



# Semillas y plántulas de *Myrciaria dubia* “camu-camu”: biometría, germinación y crecimiento inicial

## Seeds and plantlets of *Myrciaria dubia* “camu-camu”: biometry, germination, and initial growth

Anderson E. Medina Bardales<sup>1</sup>, Evelyn G. Córdova Pisco<sup>1</sup>, Anthony J. Fasabi Flores<sup>1</sup>, Napoleón Rodríguez Mashacuri<sup>1</sup>, Marianela Cobos Ruíz<sup>1</sup>, Sixto A. Imán Correa<sup>2</sup>, Juan C. Castro Gómez<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Unidad Especializada de Biotecnología (UEB). Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). AAHH Nuevo San Lorenzo, Pasaje Los Paujiles S/N. San Juan Bautista, Iquitos-Perú. Código Postal: 16001.

<sup>2</sup> Recursos Genéticos Vegetales. Estación Experimental Agraria "San Roque"-Loreto. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Calle San Roque # 209. San Juan Bautista, Maynas, Loreto.

Recibido 30 diciembre 2013. Aceptado 05 mayo 2014.

### Resumen

Los objetivos planteados fueron determinar la biometría de las semillas, registrar la respiración celular en el proceso de imbibición, evaluar el efecto inductor de la germinación de compuestos químicos y analizar el crecimiento inicial. La respiración celular durante la imbibición se midió por reducción del azul de metileno y del Janus Green B. El efecto inductor de la germinación de cinco compuestos químicos fue evaluado. El crecimiento inicial se registró con estereoscopio. Los resultados mostraron que las semillas tienen en promedio un peso de  $520 \pm 172$  mg, largo de  $13,50 \pm 1,76$  mm, ancho de  $10,61 \pm 1,14$  mm y espesor de  $4,68 \pm 0,62$  mm. Estas variables mostraron correlaciones significativas ( $r$  de 0,494 a 0,897 y  $p < 0,001$ ). Las semillas fueron metabólicamente activas durante la imbibición, el cual se evidenció por la reducción de ambos aceptores electrónicos. El nitrito de sodio y el cianuro de potasio indujeron la germinación de las semillas en  $>90\%$  y  $65\%$  respectivamente. El crecimiento hasta plántula constó de seis etapas y ocurrió en un periodo de 22 días después del brote de la radícula. En conclusión, las semillas de *M. dubia* muestran una amplia variación en sus datos biométricos (peso, largo, ancho y espesor), pero muestran correlaciones significativas entre sí. Asimismo, las semillas son metabólicamente activas en el proceso de imbibición y su germinación es inducida por el nitrito de sodio y el cianuro de potasio. Además, el crecimiento inicial hasta plántula ocurre en un periodo de 22 días después del brote de la radícula y consta de seis etapas bien diferenciadas.

**Palabras clave:** frutal amazónico, imbibición, inductor de germinación, metabolismo.

### Abstract

The objectives were to determine seed biometrics, recording cellular respiration in the imbibition process, evaluate the effect of inducing chemicals in germination and early growth analysis. Cellular respiration during imbibition was measured by reduction of methylene blue and Janus Green B. The inductor effect of five chemical compounds in germination was evaluated. Initial growth was recorded by stereoscopic. Results showed that the seeds have an average weight of  $520 \pm 172$  mg, length of  $13.50 \pm 1.76$  mm, width of  $10.61 \pm 1.14$  mm, and thickness of  $4.68 \pm 0.62$  mm. These variables showed significant correlations ( $r$  of 0.494 to 0.897 and  $p < 0.001$ ). Seeds were metabolically active during imbibition, which was evidenced by reduction of both electronic acceptors. Sodium nitrite and potassium cyanide induced germination of seeds in  $>90\%$  and  $65\%$  respectively. Seedling initial growth consisted of six stages and occurred over a period of 22 days after radicle emergence. In conclusion, *M. dubia* seeds show wide variation in their biometrics (weight, length, width and thickness), but show significant correlations with each other. Likewise, seeds are metabolically active in imbibition process, and germination is induced by sodium nitrite and potassium cyanide. Furthermore, seedling initial growth to occur over a period of 22 days after emergence of the radicle and consists of six distinct stages.

