

Imbibición de semillas de frijol mungo (*Vigna radiata*) en extractos del alga marina (*Ulva lactuca*) y su efecto sobre el crecimiento de las plántulas

¹Eber Josué Carrillo-Martínez, ¹Margarita Belem Santana-Bejarano, ²Julia Zañudo-Hernández, ¹Rosalba Mireya Hernández-Herrera*.

Imbibition of mung bean seeds (*Vigna radiata*) in extracts of seaweed (*Ulva lactuca*) and its effect on the growth of seedlings

¹Departamento de Botánica y Zoología, ²Departamento de Ecología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Calle Ramón Padilla Sánchez 2100, Col. Nextipac, Zapopan, Jalisco, 45110. México.

*autor de correspondencia: rosalmir@yahoo.com

Resumen

En el presente trabajo se utilizó extracto de *Ulva lactuca* a diferentes concentraciones como tratamiento de imbibición de semillas de frijol mungo y se evaluó su efecto del en los parámetros de crecimiento de las plántulas. Los efectos positivos se observaron en la longitud de la radícula de plántulas tratadas con UL2 al 0.2 % y UL6 al 1.0 %. El valor más alto de peso seco se registró a partir de semillas empapadas con UL8 al 0.2 %. Los extractos ácidos de algas marinas mostraron mejores resultados en los parámetros bioquímicos como la clorofila, lo que resultó en un aumento de clorofila a y b en las plantas tratada con UL4, UL8 y UL10 en 0.2 %. También los carbohidratos totales y el azúcares reducidos se incrementaron con los tratamientos de UL2 al 1.0 % y UL10 al 0.2 % respectivamente en las plántulas de frijol mungo. Los compuestos activos contenidos en el extracto líquido de algas marinas estimularon el crecimiento de las plántulas y podrían usarse como un método de imbibición para semillas, que es potencialmente capaz de promover una germinación más rápida de las semillas y un crecimiento de las plantas más uniformes.

Palabras clave: Azúcares totales, reducidos, Clorofila, hidrólisis ácida, imbibición.

Abstract

In the present paper, *Ulva lactuca* extract was used at different concentrations as an imbibition treatment of mung bean seeds and its effect on the growth parameters of the seedlings was evaluated. The positive effects were observed in the length of the radicle of seedlings treated with 0.2% of UL2 and 1.0% of UL6. The highest value of dry weight was registered from seeds soaked with 0.2% of UL8. The acidic extracts of marine algae showed better results in the biochemical parameters such as chlorophyll, which resulted in an increase of chlorophyll *a* and *b* in the plants treated with UL4, UL8 and UL10 at 0.2%. Also, total carbohydrates and reduced sugars were increased with treatments of UL2 at 1.0% and UL10 at 0.2% respectively in mung bean seedlings. The active compounds contained in the liquid seaweed extract stimulated the growth of the seedlings and could be used as an imbibition method for seeds, which is potentially able to promote rapid and more uniform seed germination and plant growth.

Key words: Total sugars, reduced, Chlorophyll, acid hydrolysis, imbibition.

Introducción

La imbibición de semillas es una técnica utilizada comercialmente para hidratar las semillas hasta el punto donde comienzan los procesos de germinación (Moreno *et al.*, 2006). Principalmente los tratamientos de imbibición implican imbuir la semilla con cantidades limitadas de agua para permitir la hidratación necesaria y la mejora de los procesos metabólicos de germinación. La aplicación correcta induce una tasa de germinación más rápida, uniforme y alta, lo que da como resultado una disminución del tiempo medio de germinación (que podría considerarse un indicador del vigor de la semilla) cuando las semillas se transfieren a condiciones de germinación (Sivritepe y Dourado, 1995; Dell'Aquila, 1987).

Los procedimientos de imbibición tradicionales incluyen hidro-priming (semillas preparadas con agua), osmo-priming (remojo de semillas en soluciones osmóticas, por ejemplo, polietilenglicol), halo-priming (embeber semillas en soluciones salinas), termo-priming (manejo de semillas con temperaturas bajas o altas), imbibición en matriz sólida (agente sólido, las matrices y el agua se mezclan por completo y luego se añaden las semillas) y la bio-priming (hidratación por compuestos biológicos).

