



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Introducción *in vitro* de *Miconia zamorensis*, utilizando semillas y fragmentos nodales.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Yauri Caraguay, Rómulo Frank

DIRECTOR: Lucero Mosquera, Hernan Patricio, Ing

LOJA- ECUADOR
2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ing.

Hernán Patricio Lucero Mosquera

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Introducción *in vitro* de *Miconia zamorensis*, utilizando semillas y fragmentos nodales” realizado por Rómulo Frank Yauri Caraguay, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Febrero del 2016

f).....

Hernán Patricio Lucero Mosquera
CI: 0101384659

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Rómulo Frank Yauri Caraguay declaro ser autor del presente trabajo de Titulación: “Introducción *in vitro* de *Miconia zamorensis*, utilizando semillas y fragmentos nodales”, de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo el Ing. Hernán Patricio Lucero Mosquera director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

Autor: Rómulo Frank Yauri Caraguay

Cédula: 1104741606

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a un ser supremo que me vio nacer, y el día de hoy con perseverancia, me dio la fuerza suficiente para caer y levantarme más de una vez a ti Madre Graciela Caraguay, Padre Manuel Yauri y hermanos Polo, Elizabeth, Paul, Gina, Leonardo, Michus y Moyo Yauri.

A mi hermano Alonso Augusto que una fecha como hoy cumple un año más de distancia en el lugar que este, esto es para ti.

A mis sobrinos Rogger, Samuel y Linda del Cisne

A Elizabeth y Jinsop Apolo

Al Ing. Hernán Lucero mi pilar fundamental, en esta etapa final de mi formación académica contribuyó con su paciencia, enseñanza y consejos a finalizar este duro trabajo.

A mis amigos; Darwin, Fabián, Cristian, Fernando, Leonardo, Anita, Katherine Janet, Santiago, Adrián, Dalila, Andrés, Yadira, Ronald Tesistas; Andrea, Katherine, Allison, Danilo, JS, GP Elvis y una persona especial que cambio mis días haciéndome sonreír desde el primer momento que nos miramos y la bese Maritza Ocampo Paz muchas Gracias por su amistad, paciencia y colaboración en cada fase, esto es suyo. Yo únicamente fui el motor, de algo que inicio con un sueño y el día de hoy lo culminamos.

A cada uno de mis Docentes PhD. Daniel Capa, Ing. Pablo Ramón. Por saberme recordar cosas básicas en mi formación.

Y la Dra. Katherine Acurio que formo una base muy importante en mi formación académica ser lo más cauteloso posible en Laboratorio Gracias a cada uno de ustedes el día de hoy finalizo una parte muy importante de mi vida.

GRACIAS.

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios por brindarme la valentía, el coraje, la garra, de culminar esta etapa esencial en la Universidad, que servirá para el desarrollo en mi vida profesional y como persona brindar todo lo aprendido a la sociedad re-contribuyendo todo el conocimiento desde mi profesión como Bioquímico Farmacéutico. Al desarrollo de un mejor bienestar para la humanidad.

A toda mi familia Yauri por comprenderme y brindarme el cariño suficiente para ser cada día una mejor persona.

A mi director de tesis Ing. Hernán Lucero que desde el primer momento que depósito confianza en mí vio mi desarrollo como persona, y si alguna vez falle me supo disculpar y extender la mano como ser humano le quedo inmensamente agradecido por cada día estuvo allí para ayudarme GRACIAS.

A la Ing. Verónica Cueva, Ing. Holguer Jaramillo, por facilitarnos los medios esenciales para el desarrollo de nuestra investigación gracias.

Y finalmente a la Universidad Técnica Particular de Loja y al Departamento de Ciencias Naturales por permitirme realizar dicha investigación que marca un hecho muy importante en mi formación académica.

Rómulo Frank Yauri Caraguay.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	i
APROBACION DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACION.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I FIN, PROPOSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO.....	5
1.1. Fin, propósito y componentes del proyecto.....	6
CAPITULO II MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Antecedentes.....	8
2.2. La Biorremediación.....	9
2.3. La especie en estudio: <i>Miconia zamorensis</i>	12
2.4. Cultivos vegetales <i>in vitro</i>	13
CAPITULO III METODOLOGÍA.....	16
3.1. Área de estudio.	17
3.2. Fases de Investigación.	17
Tabla 1. Diseño experimental propuesto para el tratamiento de semillas.....	18
3.3. Obtención de fragmentos nodales y Semillas.	20
3.4. Pruebas de Desinfección.....	22
3.5. Diseño experimental.	26
3.5.1.1.4. Experimento con semillas <i>in-vitro</i>	27
CAPITULO IV RESULTADOS	29
4.1. Fragmentos nodales <i>in vitro</i>	30
4.2. Fragmentos nodales <i>ex vitro</i> (Invernadero).....	32

4.3. Semillas <i>in vitro</i> .	35
CAPITULO V DISCUSIÓN	38
5.1. Semillas <i>in vitro</i> .	39
5.2. Semillas <i>ex vitro</i> .	40
5.3. Fragmentos nodales <i>in vitro</i> .	41
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental propuesto para el tratamiento de semillas.....	18
Tabla 2. Diseño experimental propuesto para el tratamiento de semillas y estacas....	18
Tabla 3. Síntesis de resultados de tratamientos de fragmentos nodales.....	36
Tabla 4. Síntesis de resultados de tratamientos de semillas	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.Evidencia de la contaminación de las fuentes.....	8
Figura 2.Ubicación geográfica de la zona minera de Chinapintza.....	17
Figura 3.Identificación de <i>Miconia zamorensis</i>	19
Figura 4.Acondicionamiento y: transporte de <i>Miconia zamorensis</i>	20
Figura 5.Obtención de fragmentos nodales	20
Figura 6.Obtención de la semilla <i>Miconia zamorensis</i> a partir del fruto.....	21
Figura 7.Extracción de semillas en contacto con gel de sílice	21
Figura 8. Desinfección de fragmentos nodales en una probeta de 1000 ml más alcohol al 70%	22
Figura 9. Enjuague con agua estéril hasta eliminar el cloro	23
Figura 10. Desinfección de semillas en tubo “Falcon” de 50 ml, más alcohol al 70%	24
Figura 11.Solución de 100 ppm de concentración al 100% de reguladores de crecimiento con semillas <i>Miconia zamorensis</i>	24
Figura 12. Siembra en el medio (MS) mediante el uso de una micro pipeta de 500 ul con punta estéril.....	25
Figura 13.Extracción de semillas del fondo del tubo Falcon de 50ml.	25
Figura 14.Macetas, de 8 cm de base, 15 cm altura, y 10 cm en la parte superior.	26
Figura 15.Riego con Nitrofoska foliar.	27
Figura 16.Mezcla de turba y arena (1:1)	27
Figura 17. Necrosis de la estaca causa por el H ₂ O ₂ a 10vol. de concentración y oxidación de medio debido a los exudados desprendidos por la estaca.	30
Figura 18.Colonización de hongos en fragmento nodal y proliferación en medio (Ms).	31
Figura 19.Necrosis del fragmento nodal causa por el H ₂ O ₂ y colonización de hongo en estaca.	31
Figura 20. Ausencia de respuesta.....	32
Figura 21. Brote de fragmento nodal.....	32
Figura 22.Semillas en proceso de germinación.....	33
Figura 23.Germinación de semillas en invernadero	33
Figura 24.Germinación de semillas en invernadero	34
Figura 25.Germinación con tratamientos de semillas <i>Miconia zamorensis in vitro</i>	35
Figura 26.Germinación de semillas de <i>Miconia zamorensis</i>	36
Figura 27.Muerte Descendiente	43

ABREVIATURAS

Cu	Cobre
Cr	Cromo
Hg	Mercurio
Pb	Plomo
Zn	Zinc
Ni	Níquel
Co	Cobalto
Mn	Manganeso
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
GA ₃	Ácido Giberélico
KNO ₃	Nitrato de Potasio
KIN	Kinetina
CL	Con Luz
SL	Sin Luz
MS	Murashige and skoo

RESUMEN

En el sur del Ecuador, en el cantón Paquisha sector Chinapintza, está uno de los yacimientos auríferos más grandes del país.