**Keywords:** Amazonian fruit, imbibition, germination inductor, metabolism.

\* Autor para correspondencia

E-mail: [juanccgomez@yahoo.es](mailto:juanccgomez@yahoo.es) (J. Castro)

## 1. Introducción

*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh “camu camu”, es un frutal amazónico que está teniendo más atención por sus características peculiares e introducción en los mercados mundiales. La importancia está en que sus frutos presentan altos contenidos de vitamina C, que pueden alcanzar 3 g por 100 g de pulpa, equivalente a casi 30 veces el de la pulpa de cítricos como la naranja, limón y mandarina. Además, contiene diversos compuestos antioxidantes (Imán y Melchor, 2011). Por tanto, tiene proyecciones para convertirse en un frutal nativo con gran potencial económico en la Amazonía peruana.

Para satisfacer la creciente demanda de los mercados nacionales e internacionales, es necesario aumentar las áreas sembradas de *M. dubia* y potenciarlo como producto bioecológico amazónico con calidad para exportación, que redundará en más oportunidades de trabajo y mayores divisas para la región (Maco, 2002). Sin embargo, las especificaciones precisas para el desarrollo de metodologías con dicha finalidad en especies de la familia *Myrtaceae* son escasas (Latsague *et al.*, 2010).

Además, muchos aspectos básicos de la biología de *M. dubia* son desconocidas o poco estudiadas, tales como la morfometría de semillas, biología de los procesos de imbibición, germinación y crecimiento inicial. Aunque Uchiyama *et al.* (1996), reportan datos morfométricos y evalúan la germinación de semillas de *M. dubia*, pero sus resultados son limitados debido a las pocas muestras que analizaron. También, Maco (2002) compararon la germinación de semillas en sustratos embebidos con agua de diferentes ríos amazónicos, consiguiendo el mayor porcentaje de germinación (96%) a los 120 días en un sustrato con agua del Río Nanay. Sin embargo, no realizaron una evaluación minuciosa de los procesos de imbibición, germinación y desarrollo inicial.

Por tanto, para incrementar y complementar la información científica básica de *M. dubia* de los procesos mencionados y en un futuro podamos generar variedades élites mejoradas de la especie que puedan ajustarse a las exigencias mundiales de calidad, se planteó como objetivos de la presente investigación: 1) determinar la biometría de las semillas de *M. dubia*, 2) registrar la respiración celular en el proceso de imbibición, 3) evaluar el efecto inductor de la germinación de compuestos químicos y 4) analizar el crecimiento inicial de *M. dubia*.

## 2. Material y métodos

### 2.1. Área de estudio

El presente trabajo se realizó de febrero a abril del 2013, en las instalaciones de la Unidad Especializada de Biotecnología (UEB) del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP).

### 2.2. Material biológico

Las semillas de *M. dubia* fueron obtenidas a partir de frutos maduros muestreados en la Colección Nacional de Germoplasma, Campo Experimental El Dorado, de la Estación Experimental Agraria San Roque-Loreto, INIA; ubicada en el km 25½ de la carretera Iquitos-Nauta (3°57'22,95"S y 73°24'46,91"O). Los frutos fueron transportados en cajas de tecnopor a las Instalaciones del INIA donde se procedió a despulpar y lavar las semillas con agua potable y fueron conservadas sumergiéndolas en agua destilada a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

### 2.3. Biometría de las semillas

En total se obtuvieron 3779 semillas las cuales fueron pesadas en una balanza digital, se midió el largo, ancho y espesor con un vernier digital de 150 mm marca *Professional*. Además, de 100 semillas secas tomadas aleatoriamente, se determinó el porcentaje en peso seco de la cubierta seminal (testa) con respecto al peso total de la semilla.

