraizamiento disminuye considerablemente. Bajo el método de propagación por estacas, se obtienen una planta con enraizamiento bien definido, y apta para su plantación en el sitio definitivo a los tres meses con un 55% de enraizamiento.

Las semillas de *T. diffusa* son ortodoxas, las cuales pueden almacenarse con contenidos de humedad de 6 a 7 % y a temperaturas de 0 °C, tales condiciones permiten mantener la viabilidad de las semillas por varios años. Las semillas de *T. diffusa* presentan algún tipo de latencia, característico de especies que habitan en climas áridos y semiáridos (CONAFOR, 2013). En ambientes desérticos, el agua potencial del suelo y la temperatura son factores importantes que afectan directamente a la germinación de semillas (Flores, 2017).

Para algunas especies desérticas, reducir la germinación junto con las limitaciones de agua es considerada una estrategia de sobrevivencia. Flores (2017) analizó la germinación de ocho especies dominantes del desierto Chihuahuense con base en la interacción del estrés hídrico y la temperatura. La hipótesis de este estudio fue que a altas temperaturas y baja humedad se puede inhibir la germinación. La germinación se evaluó bajo cuatro temperaturas (18, 25, 32 y 36°C) y bajo cinco condiciones de limitación de agua usando polietilenglicol (PEG) 6000 (0.0-1.0 MPa). Los resultados mostraron que las especies estudiadas presentaron menor germinación con disminución de humedad y altas temperaturas. En ambientes áridos la humedad es extremadamente variable en espacio y tiempo, y la sequía es prolongada, así el suelo raramente mantiene la capacidad de campo y las condiciones de humedad juegan un papel vital en la regulación de la germinación en ambientes secos.

Flores (2017) concluye que en ambientes áridos y semiáridos, la humedad disponible declina cuando las temperaturas son altas, afectando el crecimiento de la planta e impacta las etapas de reclutamiento y germinación de semillas. Tomando en cuenta los efectos de la temperatura y humedad, encontró que las mejores condiciones para la germinación se encuentran entre 25 y 30°C y la humedad del suelo entre los 0MPa a -0.5MPa.

## **5. HIPÓTESIS**

Dado que las semillas de *Turnera diffusa* Willd.ex Schult presentan una estructura semejante a un eleosoma, las semillas tendrán un mayor porcentaje de germinación simulando las condiciones ambientales dentro de un hormiguero.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la germinación de *T. diffusa* simulando las condiciones ambientales dentro de un hormiguero.

### **6.1 Objetivos específicos**

1. Caracterizar morfológicamente la semilla de *T. diffusa*.
2. Evaluar la presencia de almidón, aceites y proteínas en el eleosoma de las semillas *T. diffusa* por medio de pruebas histoquímicas.
3. Determinar la viabilidad de las semillas *T. diffusa* por medio de la prueba de Tetrazolio.
4. Evaluar el efecto del ácido giberélico en la ruptura de la latencia en las semillas de *T.diffusa*.

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 Material biológico**

Se analizó la germinación de semillas de *T. diffusa* colectadas en el matorral xerófilo de la localidad de Maguey Verde, Peñamiller, Querétaro, ubicado geográficamente al Norte del estado de Querétaro. El clima que predomina en la región es el semicálido-semiseco (BS1 (h')) (García, 2004). La temporada de mayor calor se presenta durante los meses de mayo a agosto, con temperaturas de hasta 40.2°C. La temperatura promedio es de 21.7°C. Asimismo, el periodo de precipitación pluvial se presenta en el verano con un promedio de 434.5 mm anuales (INAFED, 2013).

Se colectaron 1080 semillas de *T. diffusa* directamente de las plantas de las poblaciones de la localidad de estudio en el meses de octubre del año 2016 y noviembre del año 2017. La recolección de frutos y semillas en diferentes estadios de desarrollo se realizó con tijeras de poda y se colocaron en bolsas de papel estraza, las cuales se etiquetaron y fueron llevadas al laboratorio. Se mantuvieron a temperatura ambiente en frascos de cristal con sílica gel.

A los 20 días del experimento, se desarrollaron hongos en la semilla, iniciando en la zona del eleosoma, por lo que las semillas se desinfectaron con

CAPTAN Ultra 50 WP. Se agregaron 2.25 g/L del producto al de agua de riego, los riegos con CAPTAN se realizaron diario durante 20 días.

## 7.2 Caracterización morfológica de las semillas

La caracterización morfológica de semillas se llevó a cabo con un lote de 100 semillas seleccionadas al azar, estudiando sus características cualitativas y cuantitativas. Con ayuda de un vernier digital se midieron 30 semillas para obtener largo y ancho de las semillas de damiana. Las semillas de *T. diffusa* son de tamaño pequeño por lo que se pesó un grupo de 100 semillas para generar un dato cuantificable, mediante una balanza analítica. El color de las semillas maduras e inmaduras y frutos se analizó con las tablas de Munsell (2011). Para describir la forma de las semillas de damiana se siguió el criterio de Moreno (1984). Con la finalidad de obtener detalles de la superficie de las semillas, se observaron al microscopio electrónico de barrido (MEB, Zeiss EVO50) y se generaron imágenes de las semillas. Las semillas y frutos fueron observadas en fresco en modo de presión variable.

## 7.3 Pruebas histoquímicas del eleosoma de la semilla

Con el objetivo de caracterizar el apéndice que presentan las semillas de *T. diffusa*, se llevaron a cabo pruebas histoquímicas cualitativas. Se retiró el eleosoma a 60 semillas seleccionadas al azar. Se colocó el tejido en una laminilla y se realizaron cortes a mano alzada, seleccionando los cortes más delgados. Los cortes obtenidos fueron sometidos a pruebas de contenido de grasas y aceites, proteínas y almidón con base en los criterios de Aguilar (1996). Para cada prueba se realizaron 20 repeticiones, las cuales se observaron al microscopio con un aumento de 40x, con lo cual, se determinó la presencia o ausencia de los contenidos.

### 7.3.1. Contenido de proteínas

Para la determinación de la presencia de proteínas en el tejido se utilizaron secciones de eleosoma en fresco los cuales fueron deshidratados en alcohol al 96% y se aplicó una gota del reactivo azul mercúrico de bromofenol durante 30 minutos. Posteriormente se enjuagaron con ácido acético al 0.5%

durante 20 minutos, y un enjuague con agua destilada por tres minutos. Los tejidos se deshidrataron con alcoholes graduales, desde 70% hasta 100% y xilol, por tres minutos en cada paso, por último, se montó la laminilla con jalea glicerinada. Con esta técnica las proteínas se tiñen de azul, donde la presencia de esta coloración fue considerada como positiva y la ausencia como negativa.

#### 7.3.2 Contenido de grasas y aceites

Se colocaron cortes del eleosoma en fresco sobre un portaobjetos y se les agregó una gota de reactivo Sudan III, se dejó actuar durante 30 minutos, después se enjuagó el exceso de reactivo y se montó la laminilla con jalea glicerinada. La presencia de coloración rojo en el tejido se consideró positivo y la ausencia de coloración como negativa.

#### 7.7.3. Contenido de almidón

Se colocaron secciones frescas de eleosoma en un portaobjetos, se agregó una gota de reactivo Lugol (Aguilar, 1996), y se dejó reposar por un minuto, se enjuagó el exceso de reactivo con agua destilada, finalmente, se montó la laminilla con jalea glicerinada. La presencia de coloración azul a morado en las células fue considerada como positivo mientras que la ausencia de coloración se consideró negativa.