La contaminación de las fuentes hídricas, causada por Arsénico y Mercurio influye en el desarrollo normal de la población, El programa de “Diseño de estrategias de biorremediación basadas en consorcios planta-microorganismos para la recuperación de suelos contaminados por la actividad minera en la provincia Zamora-Chinchipec” tiene como uno sus objetivos estudiar el potencial bioacumulador de Hg y As en *Miconia zamorensis*. Para ello se estableció un diseño de bloques completos al azar, trabajando con reguladores de crecimiento y sustancias químicas: kinetina, ácido giberélico, peróxido de hidrógeno, y nitrato de potasio. Con el fin de estudiar métodos para acortar el tiempo de germinación de *Miconia zamorensis* mediante cultivo *in vitro* y *ex vitro*. Se aplicó el protocolo estándar *in vitro*, teniendo como resultados la producción de información sobre la especie *in vitro*; y se obtuvieron plantas del experimento *ex vitro* (2746).

Palabras clave: Chinapintza, cultivo *in vitro*, cultivo *ex vitro*, Kinetina, KNO₃, Acido Giberélico, H₂O₂, latencia, germinación de semillas.

ABSTRACT

In the south of Ecuador, at canton Paquisha, in Chinapintza sector, is located one of the largest gold deposits of Ecuador.

Pollution of water sources, caused by Arsenic and Mercury affects the normal development of the population. The "Design bioremediation strategies based on plant-microorganisms consortiums for the recovery of contaminated by mining activities in the province Zamora-Chinchipe soils". Program has as one of its objectives to study the potential bioaccumulative of Hg and As in *Miconia zamorensis*. A randomized complete blocks design was established, working with growth regulators and chemicals like kinetin, gibberellic acid, hydrogen peroxide and potassium nitrate. In order to study methods to shorten the germination time of *Miconia zamorensis* through an *in vitro* and *ex vitro* cultivation. The *in vitro* standard protocol was applied, having as a result the data production of the specie *in vitro*; and plants were obtained from the *ex vitro* experiment (2746).

Keywords: Chinapintza, culture *in vitro*, culture *ex vitro*, kinetin, KNO₃, gibberellic acid, H₂O₂, dormancy, seed germination.

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en evaluar la factibilidad de introducir *in vitro* *Miconia zamorensis* utilizando semillas y fragmentos nodales. Con fines de biorremediación, ya que estudios han determinado que esta especie es acumuladora de metales pesados (Armijos, 2015). Esta investigación se efectuó en la provincia de Zamora Chinchipe, Cantón Paquisha, sector Chinapintza.

En Chinapintza se ha desarrollado la minería artesanal, controlada y no controlada desde hace varios años y con ésta la contaminación de suelos y de fuentes hídricas aledañas. La población local convive en condiciones deplorables con un gran impacto negativo para su salud lo cual debe ser revertido con urgencia. Una alternativa adecuada de intervención según las características de Chinapintza, en adición a las que ya se llevan a cabo en la provincia como parte de la iniciativa SmartLand para la gestión inteligente del territorio (<http://smartland.utpl.edu.ec/>) sería la eliminación de metales pesados de las fuentes contaminadas mediante la fitorremediación. Esta metodología se sustenta en la capacidad que tiene *Miconia zamorensis* de acumular metales pesados (Hazrat, Khan y Sajad. 2013; Bhatia y Kumar 2011).

La presente investigación se desarrolla en 4 capítulos, el primer capítulo titulado Marco Teórico trata sobre el estado del arte de este tema, en el segundo capítulo se da a conocer las técnicas y los materiales utilizados para llevar a cabo la investigación y en el capítulo 3 y 4 se expone y analiza los resultados. Esta investigación aporta con información valedera y verificable para reforzar ese puesto pionero que nuestra institución ha logrado en la Región Sur del Ecuador y concretamente al proyecto “Introducción *in vitro* de *Miconia zamorensis*., utilizando semillas y fragmentos nodales” que se desarrolla en el Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Técnica de Loja. Con este estudio se hicieron tratamientos generales, desde lo más fundamental puesto que la falta de información sobre *Miconia zamorensis* obligó a aplicar un diseño experimental amplio en el que se tomaron en cuenta 4 tratamientos y 2 blancos simultáneamente. De éstos se analizó su efecto y se llegó a las conclusiones presentadas.

El objetivo general es Contribuir a la producción de *Miconia zamorensis* para el proyecto de biorremediación. Se han alcanzado los objetivos específicos planteados: introducción *in vitro* de semillas y fragmentos nodales de *Miconia .zamorensis* e igualmente, se las introdujo en invernadero (*in vitro* y *ex vitro*). Se superaron las expectativas de obtención de plantas, del

programa: “Diseño de estrategias de biorremediación basadas en consorcios plantas-microorganismos para la recuperación de suelos contaminados por la actividad minera en la provincia Zamora Chinchipe”, necesitaba unas 40 plantas y se obtuvieron 2746 plantas.

CAPITULO I FIN, PROPOSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. Fin, propósito y componentes del proyecto.

1.1.1. Fin del proyecto.

Contribuir a la producción de *Miconia zamorensis*, para el proyecto de biorremediación, con el fin de aumentar el conocimiento sobre el comportamiento de la especie *Miconia zamorensis*, durante la manipulación *in vitro*.

1.1.2. Propósito del proyecto.

Propagar la especie mediante semillas y estacas *in vitro* como *ex vitro*.

1.1.3. Componentes del proyecto.

- Recolección de material vegetal.
- Pruebas de desinfección
- Introducción *in vitro* y *ex vitro*
- Evaluación del material introducido *in vitro* como *ex vitro*.

CAPITULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes.

2.1.1. Estado de la minería en Chinapintza.

Los yacimientos de Chinapintza se encuentran en las faldas de la cordillera de “El Cóndor cantón El Pangui, provincia de Zamora Chinchipe”. La reserva minera ha sido concesionada a la compañía transnacional Ecuacorriente en la etapa de exploración y en el 2018 entra a la explotación industrial (Samaniego, 2012).

En las fuentes hídricas se observa la contaminación por residuos de la actividad minera evidenciada en la coloración del agua que sale de las mismas y se une a la de escorrentía superficial como se observa en la Fig.1. La construcción de grandes campamentos para los técnicos y obreros; produce desechos y desperdicios lo que se produce contaminación (Soliz et al., 2012; Tapia, 2015).



Figura 1.Evidencia de la contaminación de las fuentes hídricas de Chinapintza Zamora Chinchipe.

Fuente: Lucero, H 2015

La contaminación es alta y la amenaza no es solo a futuro, sino que cualquier visitante puede observar a simple vista. Detener este fenómeno es imposible porque se encuentra en ejecución legal, una concesión minera en etapa de exploración y se encuentra construyendo la infraestructura necesaria para la actividad de explotación a corto tiempo (Tapia, 2015).

La serie de herramientas, suministros y logística es operada por cientos de obreros dedicados a la extracción del oro, los mismos que realizan largas jornadas de sobre explotación en el subsuelo a cambio de un pequeño salario. Los trabajadores mineros se

alimentan y los desechos fisiológicos son evacuados al aire libre, consecuentemente contaminan todo el ecosistema porque carecen de servicios básicos sanitarios. Improvisan viviendas rústicas y la promiscuidad causa una serie de trastornos de todo tipo: orgánico, emocional y psicológico por la presión de sus labores. Así mismo una serie de enfermedades (Soliz *et al.*, 2012).