Cada tratamiento tiene beneficios y complicaciones, y puede tener efectos variables según el tipo de prueba, la selección del cultivo, el estadio de desarrollo de la planta, el método de concentración/dosis de aplicación y la duración de los tratamientos (Ashraf y Foolad, 2005).

Es por ello, que mediante el proceso de imbibición de la semilla en agua o en soluciones diversas es factible mejorar su calidad fisiológica a través de la uniformidad en el porcentaje de germinación (Artola *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2007, McDonald, 2000).

La técnica de hidro-priming también se puede llevar a cabo con extractos de algas marinas a bajas concentraciones (partes por millón)

(Sharma *et al.*, 2014). Donde se ha comprobado que al tratar semilla con extractos de algas marinas aumentan capacidad germinativa, mejora el vigor de las plántulas, presentan mayor contenido de clorofila y reducen el tiempo de emergencia de muchos cultivos hortícolas y agrícolas como berenjena, cebada, maíz, pimientos, sorgo, césped trigo, remolacha, lechuga, habas, chile pimiento, tomate y frijol mungo (Wilczek y Ng, 1982; Brocklehurst y Dearman, 1983; Burchett *et al.*, 1998; Moller y Smith, 1998, 1999; Lee y Kim, 1999; El-Sheekh y El-Saled, 2000; Basra *et al.*, 2002; Demir *et al.*, 2006; Sivasankari *et al.*, 2006; Raghavendra *et al.*, 2007; Farooq *et al.*, 2008; Sivritepe y Sivritepe, 2008; Kumar y Sahoo, 2011; Matysiak *et al.*, 2011; Basher *et al.*, 2012; Briceño-Domínguez *et al.*, 2014; Hernández-Herrera *et al.*, 2014; Castellanos-Barriga *et al.*, 2017).

Estos extractos de algas marinas se producen con técnicas de extracción clásicas y novedosas mediante diversos métodos en condiciones ácida, neutra o alcalina (Michalak y Chojnacka, 2014). En este sentido, los productos obtenidos a partir del alga *Ulva lactuca* contienen una amplia gama de compuestos que estimulan el crecimiento de diferentes cultivos y son seguros para las plantas (Challen y Hemingway, 1965) y en consecuencia pueden ser utilizados en la agricultura moderna como bioestimulantes o promotores de crecimiento de plantas. El objetivo de esta investigación consiste en evaluar el efecto del uso de extractos ácidos de *Ulva lactuca* como una técnica de imbibición en la germinación y el crecimiento temprano de plántulas de frijol Mungo (*Vigna radiata*).

Materiales y Métodos

Colecta y preparación de extractos ácidos.

El alga verde *Ulva lactuca* Linnaeus fue recolectada manualmente en el año 2015 en la localidad de La Paz, Baja California Sur, México, (24°10'00" N 110°18'00" O). El alga se lavó

con agua corriente para quitar exceso de arena y organismos epifitos y posteriormente se colocó en una estufa de secado a 60 °C por tres días. Finalmente se pulverizó hasta obtener un polvo fino.

Para la elaboración de los extractos de *Ulva lactuca* se realizó una hidrólisis ácida de acuerdo al método de Jiang *et al.* (2016), donde el polvo de alga marina fue tratado con 2, 4, 6, 8 y 10% (v / v) de H₂SO₄ y esterilizado en autoclave a 12.4 k Pa y 121 ° C durante 30 min. El extracto líquido obtenido de la biomasa hidrolizada se filtró con papel filtro Whatman no. 40. Los extractos obtenidos se rotularon como soluciones stock de acuerdo con el porcentaje de ácido utilizado: UL2, UL4, UL6, UL8 y UL10. Finalmente, los extractos ácidos se neutralizaron a pH 7 con Ca₂CO₃ para su uso posterior en las semillas.