#### 7.4 Prueba de viabilidad

Tomando en cuenta el estudio de Viesca, (1983) acerca del bajo porcentaje de germinación que presentan las semillas de *T. diffusa* en condiciones controladas, se llevó a cabo la prueba de tetrazolio a dos lotes de semillas colectados en los años 2016 y 2017 para estimar el porcentaje de viabilidad que poseen las semillas de *T. diffusa*. Las semillas se mantuvieron hidratadas en agua destilada a temperatura ambiente durante 24 h con el fin de ablandar los tejidos e iniciar la actividad enzimática. Posteriormente Se llevaron a cabo cortes transversales en las semillas y fueron sumergidas en las soluciones de 2, 3, 5 cloruro de trifenil tetrazolio.

Se efectuaron siete ensayos a dos concentraciones de solución de tetrazolio (0.5 y 1%) y tres tiempos de exposición (1, 2 y 3 h) a 40°C. Se

efectuaron tres repeticiones de 10 semillas para cada tratamiento. Seguido de una evaluación cualitativa de la intensidad de la tinción para cada semilla.

#### 7.5 Evaluación de la germinación de semillas de *T. diffusa*. Tratamiento pre germinativo: condiciones de hormiguero

Con el fin de evaluar el efecto que tienen las condiciones ambientales de un hormiguero y el consumo del eleosoma por hormigas sobre la germinación de semillas de *T. diffusa* a un primer lote (L1) de 360 semillas, se le retiró el eleosoma con forma manual. Posteriormente, para recrear las condiciones ambientales de un hormiguero, las semillas se mantuvieron en una cámara bioclimática Prendo® CBRF-20, con condiciones ambientales de 18°C, 70% de humedad relativa y 24 h de oscuridad. Para evitar la aparición de hongos en las semillas durante este proceso, el periodo de simulación fue de 15 días (Castaño, comunicación personal, 2018). Las semillas se colocaron en 18 cajas petri con 20 semillas cada una.

Un segundo lote (L2), compuesto de 360 semillas se le removió el eleosoma de forma manual, una vez removido el eleosoma, se conservaron a temperatura ambiente durante 15 días, las semillas se colocaron en 18 cajas petri con 20 semillas cada una. Finalmente, un tercer lote de 360 semillas (L3) conservó el eleosoma y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 días. Se colocaron en 18 cajas petri con 20 semillas cada una.

##### 7.5.1 Evaluación de la germinación de semillas de *T. diffusa*: evaluación de ruptura de latencia

Después de 15 días, los tres lotes de semillas pasaron a las pruebas de germinación. Tomando como referente el estudio de Viesca (1983), sobre la latencia fisiológica en damiana, se evaluó el efecto promotor de la germinación del ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) en concentraciones de 300 ppm y 500 ppm más un control sin aplicación (Cuadro 1). En cada lote (L1, L2 y L3), se sumergieron las semillas en la solución de AG<sub>3</sub> durante 24 h, con secado posterior al ambiente. Luego, las semillas de cada tratamiento se colocaron en cajas Petri con algodón. Las semillas de *T. diffusa* se mantuvieron en una cámara de germinación refrigerada Prendo®,

CBRF-20, con las condiciones ambientales de 28°C y 30% de humedad ambiental, y 12/12 h de fotoperiodo. Las semillas fueron regadas a saturación con agua destilada estéril durante 40 días. Se efectuaron en total nueve tratamientos con seis repeticiones de 20 semillas cada uno. La germinación fue evaluada diario hasta los 40 días del experimento. Las semillas se consideraron germinadas si una porción de la radícula se encontraba expuesta.

Cuadro 1. Tratamientos de la evaluación de la germinación de semillas de *T. diffusa*. Tratamiento pre germinativo, X= almacenamiento en condiciones ambientales, ✓=bajo condiciones de hormiguero. Presencia de eleosoma, X= sin presencia, ✓=Presencia del eleosoma. Giberelinas, concentraciones de 300 ppm, 500 ppm y control= sin aplicación.

Lote	Tratamiento pregerminativo: Condición de hormiguero	Presencia de eleosoma	Giberelinas (ppm)
L 1	✓	x	Control
	✓	x	+ 300
	✓	x	+ 500
L 2	x	x	Control
	x	x	+ 300
	x	x	+ 500
L 3	x	✓	Control
	x	✓	+ 300
	x	✓	+ 500

## 7.6 Análisis estadístico

Para saber si hay diferencias en el porcentaje de germinación final entre los distintos tratamientos pre germinativos (lote 1, lote 2 y lote 3) y las concentraciones de AG<sub>3</sub> (control, 300 ppm y 500 ppm), se realizó un Modelo Lineal Generalizado (GLM) con distribución de error binomial y función de ligamiento logit. En este estudio, no fue posible analizar la interacción de los tratamientos pre germinativos y la concentración de giberelinas debido al tamaño de muestra.



Las diferencias entre las variables de caracterización de las semillas y las pruebas de viabilidad fueron determinadas por medio de la prueba de *t* de Student.

## 8. RESULTADOS.

### 8.1 Caracterización morfológica

Las semillas maduras de *T. diffusa* presentan un tamaño promedio de 0.725 mm de largo y 0.182 mm de ancho. Las semillas inmaduras tienen un tamaño promedio de 0.840 de largo y 0.152 mm de ancho. En cuanto al tamaño, entre las semillas maduras e inmaduras existen diferencias significativas en la medida de ancho ( $t= 0.019$ ,  $g.l.= 57.884$ ); en cambio no existen diferencias significativas en la medida del largo de las semillas ( $t= 0.5801$ ,  $g.l.= 52.920$ , figura 3). El peso de cien semillas es de 0.152 g cuando se encuentran en estado maduro.

Una vez que las semillas de *T. diffusa* están maduras presentan un color café oscuro (Munsell 7.5YR 4/2 a 7.5YR 5/2); mientras que las semillas inmaduras tienen un color blanco-amarillento (Munsell 2.5Y 8/4 a 2.5Y 8/6, cuadro 2). La forma de las semillas en estado maduro e inmaduro es curvada y presentan testa con apariencia estriada y consistencia dura. Los frutos de damiana son una cápsula trivalvada con tricomas, con seis semillas por fruto (Figura 4). Presentan un color café cuando están maduras (Munsell 7.5YR 6/6 a 7.5YR 7/4) y un color verde cuando las cápsulas están inmaduras (Munsell 5Y 6/4 a 5Y 7/4). Las imágenes tomadas del microscopio electrónico de barrido mostraron que las semillas maduras e inmaduras de *T. diffusa* tienen un tejido denominado eleosoma que las cubre parcialmente (Figura 5).