Los residuos de toda la actividad minera contaminan todo el medio, se depositan a cielo abierto, zanjas por todos los lados, interrupción al cauce normal de los ríos y vertientes que son desviados para los lavaderos de oro. A esto se suma las sustancias químicas de Mercurio, Cianuro de Potasio y otras para purificar el metal codiciado; en entorno al medio destruido y las consecuencias nefastas por la desaparición de la flora y fauna. (Sarango, 2013; Tapia, 2009).

2.1.2 Fuente de Recursos Económicos.

El presupuesto del estado se financia con los rubros de exportaciones diversas: Petróleo como uno de los mayores rubros de ingresos; banano, flores, camarón, madera y los impuestos directos e indirectos entre otros; el impuesto al valor agregado –IVA- es la segunda fuente de ingresos del Estado. La minería y su explotación de los diferentes minerales, particularmente el oro y plata es otra de las fuentes de recursos económicos para el estado a través de impuestos y regalías, que contribuyen las empresas mineras en particular, que concesionó el gobierno, mientras que la minería artesanal y los informales evaden todos los impuestos y son los que más contaminan (Sandoval, 2001).

2.2. La Biorremediación.

La biorremediación es un mecanismo de tratamiento biológico, que usa microorganismos; levaduras, hongos y plantas para regenerar zonas contaminadas. (Ferrara *et al.*, 2006).

2.2.1. Fitorremediación.

La fitorremediación es el uso de plantas para remediar sitios contaminados con desechos orgánicos e inorgánicos. Compañías mineras toman esta iniciativa como una alternativa de limpieza de bajo costo y de una mayor aceptación pública. Si bien las técnicas de fitorremediación tienen limitaciones, una operación de fitorremediación cuidadosamente planificada da un rápido crecimiento, de raíces profundas y las especies producen alta

biomasa, para remediar sitios contaminados, por ende reduce la exposición de los contaminantes hacia los seres humanos y la vida silvestre (Agudelo, Macías y Suárez, 2012).

Clasificación de especies vegetales en función de su capacidad remediadora.

- a) Fitoextracción-planta silvestre extrae niveles altos de metales y otros
- b) Fitoestabilización-plantas que estabilizan sustancias toxicas
- c) Fitovolatilización-plantas que extraen metales y sustancias volátiles y las eliminan por las hojas (Carpena, 2007).

2.2.1 Mecanismos de fitorremediación.

FITOEXTRACCIÓN: Radica en la absorción de contaminantes por las raíces, tallos o follaje usando plantas acumuladoras de elementos tóxicos o compuestos orgánicos para retirarlos del suelo mediante su absorción y concentración en las partes cosechables sin presentar síntomas de toxicidad. (Volke Velasco y Pérez, 2005).

FITOESTABILIZACIÓN: Las plantas tolerantes a metales, se usan para reducir la movilidad de los mismos y evitar el pasaje a capas subterráneas o al aire, este tipo de método es propuesto para compuestos fenólicos y compuestos clorados así como en lagunas de desechos de yacimientos mineros (Ortega, 2007).

FITOVOLATILIZACIÓN: Uso de plantas para eliminar los contaminantes del lugar mediante su volatilización y para eliminar contaminantes del aire, se produce a medida que las plantas en crecimiento absorben agua junto con los contaminantes orgánicos solubles. Algunos de los contaminantes pueden llegar hasta las hojas y evaporarse o volatilizarse a la atmosfera (Bonilla, 2013).

FITODEGRADACIÓN: Las plantas acuáticas y terrestres captan, almacenan y degradan compuestos orgánicos para dar subproductos menos tóxicos o no tóxicos (Phillps, 2014).

2.2.2 Metales pesados.

La mayoría de metales pesados contaminantes comunes son Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn. Los metales son componentes naturales del suelo. Algunos de estos metales son micronutrientes necesarios para el crecimiento de la planta como: Zn, Cu, Mn, Ni y Co,

mientras que otros no se conoce su función biológica, tales como: Cd, Pb y Hg (Gaur y Adholeya, 2004).

2.2.3.1 Toxicidad del Arsénico y Mercurio.

Según Ullah (2015) La toxicidad por arsénico en el suelo y el agua es una amenaza cada vez mayor causando daños a la salud a las personas que viven en países en desarrollo y del tercer mundo, considerando un peligro global.

Muchas especies de plantas han tenido éxito en la absorción de contaminantes como el Cadmio, Plomo, Cromo, Arsénico y varios radionucleidos procedentes del suelo, Algunos metales con función biológica desconocida como: Cromo, Plomo, Cobalto, Selenio, Mercurio y Plata también se puede acumular (Evangelou, 2007).

El Mercurio como cualquier otro metal se encuentra en el suelo de diversas formas, se disuelve como ion o soluble libre y no es absorbido específicamente uniéndose principalmente a las fuerzas electrostáticas, quelatos y se precipita como sulfuro, carbonato, hidróxido y fosfato, existe tres formas solubles de Hg en el ambiente del suelo, el más reducido es Hg_0 con otras dos formas de ser iónica de iones de Mercurio Hg_2^{2+} y Mercurio Hg^{2+} ion, en condiciones oxidantes, especialmente a pH bajo. Ión Hg^+ no es estable en condiciones ambientales (Tangahu *et al.*, 2011; Ullah *et al.*, 2015; Jia-when *et al.*, 2013).

La contaminación ambiental debida al Mercurio es causada por varias industrias, productos petroquímicos, minas y también por fuentes agrícolas como fertilizantes y fungicidas (Tangahu *et al.*, 2011).

El mercurio y sus componentes son tóxicos acumulativos en pequeñas cantidades son peligrosos para la salud humana, el mayor efecto de la intoxicación por Mercurio se manifiesta como trastornos neurológicos y renales, ya que pueden pasar fácilmente la barrera hematoencefálica y tiene efectos en el cerebro, además el mercurio es un contaminante persistente en el ambiente con capacidad de bioacumulación en los peces, animales y los seres humanos (Tangahu *et al.*, 2011).

2.3. La especie en estudio: *Miconia zamorensis*.

Miconia es la tribu más grande de la Melastomataceae con más de 1.850 especies. Los miembros de Miconieae muestran una amplia gama de diversidad morfológica, y la morfología de semillas no es una excepción (Majure, 2015).

El género *Miconia* además es uno de los más representativos de la familia de la Melastomataceae, y algunas especies son comúnmente usadas en la medicina popular Brasileña como agente anti-inflamatorios (Mohd *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2016).

Los miembros de *Miconia* muestran una amplia gama de diversidad morfológica y sus semillas no son la excepción. Estudios previos han encontrado que la diversidad morfológica de semillas no es congruente con las clasificaciones tradicionales, y sugieren que puede reflejar relaciones evolutivas dentro de la Miconieae (Ocampo *et al.*, 2012).

La morfología de la semilla ha sido considerada como una importante fuente de información de caracteres con fines taxonómicos y se ha propuesto como una característica que refleja la historia evolutiva de las plantas (Ocampo *et al.*, 2012). El tamaño de la semilla, forma y superficie epidérmica han ocupado un lugar destacado en la caracterización de la diversidad morfológica de semillas (Ocampo *et al.*, 2012).

Estos estudios sugieren que la delimitación de algunas tribus y géneros se debe reconsiderar, el uso de la morfología de semillas basados en el supuesto que la morfología de las semillas produce información sobre la historia evolutiva de los grupos de estudio (Ocampo *et al.*, 2012).