#### 2.4. Respiración celular durante la imbibición

Se pusieron cinco semillas en seis tubos de ensayo de 25 x 150 mm y en tres tubos se añadió 50 mL del indicador redox Janus Green B 0,1 mM y en los tres tubos restantes se agregó 50 mL del indicador redox Azul de Metileno 0,1 mM. Los tubos de ensayo fueron incubados a 37°C en baño maría. De la parte inferior de los tubos se tomó 1 mL de las soluciones al tiempo 0 y cada 24 horas por 4 días y midió su absorbancia en un rango de longitudes de onda de 400 a 800 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Thermo-Spectronic 6.

#### 2.5. Inducción de la germinación

Trescientos treinta semillas de tamaños y pesos similares fueron imbibidas por 48 horas a 25°C en condiciones de oscuridad. Estas fueron embebidas en grupos de 10 en placas Petri de 90 mm que contenían agar-agar al 6 % como sustrato. Los 11 tratamientos por triplicado fueron los siguientes: A) sustrato, B) sustrato + nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) 5 mM, C) sustrato +  $\text{NaNO}_2$  10 mM, D) sustrato + nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) 5 mM, E) sustrato +  $\text{KNO}_3$  10 mM, F) sustrato + nitroprusiato de sodio (SNP) 250  $\mu\text{M}$ , G) sustrato + SNP 500  $\mu\text{M}$ , H) sustrato + ferrocianuro de potasio ( $\text{KFe}_6(\text{III})_3\text{CN}$ ) 250  $\mu\text{M}$ , I) sustrato + ferrocianuro de potasio 500  $\mu\text{M}$ , J) sustrato + cianuro de potasio (KCN) 250  $\mu\text{M}$  y K) sustrato + KCN 500  $\mu\text{M}$ . En los tratamientos B, C, D y E el sustrato fue mezclado con los compuestos químicos indicados, mientras que en los tratamientos F, G, H, I, J y K, 8 mL del compuesto químico fue puesto en una placa Petri de 55 mm destapada sobre el sustrato, para que el compuesto gaseoso liberado pueda actuar sobre las semillas embebidas en el agar-agar. Las placas fueron selladas con parafilm e incubadas a 25°C, humedad relativa de 85% y con un régimen de luz continua de 100  $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Todas las placas fueron inspeccionadas diariamente y la emergencia de la radícula fue la evidencia de germinación, la que se

constató por observación con un estereoscopio.

#### 2.6. Análisis del crecimiento inicial

Doscientas semillas de tamaños y pesos similares fueron distribuidas en recipientes plásticos de 20x30 cm entre cuatro capas de gasa humedecidas con agua destilada. Los recipientes fueron cubiertos con bolsas negras y mantenidos en un ambiente oscuro a 25°C. Desde el momento de la emergencia de la radícula (22 a 29 días de iniciado el experimento) todos los días se hicieron observaciones en el estereoscopio, mediciones y registros fotográficos hasta la obtención de las plántulas (22 días después de la aparición de la radícula).

#### 2.7. Análisis estadístico

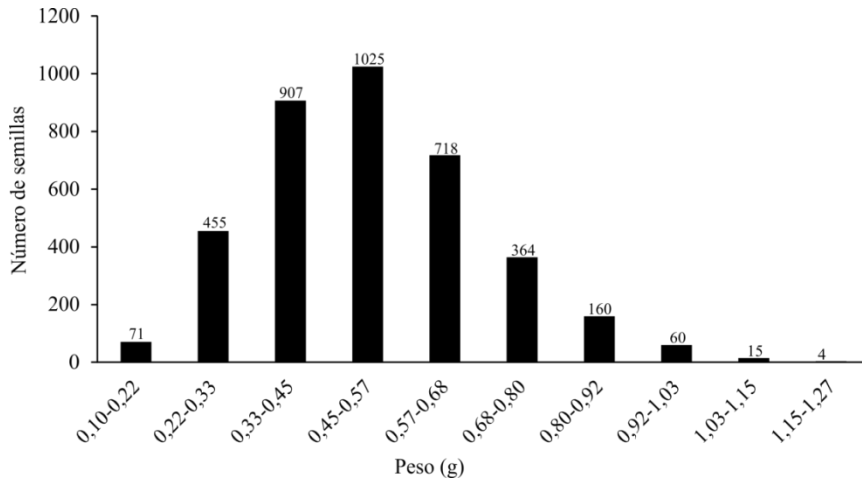
Los datos fueron almacenados en una hoja de cálculo del programa Microsoft Office Excel 2010. De los datos se determinaron las mediciones estadísticas descriptivas (promedio, desviación estándar) y correlación de Pearson con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 21.