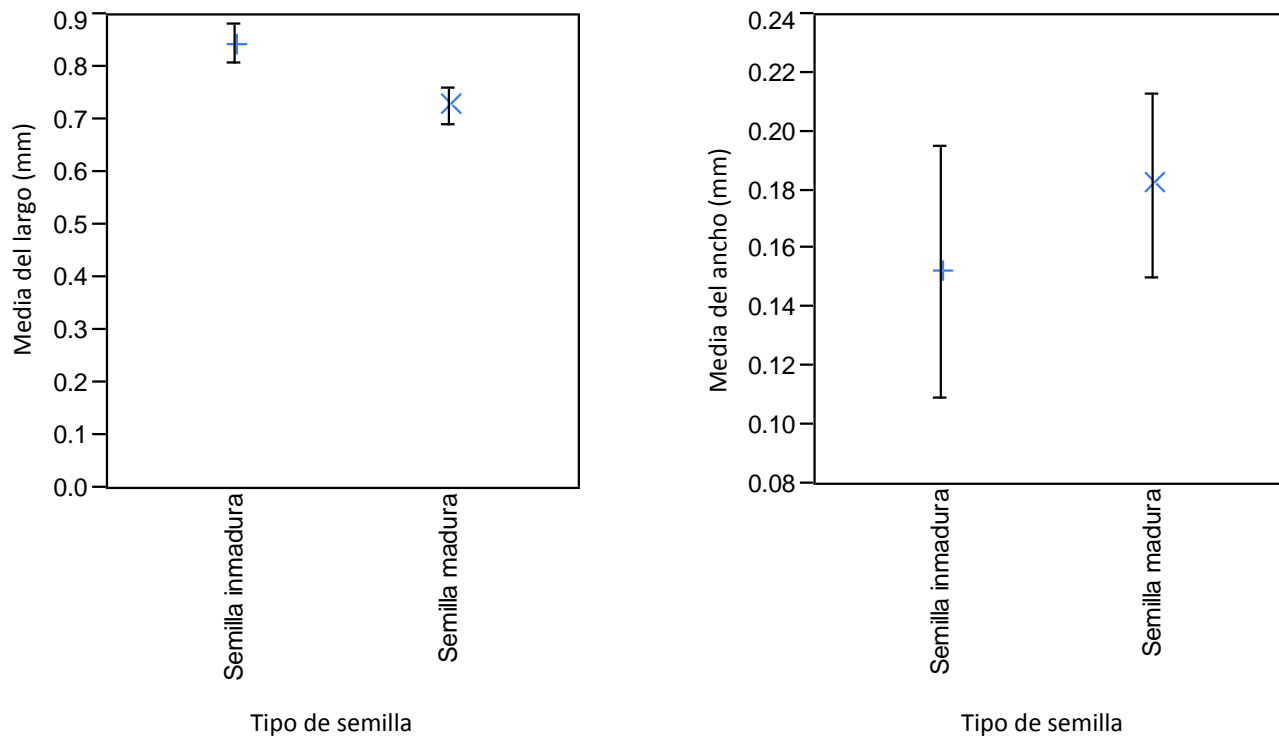


Figura 3. A. Media de la variable largo. B, media de la variable ancho de semillas maduras e inmaduras de *T. diffusa*. Diferencias significativas entre las medidas de ancho de semillas maduras e inmaduras  $t = 0.019$ ,  $g.l. = 57.884$  de *T. diffusa*

Cuadro 2. Características morfológicas de las semillas maduras e inmaduras de *T. diffusa*.

Características morfológicas	Semilla madura	Semilla inmadura
Peso (g)	0.1520	0.1520
Largo (mm ± e.e.)	0.725 ± 0.034	0.84 ± 0.035
Ancho (mm ± e.e.)	0.182 ± 0.031	0.152 ± 0.043
Forma	curvada (en forma de pera)	curvada (en forma de pera)
Color	café oscuro (Munsell 7.5YR 4/2 a 7.5YR 5/2)	blanco-amarillento (Munsell 2.5Y 8/4 a 2.5Y 8/6)



Figura 4. Características morfológicas de las semillas y frutos de *T. diffusa*. A. coloración y forma semillas maduras e inmaduras e inmaduras. Ar, detalle de arilo en las semillas maduras e inmaduras. B. Frutos maduros e inmaduros en forma de cápsulas trivalvada.

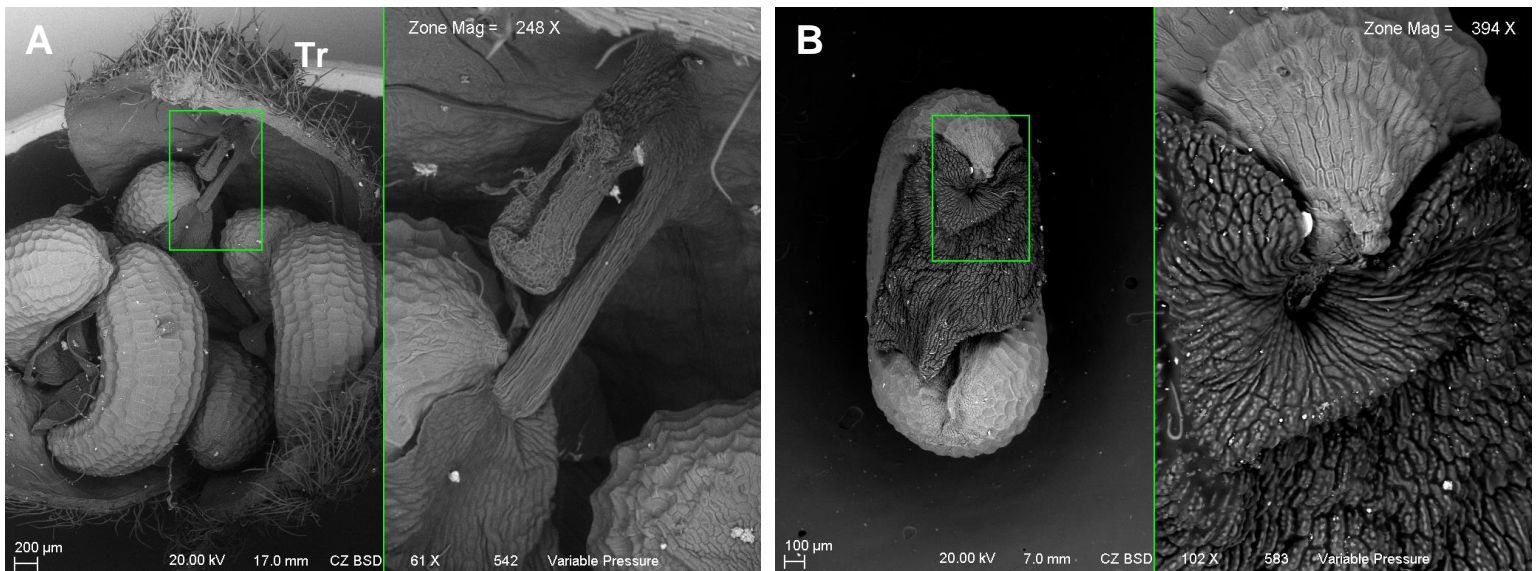


Figura 5 .A. Detalle de la unión de la semilla con el eleosoma. Tr= tricomas de los frutos de *T.diffusa* B. vista general de la semilla de *T. diffusa*. Detalle del eleosoma sobre la semilla de *T. diffusa*

## 8.2 Prueba histoquímica al eleosoma de la semilla.

Las células epidérmicas del eleosoma presentan depósitos de proteínas, aceites y granos de almidón (Figura 6).