La latencia de la semilla se refiere a un estado en el cual las semillas viables fallan en germinar cuando no les proporciona las condiciones favorables para su desarrollo como es la humedad adecuada, un régimen apropiado de temperatura, un ambiente normal y en algunos casos la luz (Schmidt, 2000).

La latencia ha evolucionado como una estrategia para evitar la germinación bajo condiciones, en la que es probable que sea baja la supervivencia de las plántulas (Schmidt, 2000).

Por otra parte hay varios grados de latencia que varían desde muy leve a muy fuerte, el propósito de pre-tratamiento es garantizar que las semillas germinen y la germinación será rápida y uniforme (Schmidt, 2000; Baskin y J.M. Baskin, 2014).

De acuerdo a Schmidt (2000), la latencia la clasifica de tres formas; 1. Innata cuando la latencia de la semilla esta lista para la dispersión., 2. Inducida en que la latencia se desarrolla como respuesta a factores ambientales externos., 3 Aplicada en que la germinación se ve limitada debido a las condiciones externas, esta última clasificación se la determina que si las semillas no germinan a causa de condiciones externas se denomina como reposo. En cambio para otros autores, Baskin y J.M. Baskin, (2014). Hay cinco clases de latencia (fisiológica, morfológica, morfo fisiológica, física y combinatoria)

2.4. Cultivos vegetales *in vitro*.

Se conoce como cultivos vegetales *in vitro* a las técnicas de manejo y control de la asepsia con el fin de producir plantas en condiciones de laboratorio; usando minerales, reguladores de crecimiento y agar. Las plantas pueden ser propagadas a través de sus dos ciclos de vida de desarrollo; Sexual y Asexual. En el ciclo sexual surgen nuevas plantas después de la fusión de gametos parentales, y se desarrollan a partir de embriones cigóticos contenidos dentro de semillas o frutos. Por lo contrario en la vegetativa Asexual con ciclo de características únicas de cualquier individuo, es una planta seleccionada para la propagación suelen ser perpetuadas porque, durante la división celular normal (mitosis), sus genes normalmente se copian exactamente en cada uno, denominado clone tiene su ventaja selectiva apropiada de acuerdo a la etapa de la evolución de los diferentes tipos de plantas (George *et al.*, 2007).

Dentro de los componentes primordiales para el desarrollo de la planta encontramos macronutrientes y micronutrientes; nutrientes necesarios para su crecimiento, el éxito en cultivos de tejidos vegetales es el suministro de cantidades relativamente grandes de algunos elementos inorgánicos como son; el Nitrógeno, Potasio, Calcio, Fósforo, Magnesio y Azufre. Y en pequeñas cantidades otros elementos indispensables para el crecimiento de la planta como; Hierro, Níquel, Cloro, Manganeso, Zinc, Boro, Cobre y Molibdeno (George *et al.*, 2007).

En lo que respecta a semillas tienen varias ventajas como medio de propagación, a menudo se producen en grandes cantidades de modo que las plantas regeneradas a partir de ellas son individualmente más diversas genéticamente hablando. Muchas de ellas generalmente pueden ser almacenadas por largos periodos de tiempo, sin pérdida de viabilidad; se distribuyen con facilidad, sin embargo las semillas de muchas especies vegetales que han sido manipuladas genéticamente es imposible obtener semillas que den una descendencia uniforme (George *et al.*, 2007).

La temperatura es un requisito esencial para la germinación de las semillas permeables, las semillas germinan en un amplio intervalo de temperaturas, pero las temperaturas máximas y mínimas varían con la especie, las bajas temperaturas inhiben la germinación de las semillas (Klekailo, 2012; Schmidt, 2000). Los rangos óptimos son entre 20° a 24° C (George *et al.*, 2007).

El cultivo *in vitro* permite el crecimiento y desarrollo de material vegetal en recipientes que lo separan del ambiente exterior y lo mantienen en condiciones controladas y asépticas. Entre las diversas técnicas de cultivo *in vitro*, la micropropagación consiste en la producción clonal de vegetales a partir, generalmente, de ápices o explantos nodales de una planta madre. La gran producción de nuevas plantas se ve favorecida gracias al rápido crecimiento del material vegetal *in vitro* y a la proliferación de tallos durante los subcultivos (George *et al.*, 2008; Murashige, 1962).

El objetivo de la propagación de la planta a través de los tejidos denominada Micropropagación, es propagar la planta, es decir como un clon, las plantas obtenidas de cultivo de tejidos se denominan como microplantas. Que pueden ser derivadas de cultivos de tejidos de tres maneras; a partir de yemas de brotes que se les induce a crecer y proliferar, seguido de morfogénesis cuando los nuevos brotes son inducidos a formar en los tejidos no organizados o directamente sobre tejidos de explantos de la planta madre, a través de la formación de embriones somáticos. Para la obtención de plantas por los dos primeros métodos, es necesario tratar los brotes de un tamaño adecuado para inducirlo a producir raíces. Las células vegetales diferenciadas pueden expresar totipotencia, es decir cada una de ellas retiene una capacidad latente para producir una planta entera, La totipotencia es una característica especial de células en los tejidos jóvenes y meristemas (George, F. 2007).

El uso de la micropropagación permite introducir rápidamente productos nuevos con una serie de ventajas tales como la propagación de material limpio, lo que hace que esta técnica presente grandes posibilidades de su uso en diferentes áreas valiosas para el desarrollo y regeneración del medio ambiente mediante *Miconia zamorensis* biocumuladora de metales pesados (Villalobos, 1991).

En el presente proyecto se pretende la introducción *in vitro* de *Miconia zamorensis*, utilizando semillas y fragmentos nodales, con el fin de estudiar el potencial bioacumulador de *Miconia zamorensis* en la zona de estudio, para reducir la presencia de Hg y As.

CAPITULO III METODOLOGÍA

3.1. Área de estudio.

El presente trabajo de investigación se realizó desde el Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja, en la Sección Departamental de Biología Básica y Aplicada, en el laboratorio de Fisiología Vegetal *in vitro*. Las muestras se recogieron en el Centro Minero “La Herradura–Chinapintza, parroquia Chinapintza cantón el Pangui provincia de Zamora Chinchipe. Ubicado en las coordenadas 3° 46' 4" S; 78° 39' 19" O. En la parroquia Nuevo Quito, a una distancia de 134 Km desde la ciudad de Loja y 35 Km desde la ciudad de Zamora. (ver Figura 2).

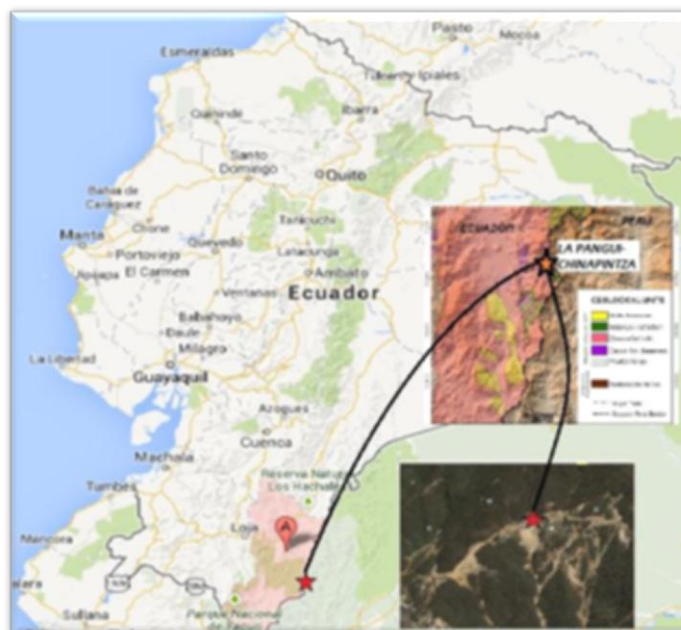


Figura 2. Ubicación geográfica de la zona minera de Chinapintza

Fuente: Navas, S 2014.