Bioensayo de crecimiento

Para el bioensayo se utilizaron semillas de *Vigna radiata* haciendo una selección uniforme de las mismas en cuanto a tamaño, peso y color. Posteriormente, las semillas se lavaron y desinfectaron superficialmente, dividiéndose en lotes de 100 semillas para ser embebidas durante 24 horas en los diferentes tratamientos de acuerdo a Castellanos-Barriga *et al.* (2017). Finalmente, las semillas tratadas con los extractos algales se sembraron en charolas de germinación con sustrato de peat moss (musgo de turba) y se mantuvieron dentro de un invernadero con temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa del 85 % y con irrigación por aspersión, durante un periodo de 15 días.

Transcurrido este tiempo, a las plántulas se les midió la longitud de radícula, longitud en brote, longitud total, peso fresco y también se les determinó el contenido de clorofila (a y b) de acuerdo al método de Arnon (1949), azúcares

totales y reducidos de acuerdo a Carnal y Black (1989) y la prueba de Nelson–Somogyi (Nelson 1944; Somogyi 1952). Los resultados fueron leídos por absorbancia, para clorofila (645 y 663 nm) y para azúcares (620 nm), en un espectrofotómetro JENWAY 7305.

El diseño empleado fue completamente al azar con arreglo factorial, donde el factor 1 fue la cantidad de ácido sulfúrico (2, 4, 6, 8 y 10 %) utilizado para la hidrólisis y el factor 2 la concentración de los extractos utilizados para empapar las semillas (0.2 y 1.0 %) y como control las semillas fueron embebidas con agua destilada, se usaron 16 repeticiones por tratamiento.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados mediante ANOVAS de dos vías y prueba de comparación de mínima diferencia significativa (LSD) ($\alpha = 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV para Windows.

Resultados

No se observaron diferencias significativas en el crecimiento del brote de las plántulas provenientes de semillas embebidas en los extractos de *U. lactuca* en comparación con los controles (Figura 1a). Sin embargo, si se observaron diferencias significativas en la longitud radicular de las plántulas que recibieron los tratamientos UL2 al 0.2 % y UL6 al 1 %, donde las plántulas mostraron valores de 18.1 y 14.4 cm, respectivamente (figura 1b). Así mismo, el peso fresco de las plántulas que recibieron el tratamiento UL8 al 0.2 %, se incrementó, registrando un valor de 1.05 g respecto al control (figura 1c). Por otra parte, el tratamiento UL10 al 1% inhibe el crecimiento de las plántulas de frijol mungo.