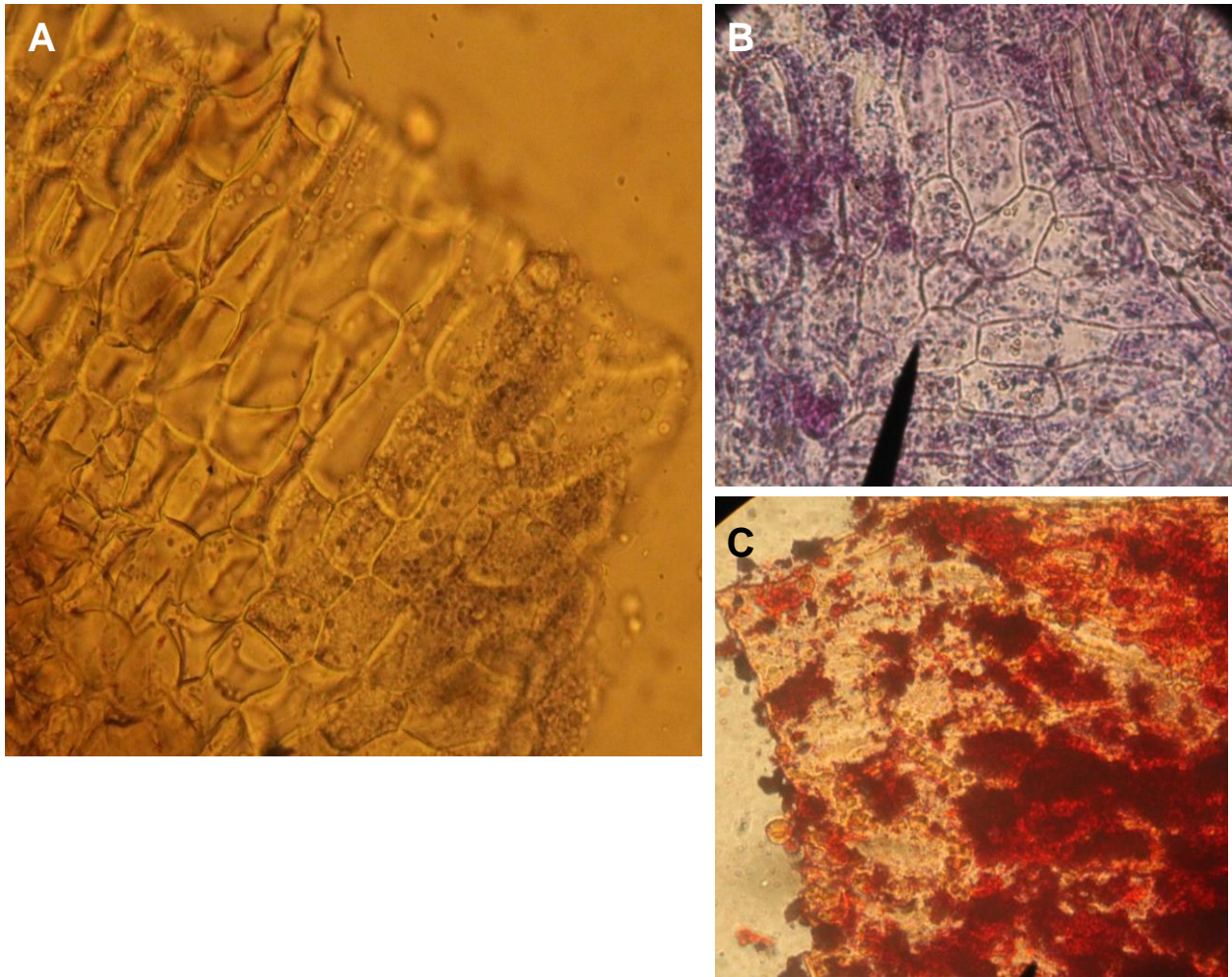


Figura 6. Características histoquímicas al eleosoma de la semilla de *T. diffusa*. A. tinción con lugol de contenidos de almidón en las células epidérmicas del eleosoma. B. tinción con de contenidos proteínicos en la epidermis del eleosoma. C. Tinción con Sudan III, de gránulos de aceites en las células epidérmicas de *T. diffusa*. Aumento 40x.



### 8.3 Análisis de viabilidad

En la prueba de tetrazolio no existen diferencias significativas en el porcentaje de tinción entre las semillas de *T. diffusa* colectadas en los años 2016 y 2017 ( $t= 0.200$ ,  $g.l.= 33.606$ ), igualmente, no existe diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad con respecto a la concentración de solución de tetrazolio y el tiempo de exposición a la solución ( $t= 2.042$ ,  $g.l.=$ ). Para las semillas colectadas en el año 2016, la concentración de solución de tetrazolio a 1% durante 2 h y 40°C alcanzó la viabilidad máxima con un 60% de semillas teñidas en su totalidad y 40% registró tinción nula. En cambio, el tratamiento a concentración de 1%, 3 h y 40°C registró el porcentaje menor de tinción de semillas con un 23% de semillas teñidas y 77% sin presentar tinción (Figura 7).

En contraste, las semillas colectadas en el año 2017 presentan la máxima viabilidad bajo el tratamiento a concentración 0.5% de solución de tetrazolio, durante 3 h y 40°C obteniendo un 60% de semillas teñidas y 40% de tinción nula. A concentraciones de 0.5%, durante 2 horas y 40°C se registró el menor porcentaje de tinción con 40% de semillas teñidas y 60% sin tinción de los órganos (Figura 8). La viabilidad de las semillas de *T. diffusa* no se vio afectada por el tiempo de almacenamiento, ya que ambos lotes obtuvieron un máximo de 60% de tinción de semillas (figura 9).

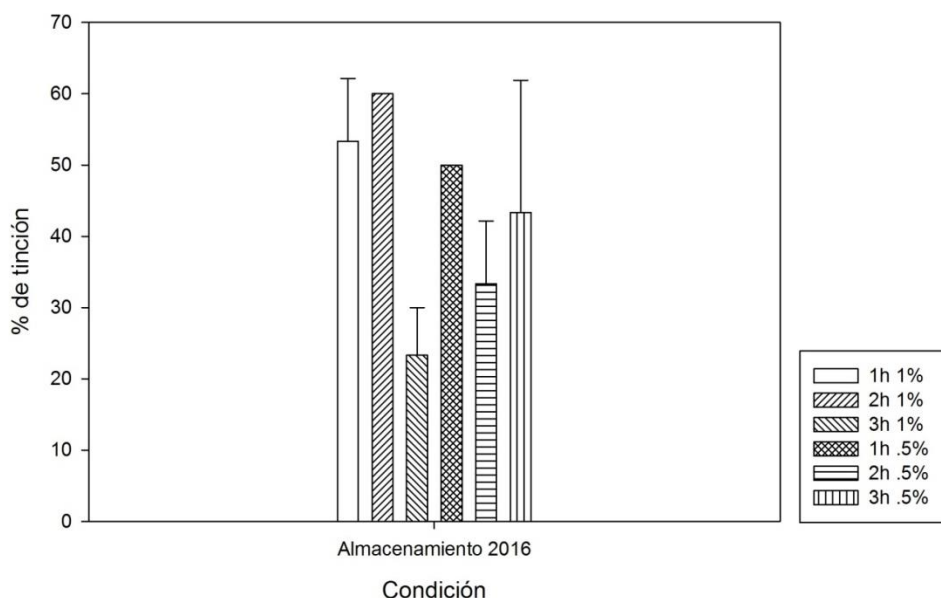


Figura 7. Porcentaje de tinción en semillas viables de *T. diffusa* colectadas en año 2016.