3.2. Fases de Investigación.

Se ha propuesto el siguiente diseño experimental tanto para semillas como para fragmentos nodales, a continuación se muestra en las tablas 1 y 2 los datos correspondientes al diseño experimental propuesto.

Tabla 1. Diseño experimental propuesto para el tratamiento de semillas.

Tratamientos	Semillas	Tiempo horas	Siembra MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
Sin luz	10 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
Con luz	10 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
NO ₃ K	10 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
Kin	10 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
H ₂ O ₂	10 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
GA3	10 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin

Fuente: Yauri, R 2015.

Tabla 2. Diseño experimental propuesto para el tratamientos de semillas y estacas

Semillas	Estacas	Tiempo horas	Siembra MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
10 por frasco	1 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
10 por frasco	1 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
10 por frasco	1 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
10 por frasco	1 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
10 por frasco	1 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin
		6	MS +2-4D+Kin
10 por frasco	1 por frasco	12	MS +2-4D+Kin
		24	MS +2-4D+Kin

Fuente: Yauri, R 2015.

A continuación se detallan cada una de las fases del Protocolo de investigación en el desarrollo del proyecto, cuya metodología se obtuvo de. (George, *et al.*, 2007 y Schmidt, 2000) y se desarrolló de la siguiente manera:

- Recolección de material vegetal
- Pruebas de desinfección
- Introducción *in vitro* y *ex vitro*
- Evaluación del material introducido *in vitro* como *ex vitro*.

Recolección de material vegetal de la Especie *Miconia zamorensis*

El inicio de fragmentos nodales y frutos se obtuvo de la planta “*Miconia zamorensis*” proveniente del cantón Paquisha, sector Chinapintza (Zamora –Chinchipec). (ver Figura 3 y 4).



Figura 3.Identificación de *Miconia zamorensis*

Foto: Yauri, R 2015.



Figura 4.Acondicionamiento y: transporte de *Miconia zamorensis*

Fuente: Yauri, R 2015.

3.3. Obtención de fragmentos nodales y Semillas.

Para la obtención de plántulas de *Miconia zamorensis*, en un inicio se partió de fragmentos nodales de la especie recolectada diferenciando fragmentos nodales gruesos y delgados (ver Figura 5), los cuales fueron cultivada en (Murashige and skoog, 1962) al 100% de la concentración de sales y sin reguladores de crecimiento en un Primer ensayo.



Figura 5.Obtención de fragmentos nodales

Fuente: Yauri, R 2015.

Para la obtención de semillas de *Miconia zamorensis* (ver Figura 6), se procedió con la extracción de los frutos desecados en contacto con gel de sílice por 24h en un tubo “Falcon”

de 50 ml. (ver Figura 7), luego se les aplicó el protocolo de desinfección estándar y se las sembró en medio (Murashige and skoog, 1962) al 100% de la concentración de sales con reguladores de crecimiento en una relación auxina, Citoquina (3:1) para evaluarlas.



Figura 6. Obtención de la semilla *Miconia zamorensis* a partir del fruto

Fuente: Yauri, R 2015.

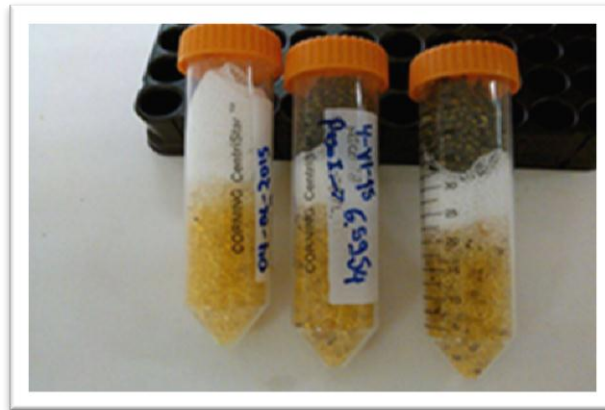


Figura 7. Extracción de semillas en contacto con gel de sílice

Fuente: Yauri, R 2015.

Otro lote de semillas sin desinfección fue usados para ser sembrados, en macetas en sustrato compuesto con turba y arena (1:1), luego la maceta es colocada en una funda plástica: “sun bag”, con la finalidad de mantener una temperatura y humedad estables.

3.4. Pruebas de Desinfección.

3.4.1. Procedimiento de desinfección en fragmentos nodales que se utilizó para *Miconia zamorensis*.

Inicialmente se colocó los fragmentos nodales en una probeta de 1000 ml más alcohol al 70% (ver Figura 8), y se agitó por 2 min., luego se enjuagó con agua destilada hasta eliminar el alcohol. En un segundo paso se colocó el 20% de hipoclorito de sodio con unas gotas de jabón y se agitó por 10 min., se enjuagó con agua estéril (ver Figura 9), hasta eliminar el cloro, Tercero se colocó H_2O_2 en una concentración de 10 volúmenes y se agitó por 10 min., se enjuagó con agua estéril hasta eliminar el H_2O_2 , y finalmente se hizo una inmersión de los fragmentos nodales mismas en una solución de 2g/L de Benomil, sin enjuagarlas.



Figura 8. Desinfección de fragmentos nodales en una probeta de 1000 ml más alcohol al 70%

Fuente: Yauri, R 2015.



Figura 9. Enjuague con agua estéril hasta eliminar el cloro

Fuente: Yauri, R 2015.

Una vez desinfectados los fragmentos nodales, se sumergió en una solución con Benomil por 10 min. Se filtró el Benomil y se procedió a sembrar en el medio (Murashige and skoog, 1962), un fragmento nodal por frasco. Se pesó 4,3g/L de medio (Murashige and Skoog, 1962), 7g/L de Plate count Agar, 0,001g/L de 2-4-D Auxina y 0,005g/L de Kinetina, todo este grupo de elementos, fueron disueltos en 1L de agua destilada con la ayuda de un agitador magnético, ajustando un Ph de 5.8. Finalmente se dispensó el medio dentro de la cabina de flujo laminar. Finalmente los frascos fueron rotulados y colocados en el cuarto de crecimiento para esperar una respuesta.

3.4.2. Procedimiento de desinfección en Semillas in vitro para *Miconia zamorensis*.

Primero se colocó las semillas en tubo “Falcon” de 50 ml, más alcohol al 70% y se agitó por 2 min (ver Figura 10), luego se enjuagó con agua destilada hasta eliminar el alcohol, segundo se colocó el 20% de hipoclorito de sodio con unas gotas de jabón y se agitó por 5 min., se enjuagó con agua estéril hasta eliminar el cloro, tercero se colocó una solución al 10% de H₂O₂ (10 vol.) y se agitó por 5 min., se enjuagó con agua estéril hasta eliminar el H₂O₂, y finalmente se colocó una solución de 100 ppm al 100% de reguladores de crecimiento sin enjuagarla (ver Fig.11).



Figura 10. Desinfección de semillas en tubo “Falcon” de 50 ml, más alcohol al 70%

Fuente: Yauri, R 2015.



Figura 11. Solución de 100 ppm de concentración al 100% de reguladores de crecimiento con semillas *Miconia zamorensis*

Fuente: Yauri, R 2015.

Una vez desinfectadas las semillas, se las sumergió en una solución de 100 ppm al 100% de H_2O_2 , GA_3 , KNO_3 y KIN respectivamente y se procedió a sembrar en el medio (Murashige and skoog, 1962) en un promedio de 10 semillas por frasco con la ayuda de una micropipeta de 500 ul, con puntas estériles (ver Figura 12). Siendo esta de ayuda para recoger las semillas del fondo del tubo Falcon de 50ml (ver Figura 13). Para finalizar los

frascos fueron rotulados y colocados en el cuarto de crecimiento para esperar una respuesta.