### 3. Resultados y discusión

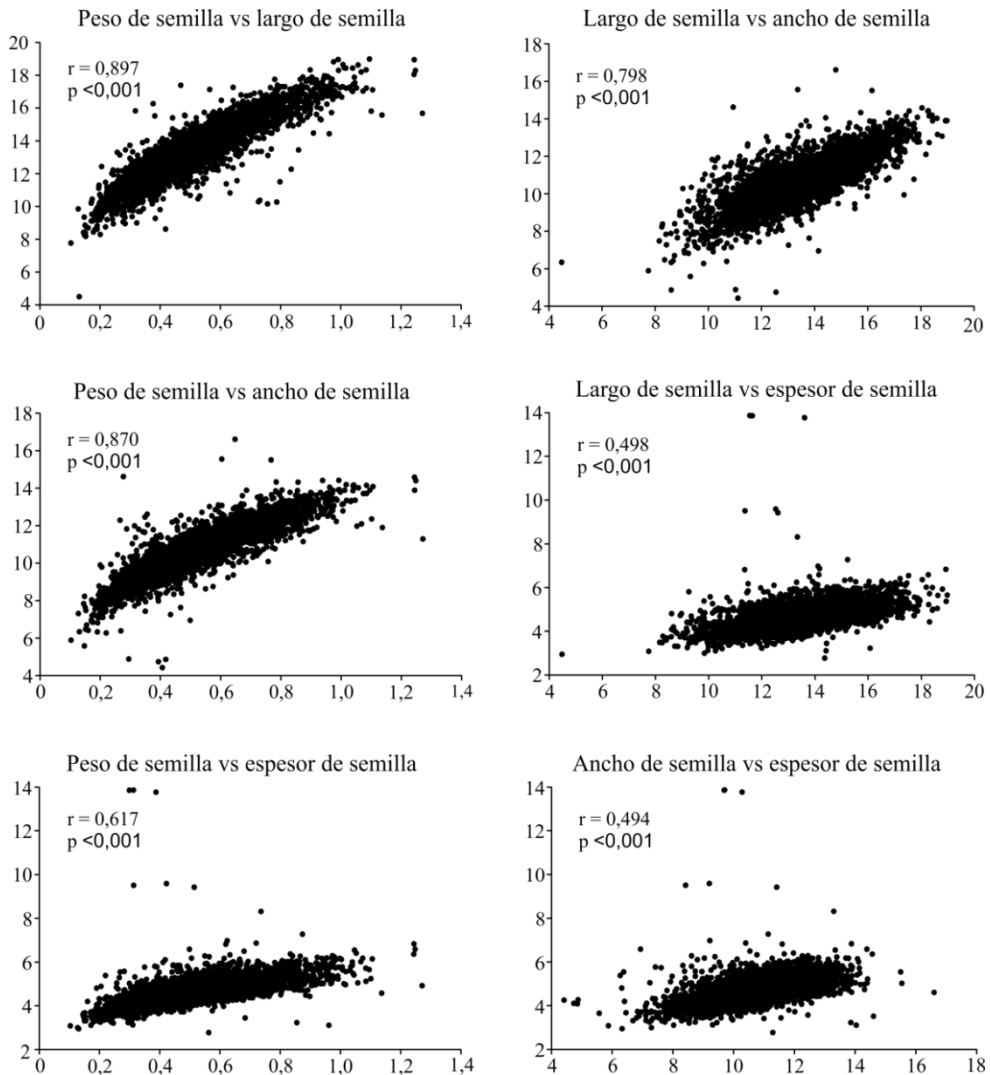
#### 3.1. Biometría de las semillas

Los pesos de las 3779 semillas de *M. dubia* variaron en un amplio rango (0,1 a 1,27 g) y mostraron una distribución normal (Figura 1). Es evidente que el peso de la mayoría de las semillas varió de 0,45 a 0,57 g y en promedio el peso fue  $0,52 \pm 0,17$  g. Este resultado es 1,18 veces mayor que el reportado por Uchiyama *et al.* (1996), quienes solo evaluaron 50 semillas. Asimismo, nuestros resultados coinciden con Imán y Melchor (2011) quienes clasifican a las semillas de *M. dubia* como pequeñas (< 0,5 g), medianas (0,50 a 0,80 g) y grandes (> 0,80 g).