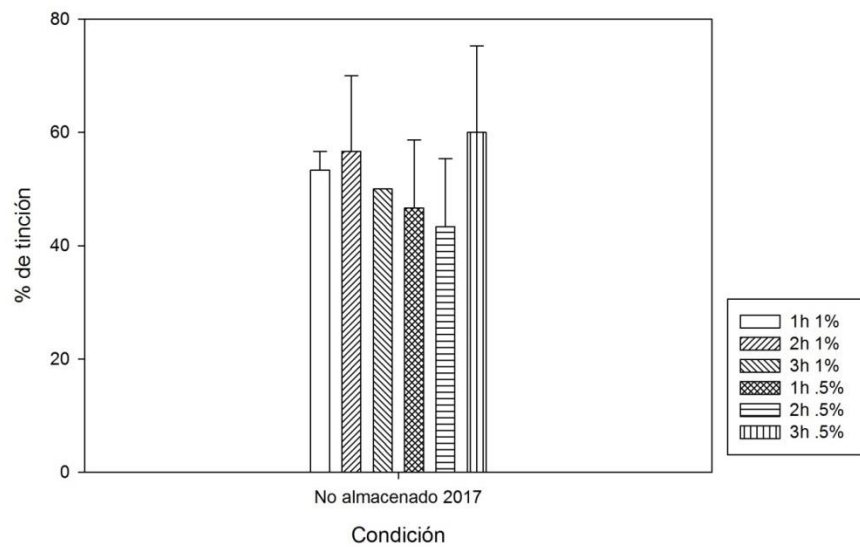


Figura 8. Porcentaje de tinción en semillas viables de *T. diffusa* sin almacenamiento, colectadas en el años 2017.

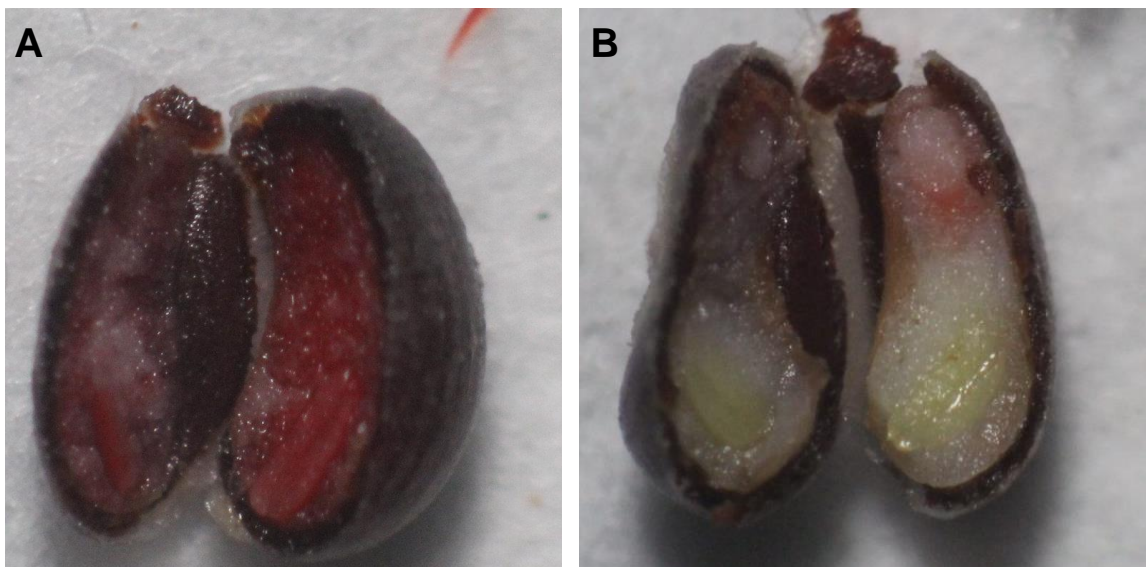


Figura 9. Embriones de *T. diffusa* sometidos a la prueba de tetrazolio bajo concentraciones de 0.5% y 1%. A. Semilla viables de *T. diffusa* bajo concentración de 1% durante 2h. B. Semillas inviables de *T. diffusa* bajo concentración de 0.5% por 1 h.

#### 8.4 Germinación de semillas de *T. diffusa*

El porcentaje de germinación de *T. diffusa* fue significativamente distinto entre los tratamientos pre germinativos y las distintas concentraciones de giberelinas ( $X^2= 66.048$ ,  $g.l.= 4$ ,  $p<0.0001$ ). Con base en los contrastes por pares, existen diferencias significativas entre todos los tratamientos pregerminativos analizados. En cuanto a la aplicación de ácido giberélico, no existen diferencias significativas entre las concentraciones de 300 ppm y 500 ppm ( $X^2= 0.360$ ,  $g.l.= 1$ ,  $p=0.54$ ); pero existen diferencias significativas entre la variable control y las concentraciones de 300 ( $X^2= 18.622$ ,  $g.l.= 1$ ,  $p=0.00001$ ) y 500 ppm ( $X^2= 12.965$ ,  $g.l.= 1$ ,  $p=0.0003$ , cuadro 3).

Bajo el tratamiento pregerminativo sin condiciones de hormiguero, con eleosoma (lote 3) a 500 ppm de AG<sub>3</sub> *T.diffusa* se mostró un mayor porcentaje de germinación (36%, Figura 10). La germinación de semillas del lote 3 con 500 ppm de AG<sub>3</sub>, comenzó al sexto día del experimento, logrando el máximo porcentaje de germinación (36%) a los 28 días. Por otra parte, las semillas del lote 3 con 300 ppm de AG<sub>3</sub> obtuvieron un porcentaje de germinación de 32%, iniciando su proceso de germinación al día diez del experimento y estabilizándose al día 34. Finalmente, sin la aplicación de AG<sub>3</sub>, el lote 3 alcanzó un porcentaje de germinación de 12.5 % iniciando la germinación el día 17 y estabilizándose el día 39.

El tratamiento del lote 1 bajo condiciones de hormiguero, sin la presencia del eleosoma, alcanzó un porcentaje máximo de germinación del 16% a 500 ppm de AG<sub>3</sub>. La germinación de este tratamiento inició el día 13 del experimento, sin mostrar evidencia de nuevas plántulas después del día 37. Las semillas del lote 1 a concentración de 300 ppm de AG<sub>3</sub> obtuvieron un porcentaje de germinación de 15%, iniciando su germinación el día 9 del experimento y estabilizándose el día 34. Por último, el lote 1 sin la aplicación de AG<sub>3</sub> obtuvo un porcentaje máximo de germinación del 2.5%. La germinación de este tratamiento inició el día 13, sin la aparición de nuevas plántulas al día 34.

Finalmente, las semillas del lote 2 obtuvieron un porcentaje de germinación del 10% a 500 ppm de AG<sub>3</sub> y un 8% a 300 ppm. La germinación de este lote en ambas concentraciones inició el día 13 del experimento, estabilizándose el día 27 y el día 31, a concentraciones de 300 y 500 ppm respectivamente. Sin la aplicación de AG<sub>3</sub> se alcanzó un porcentaje de germinación de 1.66%, al día 31 del experimento, siendo este último tratamiento el que inicia su germinación en un periodo de tiempo mayor.

Después de 31 días, la germinación de las semillas de *T. diffusa* se detiene en la mayoría de los tratamientos propuestos. El comportamiento de la germinación en semillas de *T. diffusa* se muestra irregular ya que la germinación oscila entre los seis y 39 días (figura 11).

Cuadro 3. Contrastes por pares del porcentaje de germinación de los tratamientos pre germinativos y las concentraciones de AG<sub>3</sub>.