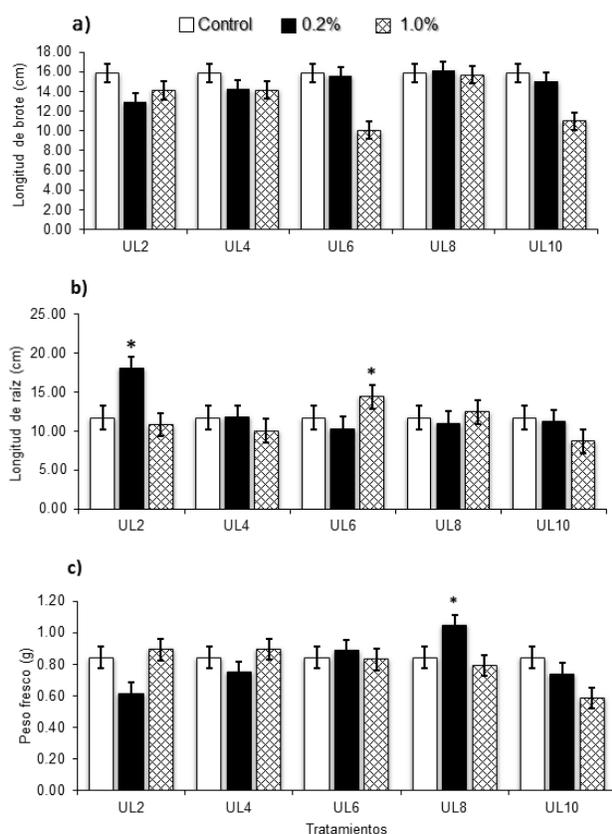


Figura 1. Efecto de los extractos ácidos de *Ulva lactuca* en el crecimiento de a) longitud de Brote, b) longitud de raíz y c) peso fresco de las plántulas de frijol mungo. Las líneas sobre la barra indica la desviación estándar y el asterisco sobre las líneas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Las plántulas que recibieron los tratamientos UL4, UL8 y UL 10 a (0.2 %) incrementaron en las hojas la cantidad de clorofila *a*, con valores de (268, 276 y 291 $\mu\text{g/g}$) (figura 2a). También, las plántulas que fueron tratadas previamente con los extractos de UL4, UL6 y UL8 al 0.2 %, presentan un incremento significativo en la cantidad la clorofila *b* con valores de (415, 380 y 449 $\mu\text{g/g}$) con respecto al control (figura 2b).

La mayor cantidad de azúcares totales se registró en plántulas tratadas con el tratamiento UL10 y UL8 al 0.2 % y UL2 a 1 %, con valores de 0.65, 0.56 y 0.57 mg/g , respectivamente (fi-

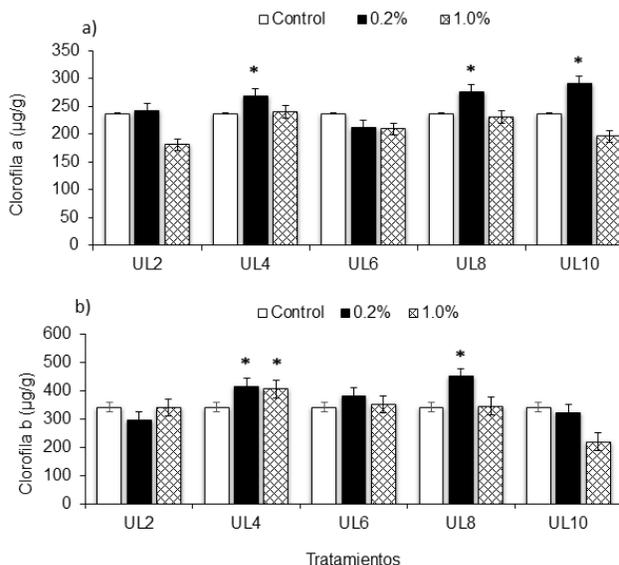


Figura 2. Efecto de los extractos ácidos de *Ulva lactuca* en el contenido de a) clorofila *a* y b) clorofila *b* en las plántulas de frijol mungo. Las líneas sobre la barra indica la desviación estándar y el asterisco sobre las líneas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

gura 3a). De igual manera, el mayor contenido de azúcares reducidos se observó en las plantas tratadas con los extractos de UL2 al 1 % y UL10 al 0.2 % con valores de 0.27 y 0.26 $\mu\text{g/g}$ (figura 3b).

Discusión

Las semillas embebidas usualmente exhiben mayor tasa de germinación, mayor uniformidad de germinación y, a veces, mayor porcentaje de germinación total (Basra *et al.*, 2005). Es obvio que las semillas hidro-priming pueden absorber y reavivar rápidamente el metabolismo de las semillas, mejorando la tasa de germinación que puede conducir a la producción de plántulas grandes y uniformes (McDonald, 2000). Las semillas embebidas en la concentración de UL8 a 0.2 % del extracto de alga *Ulva lactuca* favorecieron el peso fresco, el contenido de clorofila y azúcares totales en las plántulas de frijol mungo. De acuerdo con Chbani *et al.* (2015) y Castellanos-Barriga *et al.* (2017) los extractos líquidos de algas marinas *a* con como fertilizantes incre-