Los otros parámetros biométricos evaluados de las semillas de *M. dubia* también mostraron una amplia fluctuación. Así, en promedio las semillas mostraron valores de  $13,50 \pm 1,76$  mm,  $10,61 \pm 1,14$  mm y  $4,68 \pm 0,62$  mm para el largo, ancho y espesor respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados por Uchiyama *et al.* (1996).



**Figura 1.** Frecuencia de distribución de los pesos frescos de semillas de *M. dubia*.



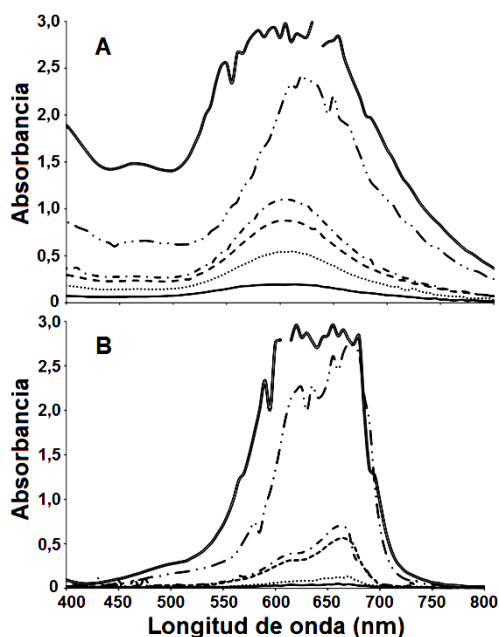
**Figura 2.** Correlaciones entre los parámetros biométricos (peso, largo, ancho y espesor) de las semillas de *M. dubia*.

Todos los parámetros biométricos evaluados de las semillas mostraron correlaciones positivas estadísticamente significativas (Figura 2). Pero las mayores correlaciones positivas ( $r > 0,75$ ) se registraron entre el peso vs largo, peso vs ancho y largo vs ancho de las semillas. Sin embargo, las correlaciones positivas entre los otros parámetros biométricos presentaron un  $r < 0,62$  aunque estas fueron estadísticamente significativas.

Respecto al peso de la testa, se registró que varía de 6,13% a 7,05% ( $6,50 \pm 1,06$  %) del peso seco total de las semillas.

### 3.2. Respiración celular durante la imbibición

Durante la imbibición las semillas de *M. dubia* mostraron una alta tasa de respiración celular (Figura 3). Esto se evidenció por la disminución de las absorbancias de ambos compuestos indicadores redox (Janus Green y Azul de metileno), debido a la reducción de los mismos.