Tratamiento	Lote 1 <i>p</i>	Lote 2 <i>p</i>	Lote 3 <i>p</i>
Lote 1	-	0.0133	<0.0001
Lote 2	0.0133	-	<0.0001
Lote 3	< 0.0001	<0.0001	-
AG <sub>3</sub>	Control <i>p</i>	300 <i>p</i>	500 <i>p</i>
Control		<0.0001	0.0003
300	<0.0001	-	0.54
500	0.0003	0.54	-



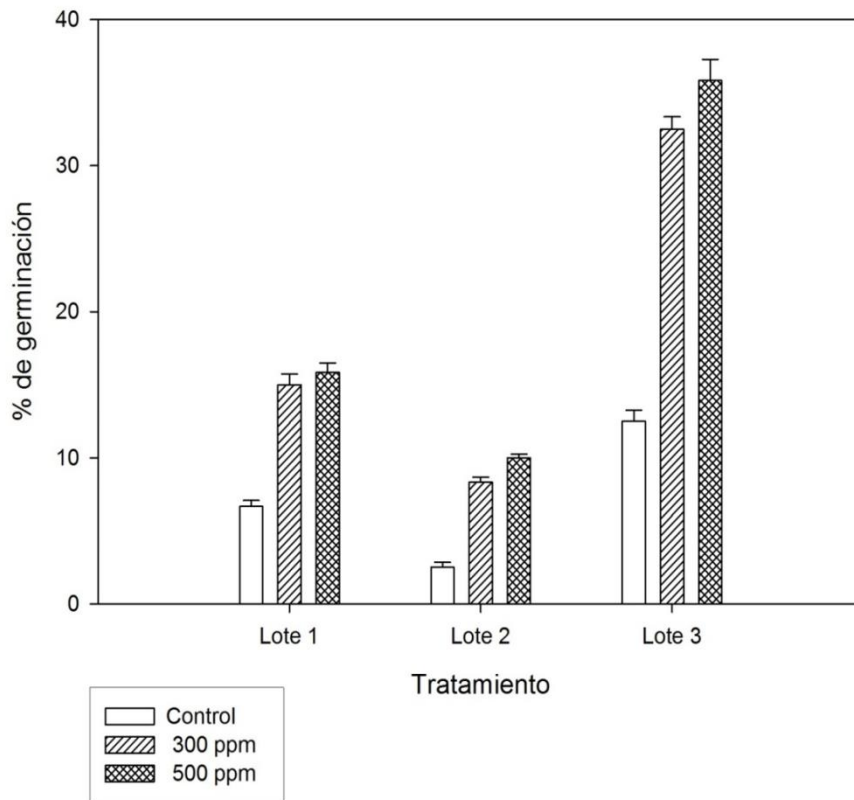


Figura 10. Porcentaje de germinación de semillas de *T. diffusa* bajo dos distintos tratamientos pregerminativos: simulación de condiciones de hormiguero (18°C, 70% Hr, 24 h oscuridad) y temperatura ambiente, con dos concentraciones de AG3, 300, 500 y un control sin aplicación de. Lote 1, condiciones de hormiguero sin presencia de eleosoma. Lote 2, sin condiciones de hormiguero con presencia de eleosoma. Lote 3 sin condiciones de hormiguero sin eleosoma.

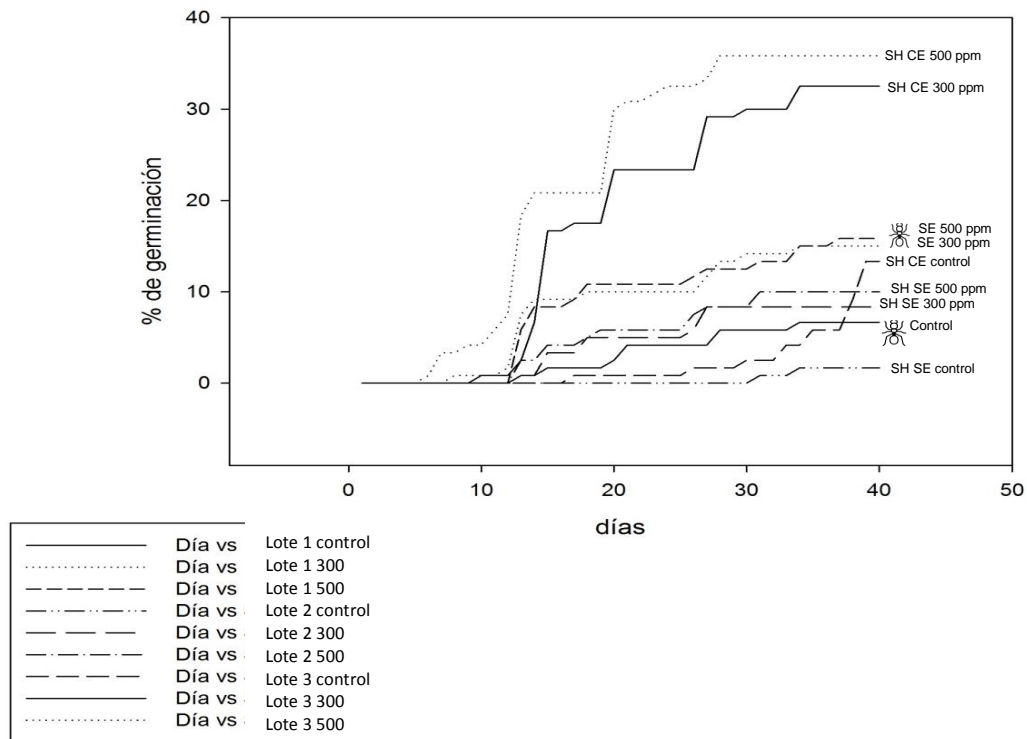


Figura 11. Velocidad de germinación de las semillas de *T. diffusa* en un periodo de a 40 días. Lote 1, condiciones de hormiguero sin presencia de eleosoma. Lote 2, sin condiciones de hormiguero con presencia de eleosoma. Lote 3 sin condiciones de hormiguero sin eleosoma

## 9. DISCUSIÓN.

*T. diffusa* presenta características morfológicas en cuanto a un tamaño de semillas promedio, color de semillas maduras e inmaduras, forma y peso, que concuerdan con los caracteres propuestos por el trabajo de Gonzales, (2013) acerca de las características morfológicas de las semillas del género *Turnera*. La caracterización morfológica de semillas constituye un aporte al reconocimiento de las características ideales de las semillas para el manejo agronómico de la especie *T. diffusa*, además, resulta de utilidad el análisis de los caracteres morfológicos para estudios ecológicos y de conservación (Lovey, 2010).

Gonzales (2013) usa el término arilo para denominar a los apéndices carnosos que presentan las semillas del género *Turnera*. Sin embargo, de acuerdo con los caracteres obtenidos en las pruebas histoquímicas, el arilo de la semillas de *T. diffusa* puede considerarse un eleosoma, ya que cumple con las

características de este tejido, por contener sustancias de reserva como proteínas, aceites y almidón (Font Quer, 2001 y Cuautle, 2004). La presencia de eleosomas en el género *Turnera* solo ha sido documentado para las especies *T. ulmifolia* (Cuautle, 2004) y *T. subulata* (Rocha, 2018), con esta investigación, la especie *Turnera diffusa* Willd ex. Schult se incluye a las especies del género *Turnera* que presenta un eleosoma.

El procedimiento en la prueba de tetrazolio es útil para distinguir entre semillas viables y no viables (Rodríguez-Quillón, 2008). Las semillas de *T. diffusa* exhibieron un 60% de viabilidad con la prueba de tetrazolio, sin haber diferencias significativas entre el tiempo de almacenamiento de las semillas y el porcentaje de viabilidad. Las semillas de *T. diffusa* son ortodoxas (CONAFOR, 2013), por lo que pueden almacenarse por largos periodos de tiempo y conservar su viabilidad.