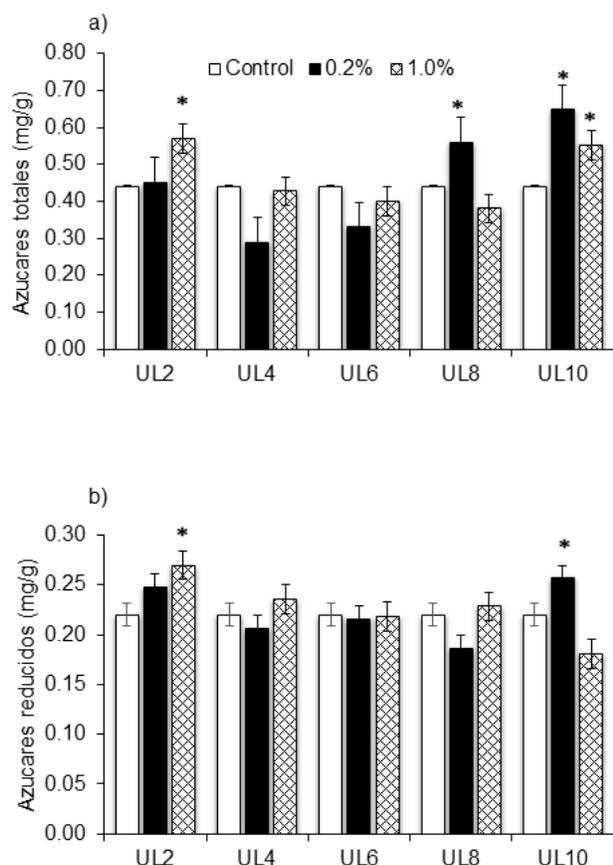


Figura 3. Efecto de los extractos ácidos de *Ulva lactuca* en el contenido de a) azúcares totales y b) azúcares reducidos en las plántulas de frijol mungo. Las líneas sobre la barra indica la desviación estándar y el asterisco sobre las líneas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

mentan la germinación, crecimiento, el contenido de clorofila, azúcares totales y reducidos, y en consecuencia la calidad de las plantas. Esto se debe a la presencia de sustancias promotoras del crecimiento como son las Auxinas (AIA) y Giberelinas (GAs), Citoquininas (Cq), micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Co, Mo, Mn, Ni), vitaminas y aminoácidos.

Aunado a lo anterior, Castellanos-Barriaga *et al.* (2017) observaron una mayor velocidad de germinación en semillas de frijol mungo (*V. radiata*) tras ser expuestas a bajas concentraciones de un extracto ácido de *Ulva lactuca* (0.2

%). Los parámetros evaluados mostraron una mejor respuesta en la velocidad de germinación, la cual, se encuentra ligada a un tiempo de germinación promedio menor, índice y energía de germinación altos, y consecuentemente se presentó un mayor vigor de plántulas, plúmula y longitud de la radícula. Para el presente trabajo, la longitud de radícula se incrementó con el tratamiento UL2 a una concentración de 0.2 %. Al mismo tiempo, el peso fresco fue mayor para el tratamiento UL8 a una concentración 0.2 %.

Además, las plántulas que recibieron los extractos de UL8 y UL10 mostraron mayor contenido de azúcares totales y reductores; esto se puede explicar con base en lo publicado por Jiang *et al.* (2016), donde se reconoce que el ácido sulfúrico es la variable más importante para extraer todo tipo de azúcares. Por consiguiente, es posible argumentar que a mayor porcentaje de ácido (hasta cierto punto) la extracción es más eficiente y por ende habrá más cantidad y diversidad de azúcares disponibles para que sean asimilados por las plántulas.

Por otro lado, los extractos de algas marinas utilizados a concentración del 1.0 % mostraron daños en las plántulas, esto posiblemente se debe al pH y la conductividad eléctrica de extractos ácidos que pueden afectar la bioactividad de la semilla de acuerdo con Henry (2005).

Conclusión

El extracto ácido obtenido del alga *Ulva lactuca*, presenta un efecto bio-estimulante sobre parámetros morfológicos y bioquímicos de la planta de frijol *V. radiata*. El tratamiento UL8 favoreció la asimilación de nutrientes y promovió el desarrollo de la planta.