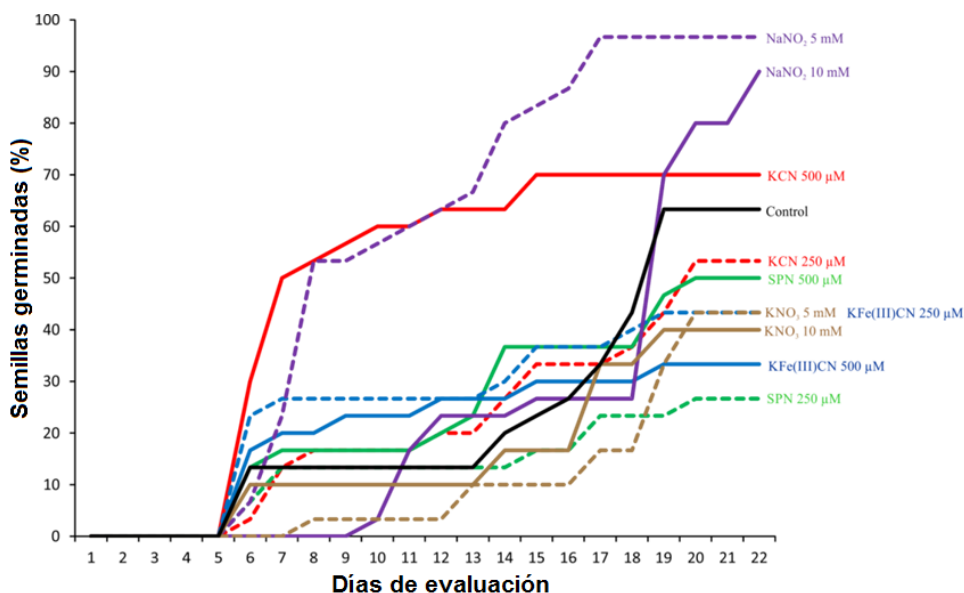


**Figura 3.** Reducción de los indicadores redox Janus Green B (A) y Azul de Metileno (B) por la respiración celular durante la imbibición de las semillas de *M. dubia*. Control (=), día 0 (-.-), día 1 (-.-), día 2 (-.-), día 3 (-.-), día 4 (-).

La reducción de estos indicadores redox se debe a que están recibiendo electrones desde la cadena respiratoria mitocondrial de las células del embrión y de los cotiledones por la activación metabólica inducida por el agua. De acuerdo con Moreno *et al.* (2006), la imbibición es un proceso que ayuda a determinar la viabilidad de las semillas y es crucial para su germinación.

### 3.3. Inducción de la germinación

La germinación de las semillas de *M. dubia* fue inducido diferencialmente por los compuestos evaluados. Así, a los siete días de iniciado el experimento los tratamientos con cianuro y nitrito de sodio fueron más eficientes en inducir la germinación, es decir en interrumpir la latencia de las semillas (Figura 4). Asimismo, al término del experimento (22 días) los más altos porcentajes de germinación se obtuvieron con el nitrito de sodio de 5 mM (96,67%) y 10 mM (90%) y el cianuro a 500  $\mu$ M (65%). Sin embargo, con los demás tratamientos ( $KNO_3$ , SPN y  $KFe(III)CN$ ) se obtuvieron porcentajes de germinación inferiores a los del grupo control (semillas tratadas con agua). Estos resultados difieren a los obtenidos por Bethke *et al.* (2004, 2006) en semillas de *Arabidopsis thaliana*, quienes obtuvieron menos porcentaje de germinación con nitrito de sodio 1,5 mM (50%) que con nitrato de sodio 5 mM (70%). También, varias investigaciones muestran que el nitrato incrementa la germinación de numerosas especies (Bewley y Black, 1994; Kigel y Galili, 1995; Palani *et al.*, 1995; Vincent y Roberts, 1997; Carvalho y Nakagawa, 2000). Por tanto estas diferencias pueden atribuirse a las características propias de cada especie y a las diferentes concentraciones de los inductores, aunque Hilhorst y Karssen (1992), indican que la reducción de la latencia con la ayuda de los compuestos evaluados, se da en una amplia gama de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas.