Los resultados de la prueba de tetrazolio permitieron observar que había semillas latentes en los experimentos de germinación, ya que el porcentaje de viabilidad (60%) fue mayor al porcentaje de semillas germinadas (36%). La aparición de una mayor cantidad de semillas no viables de *T. diffusa* podría estar relacionado con problemas de polinización. Caso similar ocurre con las especies *Annona cherimola* L. y *Hechtia perotensis* (Bromeliaceae), las cuales presentan baja viabilidad, mayor porcentaje de semillas latentes y bajo porcentaje de germinación (Lobo, 2007 y Elizalde, 2016).

La sensibilidad de la prueba de tetrazolio mostró que las semillas colectadas en el año 2016, ocuparon mayor concentración de tetrazolio (1%) para obtener el porcentaje de viabilidad total, por otra parte, las semillas colectadas en el año 2017 ocuparon menor concentración de tetrazolio (0.5%) para observar la viabilidad de las semillas, por lo que se recomienda tomar en cuenta el tiempo de almacenamiento y el tiempo de exposición a la solución de tetrazolio para observar la viabilidad real de las semillas.

La propagación por semilla de *T. diffusa* se ha abordado en la literatura por Viesca (1983), aplicando ácido giberélico para la ruptura de latencia en

concentraciones de 200 y 800 ppm alcanzando un 25% de germinación a 800 ppm en un periodo de 30 días. En este estudio se alcanzó un 36% y 31% de germinación a concentraciones de 500 y 300 ppm respectivamente. Se obtuvo un porcentaje de germinación superior al de la investigación realizada por Viesca (1983), esto puede deberse al hecho de que el autor condujo la evaluación a 30 días, tiempo máximo para la categorización de la germinación de las semillas no latentes.

El tratamiento pregerminativo imitando las condiciones ambientales de un hormiguero y remoción mecánica de eleosoma no promovió un aumento en el porcentaje de germinación de las semillas de *T. diffusa*, caso similar con lo reportado por Cuautle (2004) y Rocha (2018) donde las especies de hormigas estudiadas fueron atraídas por el eleosoma y consumieron la estructura; sin embargo, ninguna de las hormigas asociadas favoreció un aumento en el éxito de la germinación de semillas de *T. ulmifolia* y *T. subulata*. Los resultados de este estudio bajo condiciones de laboratorio muestran que la remoción del eleosoma no es el factor que genera un beneficio en la germinación, aunque debe considerarse el beneficio de dispersión por parte de las hormigas.

Los factores ambientales como la precipitación, la temperatura y la irradiación, afectan a las plantas madre y la calidad de las semillas en desarrollo, lo que repercute en la capacidad germinativa de las semillas (Elizalde, 2016). Los resultados del tratamiento sometido a condiciones de hormiguero pasaron por condiciones climáticas específicas, entre ellas un periodo prolongado de oscuridad, y temperatura menor, lo cual pudo alargar el letargo en las semillas de *T. diffusa*. De acuerdo con Reyes-Bautista (2005), el factor luz afecta la germinación por su intensidad y duración (fotoperiodo), en este caso, *T. diffusa* presenta semillas pequeñas y livianas, característica que les permite enterrarse en el suelo y formar bancos de semillas, las cuales tienen requerimientos de luz específicos para alcanzar valores altos de germinación (Funes, 2009).

Los resultados de la prueba de germinación con la adición de AG<sub>3</sub> mostraron que las semillas de *T. diffusa* presentan latencia primaria, la cual

proviene directamente de la planta madre (Hartmann, 2012) ya que las semillas de damiana mostraron permeabilidad con agua de riego, lo que puede descartar una latencia morfológica. Sin embargo dichas semillas no germinaron en su totalidad en un periodo de 40 días. Márquez (2013) menciona que en la latencia de semillas depende del cociente entre ABA/ AG<sub>3</sub>, es decir alta concentración del ABA o una baja sensibilidad al AG<sub>3</sub> inhibe la germinación, por los resultados obtenidos en este estudio, *T. diffusa* podría presentar baja sensibilidad al AG<sub>3</sub>, aunado a factores climáticos y edafológicos, que sugieren estudios posteriores para afirmar esta hipótesis.

Gómez (1997), reportó para la especie *E. characias* que la presencia del eleosoma tiene un efecto negativo en la emergencia de las plántulas, caso contrario a lo que ocurre con *T. diffusa*, donde las semillas que conservaron el eleosoma tuvieron un efecto positivo en el porcentaje de germinación, sin embargo concuerdan los resultados en la aparición de hongos en el eleosoma de las semillas de *T. diffusa*, por lo que en un enfoque productivo es necesario tratar las semillas con anti fúngicos. Se han encontrado estudios donde la manipulación de las semillas por hormigas en mejora la germinación. Cuautle (2004) hace referencia a que las hormigas pueden dar un beneficio en la germinación de forma indirecta como la liberación de químicos, que ofrezca protección contra hongos.

Durante el consumo del eleosoma las hormigas pueden inyectar sustancias salivales y promover la escarificación que optimiza el proceso de germinación (Rocha, 2018). Gonzales (1998) propone que las hormigas, al eliminar el eleosoma producen un raspado en la semilla que puede influir en la emergencia de la plántula. En el caso de *T. diffusa* es probable que estas variables aumenten su porcentaje de germinación en condiciones naturales; sin embargo, los resultados de este estudio bajo condiciones de laboratorio muestran que la remoción del eleosoma no es el factor que genera un beneficio en la germinación.

Se propone llevar estudios posteriores sobre pruebas directas con hormigas para evaluar el efecto en el porcentaje de germinación de las semillas de

*T. diffusa*, así como estudios sobre la efectividad de la polinización. Además, hacen falta estudios de ecología de población para determinar la capacidad de colonización de la especie en su hábitat, por último, se propone llevar a cabo análisis de los microorganismos en el suelo, que pueden estar asociados a la especie o a los hormigueros, los cuales pueden influir en la germinación de *T. diffusa*, con la finalidad de recrearse en condiciones contraladas, que aporten con un porcentaje de germinación mayor para el establecimiento de cultivos comerciales de damiana.

A pesar de que el método eficaz para la propagación de *T. diffusa* es por estacas, la ventaja que ofrece el trabajo, en cuanto a la propagación sexual de *T. diffusa* es que permite mantener la información genética de la especie, tanto en cuestiones de producción, mejoramiento genético, domesticación y de conservación.

## **10. CONCLUSIÓN**

Este estudio mostró que las semillas maduras e inmaduras de *T. diffusa* muestran una diferencia de tamaño de. Ambos tipos de semillas tienen forma curvada y en cuanto a color varía. Los caracteres morfológicos de las semillas de *Turnera diffusa* Willd ex. Schult, constituyen un aporte al reconocimiento de la especie en campo, además desde un punto de vista agronómico, ofrece un aporte al reconocimiento de la etapa madurez y el reconocimiento de la especie para la producción propiedades medicinales y para su conservación.

A partir de los resultados de este estudio, se demuestra la presencia de sustancias de reserva como proteínas, aceites y almidón en el arilo de las semillas de *Turnera diffusa* Willd ex. Schult, pudiendo definir este tejido como eleosoma, característico de la interacción con hormigas cosechadoras.