Figura 12. Siembra en el medio (MS) mediante el uso de una micro pipeta de 500 µl con punta estéril

Fuente: Yauri, R 2015.



Figura 13. Extracción de semillas del fondo del tubo Falcon de 50ml.

Fuente: Yauri, R 2015.

3.5. Diseño experimental.

3.5.1. Bloques completos al azar, 4 tratamientos con 6 repeticiones y dos blancos.

3.5.1.1. Desarrollo del diseño experimental.

En esta investigación se ejecutaron 4 experimentos independientes durante el mismo ciclo de siembra empleando, *Miconia zamorensis* en fragmentos nodales y semillas.

3.5.1.1.1. Experimento con Fragmentos nodales in vitro.

El experimento fue llevado a cabo en frascos de cultivo, el tamaño del recipiente 5,5 cm de base, 10 cm de altura, que contiene un medio (Murashige y Skoog, 1962), al 100% de la concentración de sales con reguladores de crecimiento, se realizó un procedimiento de desinfección (George *et al.*, 2007). En fragmentos nodales y finalmente se sembró para evaluar su respuesta.

3.5.1.1.2. Experimento en macetas con fragmentos nodales ex vitro.

El experimento fue llevado a cabo en macetas, de 8 cm de base, 15 cm altura, y 10 cm en la parte superior, que contiene 176.5 g de sustrato (ver Figura 14), compuesto con turba y arena, (1:1). Las macetas fueron puestas dentro de fundas “sun bag”. Durante el periodo de cultivo, se regó con una solución correspondiente a 1,5 mg/L de Nitrofoska foliar, El riego se hizo con una regadera cada 8 días (ver Figura 15).

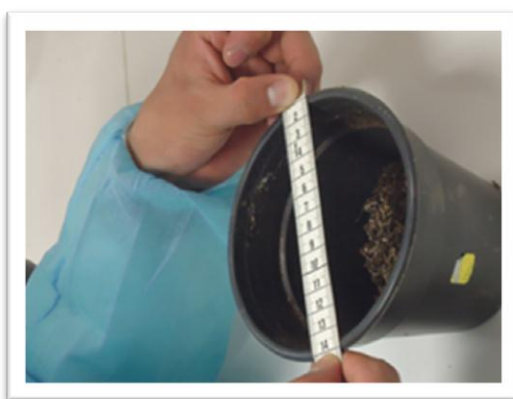


Figura 14. Macetas, de 8 cm de base, 15 cm altura, y 10 cm en la parte superior.

Fuente: Yauri, R 2015.



Figura 15.Riego con Nitrofoska foliar.

Fuente: Yauri, R 2015.

3.5.1.1.3. Experimento en maceta con semillas en Invernadero (ex-vitro).

El suelo usado en este experimento fue constituido de una mezcla de turba y arena (1:1) (ver Figura 16). Que fueron mantenidas en fundas “sun bag”, tomando 4 frutos se dispersaron sus semillas en cada maceta. El riego fue cada 8 días con una solución de Nitrofoska foliar (1,5 mg/L).



Figura 16.Mezcla de turba y arena (1:1)

Fuente: Yauri, R 2015.

3.5.1.1.4. Experimento con semillas in-vitro.

El experimento fue llevado a cabo en frascos de cultivo, el tamaño del recipiente 5,5 cm de base, 10 cm de altura. Se utilizó medio (Murashige y Skoog, 1962) al 100% de la

concentración de sales con reguladores de crecimiento en una concentración 2-4 D, y kinetina de (0,001g/l; 0,005g/l).

3.5.2. Análisis de datos.

Fragmento nodales: Tanto *in vitro* como *ex vitro*. De los fragmentos nodales no hubo respuesta y no se hicieron análisis.

Semillas *in vitro*: Para el análisis de datos de semillas *in vitro* se ejecutó el programa GraphPadPrism, versión 5.00 se realizó una prueba con ANOVA para la comparación de medias con una prueba de TUKEY ($P < 0,005$), se calcularon los valores de media y desviación estándar de 6 réplicas.

Las semillas *ex vitro* se analizan mediante una inferencia partiendo de los resultados: Sacamos una media e inferimos el % de germinación. Sabiendo que en cada maceta hay 5 frutos. Éstos tienen una media de 40 semillas cada uno lo que resulta en un total de 200 semillas / maceta. Y dividimos este dato para el total de plántulas obtenidas. Tenemos así el % de germinación.

CAPITULO IV RESULTADOS

4.1. Fragmentos nodales *in vitro*.

No se observaron respuestas de ninguno de los fragmentos nodales, ya que sufrieron un necrosamiento y oxidación del medio sin hongos ni bacterias (ver Figura 17).



Figura 17. Necrosis de la estaca causa por el H_2O_2 a 10vol. de concentración y oxidación de medio debido a los exudados desprendidos por la estaca.

Fuente: Yauri, R 2015.

En las siguientes manipulaciones se observó colonización de hongos, necrosamiento de fragmentos nodales y oxidación del medio (Ms), se llegó a la conclusión que en este diámetro bajo estas condiciones no se obtuvo una brotación de yemas (Ver Figura 18, Figuras 19).

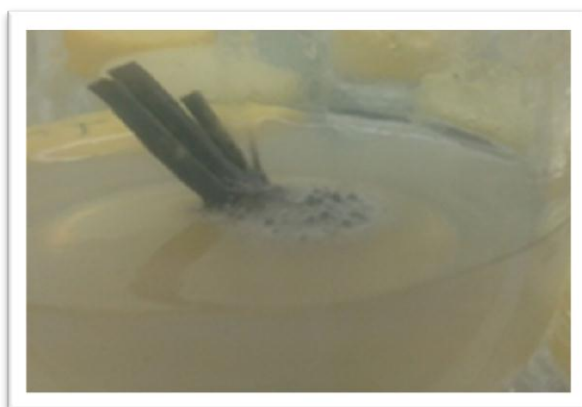


Figura 18. Colonización de hongos en fragmento nodal y proliferación en medio (Ms).

Fuente: Yauri, R 2015.

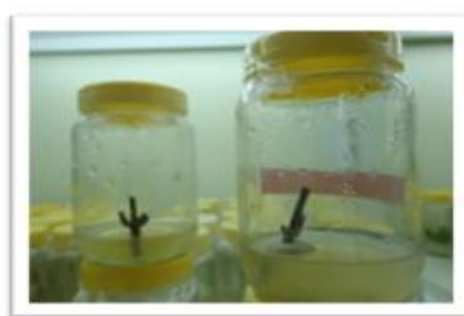


Figura 19. Necrosis del fragmento nodal causa por el H_2O_2 y colonización de hongo en estaca.

Fuente: Yauri, R 2015.

4.2. Fragmentos nodales *ex vitro* (Invernadero).

La brotación fue menor al 1% debido a las condiciones no controlables, por lo cual no se obtuvo respuesta (ver Figura 20, Figura 21).

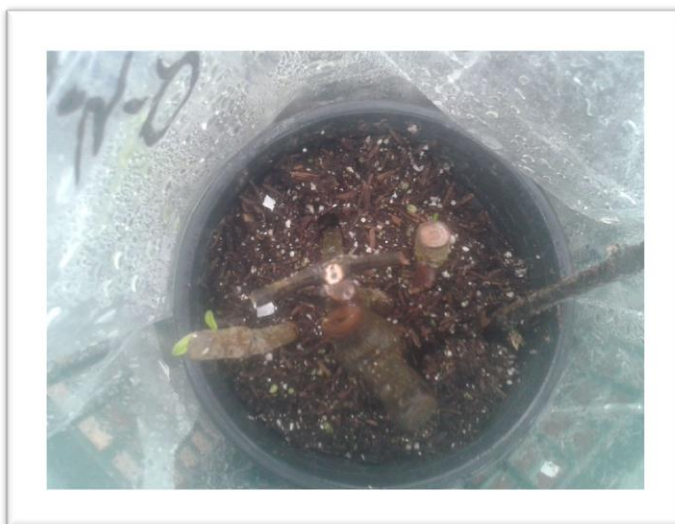


Figura 20. Ausencia de respuesta

Fuente: Yauri, R 2015.