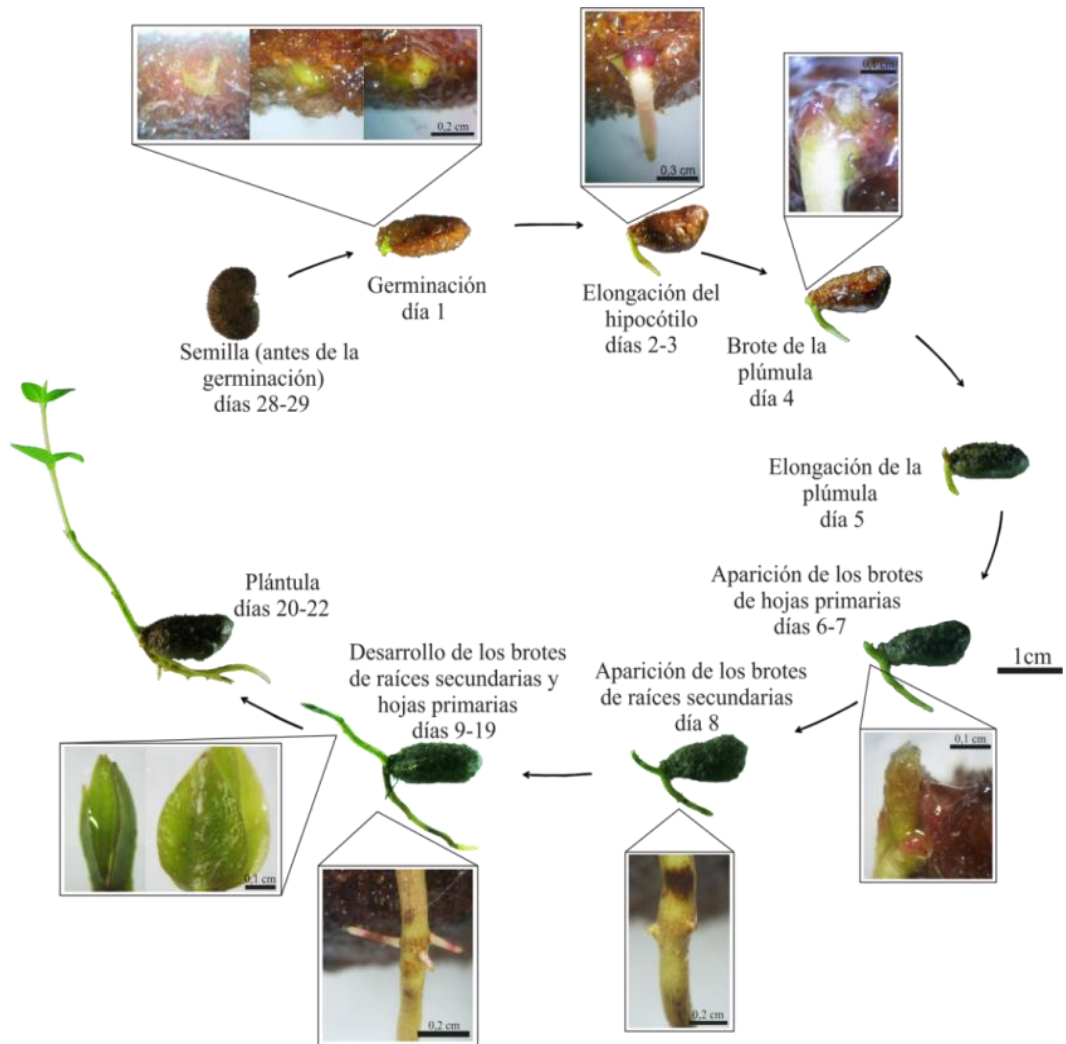


**Figura 4.** Porcentaje de germinación de semillas de *M. dubia* tratados con cinco compuestos químicos y sus respectivas concentraciones.

### 3.4. Crecimiento inicial hasta plántula

Se realizó en un promedio de 22 días, pudiéndose identificar seis etapas de crecimiento (Figura 5). La primera etapa ocurrió después de 22 a 29 días de iniciado la siembra de las semillas y constó del rompimiento de la cubierta seminal, brote y elongación longitudinal de la radícula (~3 días). La zona del brote de la radícula presentó una protuberancia que se torna de color púrpura justo antes del brote de la radícula, esta coloración se piensa que se debe a la acumulación de antocianinas. La segunda etapa consiste en el brote y elongación de la plúmula. Esto ocurrió cuando el hipocótilo presentó una longitud de ~0,65 cm (~ cuarto día) y se observó una pequeña prolongación con coloración púrpura intensa en la parte superior del hipocótilo, por el color también sugiere la acumulación localizada de antocianinas. Cabe resaltar que en algunas semillas la plúmula brotó casi al mismo tiempo que la radícula. Asimismo, en esta etapa se observó el crecimiento de la plúmula, dando paso al epicótilo. Esta estructura presentó una coloración púrpura en la parte superior y que fue disminuyendo su intensidad hacia la parte inferior. La