Con el presente estudio se abre posibilidades al uso de este tipo de extractos algales, los cuales con benéficos y favorables con respecto a las plantas control (solo tratadas con agua), usando las concentraciones adecuadas favorecen la probabilidad de garantizar la germina-

ción e incrementar la producción de alimentos con alto nivel nutricional, como en el caso del *V. radiata*. Sin embargo, hacen falta más estudios respecto al tema.

Literatura citada

- Arnon, D. E. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24:1–15.
- Artola A., G. Carrillo-Castañeda & G. García de los Santos. 2003. Hydropriming: A strategy to increase *Lotus corniculatus* L. seed vigor. *Seed Science & Technology*, 31:455–463.
- Ashraf M. & M.R. Foolad. 2005. Pre-sowing seed treatment—a shotgun approach to improve germination growth and crop yield under saline and non-saline conditions. *Advances in Agronomy*. 88:223–271.
- Basher, A.A., A.J. Mohammed & A.I.H. Teeb. 2012. Effect of seaweed and drainage water on germination and seedling growth of tomato (*Lycopersicon* spp.). *Euphrates Journal Agriculture Science*. 4:24–39.
- Basra, S.M.A., M.N. Zia, T. Mehmood, I. Afzal & A. Khaliq. 2002. Comparison of different invigoration techniques in wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. *Pakistan Journal of Arid Agriculture*. 5:11–16.
- Basra, S.M.A., M. Farooq, R. Tabassum & N. Ahmed. 2005. Physiological and biochemical aspects of seed vigour enhancement treatments in fine rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Science and Technology*. 33:623–628.
- Booth, E. 1969. The manufacture and properties of liquid seaweed extracts. Proceedings International Seaweed Symposium 6:655–662.
- Briceño-Domínguez, D., G. Hernández-Carmona, M. Moyo, W. Stirk & J. Van Staden. 2014. Plant growth promoting activity of seaweed liquid extracts produced from *Macrocystis pyrifera* under different pH and temperature conditions. *Journal of Applied Phycology*. 26:2203–2210.
- Brocklehurst, P.A & J. Dearman. 1983. Interactions between seed priming treatments and nine seed lots of carrot, celery and onion. I. Laboratory germination. *Annals Applied Biology*. 102:577–584.
- Burchett, S., M.P. Fuller & A.J. Jellings. 1998. Application of seaweed extract improves winter hardiness of winter barley cv Igri. The Society for Experimental Biology, Annual Meeting. The York University, March 22–27. Experimental Biology Online. Springer
- Carnal, N. W. & C. C. Black. 1989. Soluble Sugars as the Carbohydrate Reserve for CAM in Pineapple Leaves Implications for the Role of Pyrophosphate: 6-Phosphofructokinase in Glycolysis. *Plant physiology*. 90:91–100.
- Castellanos-Barriga, L. G., F. Santacruz-Ruvalcaba., G. Hernández-Carmona., E. Ramírez-Briones & R. M. Hernández-Herrera. 2017. Effect of seaweed liquid extracts from *Ulva lactuca* on seedling growth of mung bean (*Vigna radiata*). *Journal of Applied Phycology* 29:2479–2488.
- Challen, S.B. & J.C. Hemingway. 1965. Growth of higher plants in response to feeding with seaweed extracts. Proc. 5th Int. Seaweed Symp 5:359–367.
- Chbani, A., S. Majed, H. Mawlawi & M. Kammoun. 2015. The use of seaweed as a bio-fertilizer: Does it influence Proline and Chlorophyll concentration in plants treated? *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 1:70–73.
- Demir, N., B. Dural & K. Yildirim 2006. Effect of seaweed suspensions on seed germination of tomato, pepper and aubergine. *Journal of Biological Sciences*. 6:1130–1133.
- Dell’Aquila A. 1987. Mean germination time as a monitor of seed ageing. *Plant Physiology and Biochemistry*. 25, 761–768.
- El-Sheekh, M.M. & A. El D. El-Saled. 2000. Effect of crude seaweed extracts on seed germination, seedling growth and some metabolic processes of *Vicia faba* L. *Cytobios*. 101:23–35.
- Farooq, M., Basra, S.M.A. Rehman, H., & B.A. Saleem. 2008. Seed priming enhancement the performance of late sown wheat by improving chilling tolerance. *Journal Agronomy Crop Science*. 194:55–60.
- Henry, E.C. 2005. Report of alkaline extraction of aquatic plants, *Science Advisory Council, Aquatic Plant Extracts*. 1:6.
- Hernández-Herrera, R.M., F. Santacruz-Ruvalcaba, M.A. Ruiz-López, J. Norrie & G. Hernández-Carmona. 2014. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Applied Phycology*. 26:619–628.
- Jiang R, Y. Linzon, Y.Z. VitkinE, A. Chudnovsky & A. Golberg. 2016. Thermochemical hydrolysis of macroalgae *Ulva* for biorefinery: Taguchi robust design method. *Scientific Reports* 6:27761.
- Kumar, G. & D. Sahoo. 2011. Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* Var. Pusa Gold. *Journal of Applied Phycology*. 23:251–255.
- Lee, S.S. & J.H. Kim. 1999. Morphological change, sugar content and α -amylase activity of rice seeds under various priming conditions. *Korean Journal Crop Science*. 44:138–142.
- Matysiak, K., S. Kaczmarek & R. Krawczyk. 2011. Influence of seaweed extracts and mixture of humic and