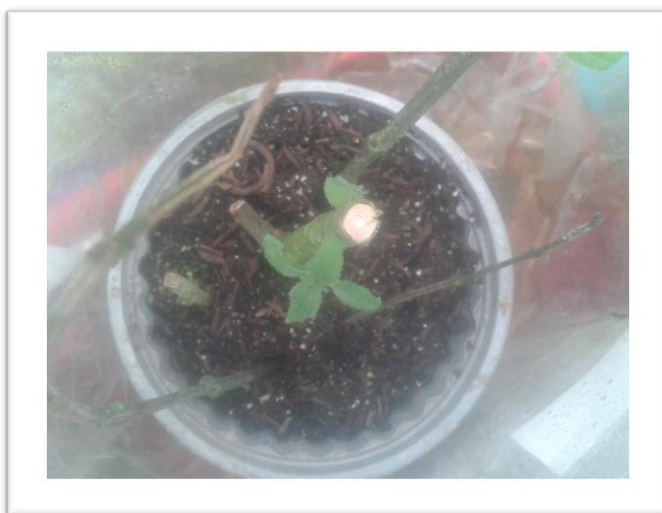


Figura 21. Brote de fragmento nodal

Fuente: Yauri, R 2015.

4.2.1. Semillas ex vitro (invernadero).

Los resultados obtenidos (2746 plantas) en el invernadero (ver Figura 24) mediante la siembra de semillas, fue con una mínima de 0 (ver Figura 22) y una máxima de 187 (ver Figura 23) por maceta; un promedio de 200 semillas por maceta, logramos inferir 6.7% de germinación por maceta en el lote total de semillas.



Figura 22.Semillas en proceso de germinación

Fuente: Yauri, R 2015

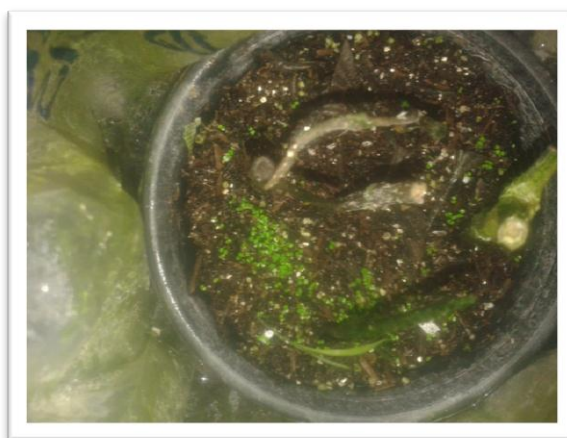


Figura 23.Germinación de semillas en invernadero

Fuente: Yauri, R 2015



Figura 24. Germinación de semillas en invernadero

Fuente: Yauri, R 2015

4.3. Semillas *in vitro*.

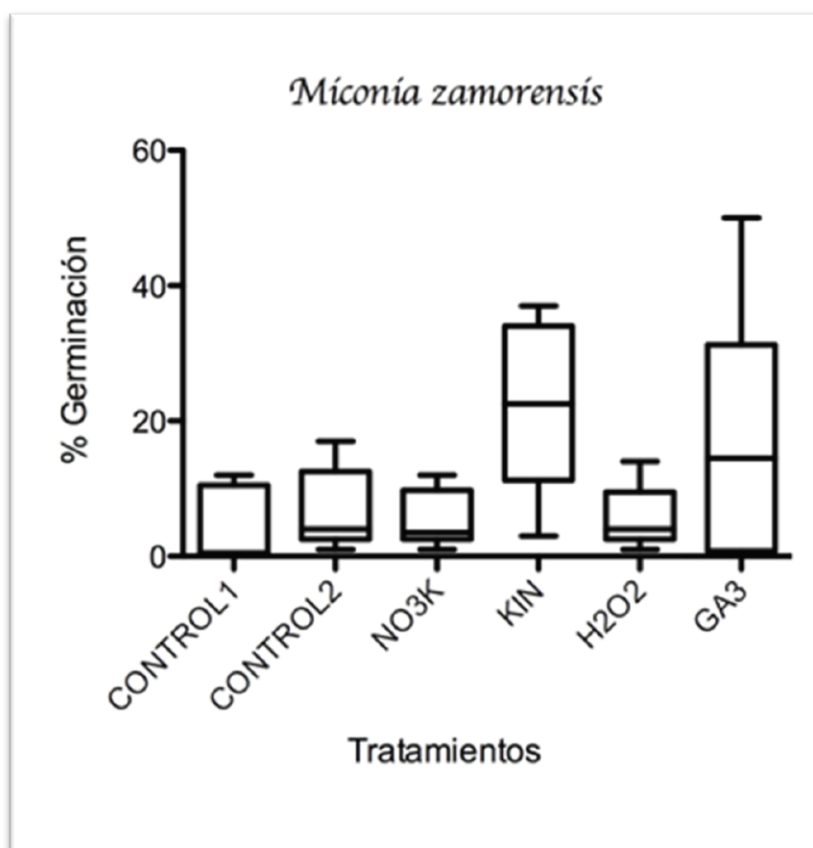


Figura 25. Germinación con tratamientos de semillas *Miconia zamorensis in vitro*.

Fuente: Yauri, R 2015

Como se puede observar en la Figura 25. Podemos considerar el comportamiento de los diferentes tratamientos aplicados para la germinación, existe diferencia significativa ($P < 0.005$) entre los tratamientos con KIN con un mayor porcentaje del 38% de germinación vs tratamiento 1 (Sin luz) con un menor porcentaje del 10% de germinación, por cual se determina que el mejor resultado fue KIN (ver Figura 26), con respecto a los otros tratamientos incluidos el ácido giberélico, que visualmente parecería tuviera una importancia significativa, estadísticamente nos dice que no es significativa frente a los demás tratamientos analizados y sus controles;

Tratamiento 1 Sin luz; Afecto significativamente el porcentaje de germinación.

Tratamiento 2 Con luz; En este estudio la luz muestra, el importante papel para la germinación de semillas *Miconia zamorensis*.

Tratamiento 3 NO₃K; No tiene importancia significativa en cuantos a los demás tratamientos.

Tratamiento 4 KIN; Tiene un efecto significativo, la germinación aumento rápidamente con el tiempo (ver Figura 26).



Figura 26. Germinación de semillas de *Miconia zamorensis*.

Fuente: Yauri, R 2015.

Tratamiento 5 H₂O₂; Frente a los demás tratamientos no es significativo, en cuanto a germinación.

Tratamiento 6 GA₃; A pesar que visualmente pareciera que tuviera una importancia significativa, estadísticamente nos dice que no es representativa frente a los demás tratamientos analizados.

A continuación se presentan en las tablas 3 y 4 la síntesis de resultados obtenidos en los tratamientos de fragmentos nodales y semillas.

Tabla 3. Síntesis de resultados de tratamientos de fragmentos nodales.

Tratamiento	H ₂ O ₂ 10 vol.	Manipulaciones
	10 vol.	4
	110 vol.	4
Fragmentos nodales <i>in vitro</i>	Contaminación	
	Necrosis	
Tratamiento	2-4D	
Fragmentos nodales <i>ex vitro</i>	<1% brotes iniciales	

Fuente: Yauri, R 2015.