tercera etapa se evidencia por la aparición de pequeñas prolongaciones en la parte superior del epicótilo, que dieron origen a las primeras hojas de la plántula. Esto ocurrió de 6 a 7 días después del brote de la radícula. En esta etapa el hipocótilo y epicótilo tenían longitudes de ~0,70 cm y ~0,28 cm respectivamente. La cuarta etapa se evidenció por la aparición de protuberancias en la parte central del hipocótilo, en estas protuberancias también se notó la acumulación de antocianinas en varias plántulas. Estas protuberancias posteriormente dieron origen a las raíces secundarias (~8 días del brote de la radícula). En esta etapa el hipocótilo y epicótilo tenían longitudes ~0,78 cm y ~0,55 cm respectivamente. La quinta etapa comprendió el brote y crecimiento de las hojas, elongación de las raíces primarias y secundarias. Esta etapa desde el día 9 al 19 del brote de la radícula. Finalmente, en la sexta etapa se evidencia raíces primarias y secundarias muy desarrolladas, la plántula posee un tallo y hojas bien diferenciadas en proceso de crecimiento, las plántulas tienen tamaños mayores a los 5 cm. Esto se evidenció entre los 20 y 22 días después del brote de la radícula.



**Figura 5.** Fenología de *M. dubia* desde el estado de semilla hasta el estado de plántula.

#### 4. Conclusiones

Las semillas de *M. dubia* muestran una amplia variación en sus datos biométricos (peso, largo, ancho y espesor), pero muestran correlaciones significativas entre sí. Las semillas de *M. dubia* son metabólicamente activas en el proceso de imbibición. La germinación de las semillas de *M. dubia* es inducida por el nitrito de sodio y el cianuro de potasio. El crecimiento inicial de *M. dubia* hasta plántula ocurre en un periodo de 22 días después del brote de la radícula y consta de seis etapas bien diferenciadas.

#### 5. Referencias bibliográficas

- Bethke, P.; Gubler, F.; Jacobsen, J.; Jones, R. 2004. Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* 219 (5): 847-855.
- Bethke, P.; Libourel, I.; Jones, R. 2006. Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 57 (3): 517-526.
- Bewley, J.; Black, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. Editorial Springer Us. New York, United States of America.
- Carvalho, N.; Nakagawa, J. 2000. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. Editorial Fundacao Cargill. Campinas, Brasil
- Hilhorst, H.; Karssen, C. 1992. Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regulation* 11 (3): 225-238.

- Imán, C.; Melchor, F. 2011. Caracterización morfológica y evolución de la colección nacional de germoplasma de camu camu *Myrciaria dubia*. *Scientia Agropecuaria* 2 (4): 289-201.
- Kigel, J.; Galili, G. 1995. Seed development and germination. Editorial Marcel Dekker Inc. New York, United States of America.
- Latsague, M.; Sáez, P.; Coronado, L. 2010. Tratamientos pregerminativos para *Myrceugenia exsucca* (Myrtaceae). *Bosque* 31(3): 243-246.
- Maco, G. 2002. Germinación y desarrollo inicial de *Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh y *Myrciaria* sp. con relación al tamaño de semillas y tipos de sustratos. Monografía de graduação. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Perú.
- Moreno, F.; Plaza, G.; Magnitskiy, S. 2006. Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). *Agronomía Colombiana* 24(2): 290-295.
- Palani, M.; Dasrhagir, M.; Kumaran, K. 1995. Effect of pre sowing chemical treatment on germination and seedling growth on *Acacia nilotica*. *International Tree Crops Journal* 8 (2-3): 189-192.
- Uchiyama, H.; Koyama, T.; Yoneda, K. 1996. Seed morphology and germination of camu camu *Myrciaria dubia* (Myrtaceae). *Bulletin of College of Agriculture and Veterinary Medicine-Nihon University* 53: 92-95.
- Vincent, E.; Roberts, E. 1997. The interactions of light, nitrate and alternating temperatures in promoting the germination of dormant seeds of common weed species. *Seed Science & Technology* 5(2): 659-670.