- fulvic acids on germination and growth of *Zea mays* L. *Acta Scientiarum Polonorum Agricultura*. 10: 33–45.
- McDonald, M.B. 2000. Seed priming. In “Seed Technology and Its Biological Basis” (M. Black and J. D. Bewley, Eds.), pp. 287–325. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK.
- Michalak, I. & K. Chojnacka. 2014. Algal extracts: Technology and advances. *Engineering in Life Sciences*. 14:581–591.
- Moller, M. & M.L. Smith. 1998. The significance of the mineral component of seaweed suspension on lettuce (*Lactuca sativa* L) seedling growth. *Journal Plant Physiology*. 153:658–663.
- Moller, M. & M.L. Smith 1999. The effects of priming treatments using seaweed suspensions on the water sensitivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) caryopses. *Annals of Applied Biology*. 135: 515–521.
- Moreno, F., G.A. Plaza. & V.M. Stanislav. 2006. Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). *Agronomía Colombiana*. 24: (2) 290-295.
- Nelson, N. 1994. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 153:375–380.
- Raghavendra, V.B., S. Lokesh, & H.S. Prakash. 2007. Dravya, a product of seaweed extract (*Sargassum wightii*), induces resistance in cotton against *Xanthomonas campestris* pv. *malsvacearum*. *Phytoparasitica*. 35:442–449.
- Sánchez, J., A.J.A, Mejía, A, Hernández, A, Peña & C. Carballo. 2007. Acondicionamiento osmótico de semillas de tomate de cáscara. *Agricultura Técnica en México*. 33:115-123.
- Sharma, H.S.S., C. Fleming, C. Selby, J.R. Rao & T. Martin. 2014. Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*. 26:465–490.
- Sivasankari, S., V. Venkatesalu, M. Anantharaj & M. Chandrasekaran. 2006. Effect of seaweed extracts on the growth and biochemical constituents of *Vigna sinensis*. *Bioresource Technology*. 97:1745–1751.
- Sivritepe, H.O. & A.M. Dourado. 1995. The effects of priming treatments on the viability and accumulation of chromosomal damage in aged pea seeds. *Annals of Botany*. 75:165–171.
- Sivritepe, N. & H.Ö. Sivritepe. 2008. Organic priming with seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) affects viability of pepper seeds. *Asian Journal of Chemistry*. 20:5689–5694.
- Wilczek, C.A. & T. Ng. 1982. The promotion of seed germination in table beet by an aqueous seaweed extract. *Horticultural Science*. 17:629–630.