Con imbibición en una solución de tetrazolio a concentración de 1% durante 2h a 40°C permitió evaluar de forma eficiente la viabilidad que presentan las semillas de damiana. Los resultados obtenidos en la prueba de viabilidad permiten discernir entre semillas viables y no viables a concentraciones de 0.5 y

1%, lo que indica que para las semillas de cada género y especie es necesario un estudio detallado en tiempos, temperaturas y concentraciones

La presencia de eleosoma en las semillas de damiana y la concentración de ácido giberélico influyó en la germinación con valores superiores, en comparación con los resultados obtenidos sin la aplicación de ácido giberélico y sin la presencia de eleosoma, con un efecto complementario entre la luz, temperatura y humedad de germinación.

El efecto de la aplicación de AG<sub>3</sub> en la germinación de las semillas de *T. diffusa* indican que las semillas presentan una latencia fisiológica. La latencia en semillas de damiana corresponde a la categoría de primaria fisiológicas, la cual puede romperse a través de la imbibición previa en ácido giberélico. Al no haber diferencias significativas en la concentración de ácido giberélico, la latencia en las semillas de damiana puede romperse a 300 o 500 ppm durante 24 horas a 28°C y 12/12 de fotoperiodo obteniendo un 36% de germinación.

#### **11. LITERATURA CITADA.**

- Agencia para el desarrollo internacional para Estados Unidos (USAID)., 2010. Plantas medicinales y aromáticas, una alternativa de producción comercial. Paraguay.
- Aguilar, M., 1996. Teaching Plant Anatomy. Through creative laboratory exercises. Ottawa. Ontario. P 161.
- Alcaráz, L., 2008. Tecnología para el cultivo de Damiana. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C (CIBNOR), La Paz, Baja California Sur, México.
- Alvarado-Cardenas, O., 2006. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo Turneraceae. Departamento de Botánica. Instituto de Biología UNAM. 43: 1-7.
- Belmares, R., 2013. Actividad Cito-Tóxica de Extractos de *Turnera diffusa* Fermentada y no Fermentada. Universidad Autónoma de Coahuila. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 5(9): 1-4. México.
- Botanical Journal of the Linnean Society., 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal, 181, 1–20.

- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR)., 2013. *Turnera diffusa* Willd ex Schult. Paquete tecnológico. México.
- Corner, E., 1976. *The Seeds of Dicotyledons*. Cambridge: University Press.
- Cuautle, M., 2004. Defensa y dispersión en *Turnera ulmifolia* (Turneraceae): Una aproximación multiespecífica. Xalapa, Veracruz; México.
- Doria, J., 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. Revista cultrop. La Habana, Cuba. 31 (1): 3-5.
- Elizalde, V., García, R., Peña, C., Ybarra, M., 2016. Viabilidad y germinación de semillas de *Hechtia perotensis* (Bromeliaceae). México. Revista de Biología tropical. 65 (1): 153-165.
- Fernández, F., 2003. Introducción a las Hormigas de la región Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia.
- Flores, J., Pérez-Sánchez, R., Jurado, E., 2017. The combined effect of water stress and temperature on seed germination of Chihuahuan Desert species. Journal of Arid Enviroments.
- Font Quer, P. 2001. Diccionario de Botánica. Barcelona. Editorial Labor. Segunda edición.
- Funes, G., Diaz, S., Venier, P., 2009. La temperatura como principal determinante de la germinación en especies del Chaco seco de Argentina. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Revista Ecología Austral. 19:129-138.
- García, E., 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de köppen. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía. 5ta edición. México.
- Gómez, C., Espadaler, X., 1997. Manipulacion por hormigas de semillas de *euphorbia characias* (euphorbucaeae) dentro del hormiguero. Departamento de Ciencias ambientales. Universidad de Girona. Revista SCIENTIA gerundensis. 23: 53-61.
- Gonzales, M., Arbo, M., 2013. Morfoanatomía del óvulo y la semilla en *Turnera* y *Piriqueta* (Turneraceae). Instituto de Botánica del Nordeste - CONICET, Corrientes, Argentina. Revista Botanical Sciences, 91 (4), 1-18.
- Hartmann, F., 2002. Hartmann and Kester's Plant propagation: principles and practice. University of California. Editorial PEARSON.
- Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal (INAFED)., 2013. Peñamiller. Enciclopedia de los municipios y Delegaciones de México. Querétaro, Qro.



- Juárez-Rosete, C., Águila, J., Bugarín, R., Juárez, P., Cruz, E. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e Innovación. *Revista Bio Ciencias*. 2(3): 119-129.
- Kunklinski, C., 2003. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona, España. Editorial OMEGA, 2<sup>da</sup> edición.
- Lobo, M., Delgado, O., Cartagena, J., Fernández, F., Medina, C., 2007. Caracterización de la germinación y la latencia de semillas de chirimoya (*Annona cherimola* L.) y guanábana (*Annona muricata* L.), como apoyo a programas de conservación de germoplasma. Universidad Nacional de Colombia. *Revista Agronomía Colombiana*. 25(2):231-244.
- Lovey, R., 2010. Caracterización de semilla, germinación y plántula de *Cologania broussonetii* (Balb.) DC. Universidad Nacional de Córdoba. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 79: 5-10. Córdoba, Argentina.
- Magallán F., Alvarado, A., Ocampo, R., 2015. Informe técnico: protocolos de propagación de plantas nativas aromáticas y medicinales con uso potencial en la industria farmacéutica y cosmética. Fondo de vinculación tecnológica. Universidad Autónoma de Querétaro. pp 52.
- Márquez, J., Collazo, M., Martínez, M., Orozco, A., Vázquez, S. 2013. Biología de las angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez, M., 2013. Ecología y usos de especies forestales de interés comercial de las zonas áridas de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México.
- Osuna, E., y Meza, R. 2000. Producción de Plantas y Establecimiento y Manejo de Plantaciones de Damiana (*Turnera diffusa* Willd). *Folleto Técnico Núm. 4*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noroeste Campo Experimental Todos Santos. La Paz, B.C.S., México. 25 p.
- Reyes-Bautista, Z., Roríguez, D., Efecto de la luz, temperatura y tamaño de semilla en la germinación de *Nolina parviflora* (h.b.k.) hemsl. Universidad Autónoma Chapingo Chapingo, México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 11(2):99-104.
- Rocha, M., Cristaldo, P., Cruz, J., Ferreira, D., Araujo, A., 2018. Ants associated with *Turnera subulata* (Turneraceae): Elaiosome attraction, seed dispersion and germination. *Sociedade entomológica do Brasil*.
- Rodríguez-Quillón, I., 2008. Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.

- Soriano, Ll., 2013. Contenido antioxidante en Damiana (*Turnera diffusa* Willd) y factores que lo modifican: Condiciones ambientales de cultivo y manejo postcosecha. Centro de Investigaciones biológicas del noroeste, S. C., México.
- Tschinkel, W., Kwapich, C., 2016. The Florida Harvester Ant, *Pogonomyrmex badius*, Relies on Germination to Consume Large Seeds. Revista Plos One. 11(11): 166- 907.
- Viesca, F. 1983. Rompimiento de latencia en damiana (*Turnera diffusa* Willd). Tesis (Ing. Agr. Esp. en Fitotecnia) UACH. Departamento de Fitotecnia.
- Villasana, A., Cerda, R., Herrera, R., Aguilar, N., 2009. Estudios biotecnológicos para el aprovechamiento de la damiana. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Coahuila. CIENCIACIERTA No.17. México.
- Villaseñor, J., 2016. Checklist of the native vascular plants of México. Universidad Nacional Autónoma de México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 87(3): 559-902. Distrito Federal, México.