Tabla 4. Síntesis de resultados de tratamientos de semillas.

Semillas	Tratamientos	días hasta germinación	% de Germinación
	Substancias. Químicas	60	
<i>in vitro</i>			
	Reguladores. De crecimiento	60	Kinetina 40%
<i>ex vitro</i>	Nitrofoska foliar	60	16,04%

Fuente: Yauri, R 2015.

CAPITULO V DISCUSIÓN

5.1. Semillas *in vitro*.

Los agentes de desinfección tales como: etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 20%, y el peróxido de hidrógeno, al 10 vol. (Amaya y Eliecer, 2014) no fueron eficaces para controlar los contaminantes, haciendo más difícil las condiciones para introducir *in-vitro* *Miconia zamorensis*. Por ello buscamos cambiar las concentraciones y el tiempo de contacto de los desinfectantes.

Desde el punto de vista la latencia en la semilla presenta algunos inconvenientes que impiden que esta germine en presencia de factores que normalmente se consideran suficientes para la germinación: temperatura adecuada, humedad y medio ambiente adecuado. Una semilla viable es la que puede germinar en condiciones favorables, siempre que en su caso se elimine la latencia que pueda estar presente (Baskin y J.M. Baskin, 2014).

Nosotros definimos que el mejor tratamiento fue con Kinetina comparado con los H_2O_2 , KNO_3 , Acido Giberélico. En cuanto a la variación de los tiempos y concentraciones de los desinfectantes, el tiempo de aplicación del tratamiento las semillas se las sometió a un periodo de 24, 48, 72, horas en contacto con KNO_3 , se concluye que el mejor fue 24 horas con KNO_3 .

En lo que respecta a la latencia en semillas es controlada por factores exógenos como (Luz, temperatura y humedad), y factores endógenos principalmente hormonas, como la Benzil-Adenina, (BA), pero también incluyen pequeñas moléculas como el cianuro de hidrógeno (CNH), óxido nítrico (NO) y alcohol (Yang ling, Wang Jian-an y Shen Hai-long 2012). Para superar esta dormancia se han evaluado los tratamientos propuestos en el experimento.

Como resultado se obtuvo un porcentaje del 38% germinación en 60 días, existiendo diferencias en los porcentajes de germinación de las semillas entre los tratamientos (ver Fig.25). El porcentaje más alto fue 38% en semillas sembradas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con luz (fotoperiodo 12/12) y con tratamiento de 100 ppm de reguladores de crecimiento. Teniendo en cuenta que la luz es el factor determinante en cuanto a las diferencias de porcentajes de germinación, el 2% de diferencia entre los promedio de germinación con tratamiento luz y oscuridad no son significativos, ya que tienen dos por ciento de diferencia, lo cual concuerda que determinadas especies requieren de luz para germinar, y que implicaría la activación de genes inducidos por el fitocromo. La luz por otra

parte, es un estimulador ambiental que puede romper la latencia, pero también puede inhibir la germinación. El fitocoromo A; B; y E inducen directamente la germinación (Schmidt, 2000).

Estudios realizados en *Miconia. pepericarpa* y *Miconia. ligustroides* contienen embriones viabiles que no germinan bajo condiciones favorables, ambas especies a pesar de contar con las mejores condiciones no germinan por lo que son consideradas latentes (Silveira, 2013). Estas respuestas indican que las semillas de ambas especies son fisiológicamente inactivas. Es decir posiblemente poseen “Latencia Fisiológica”, (Baskin y Baskin, 2005). [La cual incluye la familia Melastomataceae (Silveira, 2013).

En cuanto a la fisiología de metales pesados, la acumulación de los mismos en plantas es selectiva dependiendo de la variedad y especie, siendo de gran importancia conocer el grado de acumulación de metales pesados en sus semillas, la clave en la acumulación de metales actúa como una trampa natural de barrido para su translocación hacia las semillas retrasando la germinación. (Singh et al. 2004; Betancur, 2005).

Teniendo como referencia este estudio, hipotetizamos que la acumulación de metales pesados en la manipulación con semillas *Miconia zamorensis* tuvo influencia en cuando al lapso de tiempo para su germinación.

5.2. Semillas ex vitro.

La calidad de las semillas (semillas frescas recolectadas); seguimiento con fertirrigación. Excediendo las expectativas de “producción de plántulas”. Esto constituye una ventaja ya que estas plantas no necesitan la fase de adaptación que las vitroplantas exigen posiblemente, el tiempo de germinación prolongado se deba a la influencia de los metales pesados en el medio natural (Singh et al. 2004).

En lo que se concierne al fertilizante agrícola “Nitrofoska” se ha concluido que es esencial para una buena germinación a partir de los 60 días, la elongación representa un vital paso en la planta, un alto porcentaje de elongación como resultado de riego cada 8 días con Nitrofoska foliar, hubo un crecimiento de 0,5 cm por mes.

El aumento de germinación se asoció positivamente al estímulo con la luz (Schmidt, 2000).

5.3. Fragmentos nodales *in vitro*.

Discusión de los resultados de las manipulaciones; H₂O₂; tratamientos-→ El H₂O₂ en estacas *in vitro*

Previos estudios han demostrado que el H₂O₂ como tratamiento es efectivo en la desinfección y mejorar los porcentajes de germinación (Amaya, 2014). Sin embargo el H₂O₂ es más efectivo que otros agentes de desinfección para tejidos de plantas (Garmendia, 2006), Aunque se ha encontrado que el H₂O₂ es el mejor método para la desinfección y tiene un bajo nivel de contaminación y un alto porcentaje de germinación en semillas, debemos inferir que el H₂O₂, utilizada en este estudio con estacas de *Miconia zamorensis* a 110 vol. de concentración obtuvimos una necrosis total en el tejido vegetal , que duró la observación 60 días, sin tener contaminación, pero no se pudo observar brotes, esto nos permitió disminuir las concentraciones de H₂O₂ ,sin embargo no se obtuvo una buena respuestas en estacas *Miconia zamorensis*

H₂O₂: las concentraciones comerciales de este producto se encuentran en 10 vol. En nuestro caso, luego de acabado el stock de este producto en el laboratorio, se recibió una nueva remesa del Departamento de Química. Para nuestras manipulaciones partíamos de la concentración inicial anunciada más arriba. Lastimosamente, la concentración de la nueva remesa fue muy superior a la usada de manera tradicional (110 Vol), cuya concentración es usada en análisis químico. Lo que tuvo un efecto necrosante sobre los tejidos de las estacas del experimento *in vitro*.

5.4. Fragmentos nodales *ex vitro*

Las estacas colocadas en las macetas en el invernadero, todas tenían las condiciones necesarias para iniciar el brote de yemas axilares. Todas entre 2 y 3 yemas por estaca. El tratamiento recomendado para estos casos es el uso de una auxina. En nuestro caso usamos una de las auxinas más fuertes, el 2-4-D. A pesar de ello, la respuesta de las estacas o fragmentos nodales, fue menor al 1%. (ver Figura 20 y 21) Posiblemente otro factor que tuvo influencia en esta respuesta fue la edad de las estacas. Al carecer de muchos individuos donantes de estacas, se tuvo que traer lo que había a disposición y todo ese material fue de la misma edad: individuos jóvenes. Posiblemente se deberá probar con individuos más maduros.

CONCLUSIONES

1. La introducción *in vitro* de *Miconia. zamorensis* ha dado resultados interesantes que abre nuevos temas de investigación para futuros proyectos con esta especie; mostrando la factibilidad de siembra de semillas *in vitro* y al mismo tiempo, la fragilidad del tejido vegetal al ser sometido a los desinfectantes estándar usados en el experimento.
2. Las semillas *in vitro* tienen un tiempo de germinación de alrededor de 60 días y en el invernadero un tiempo igual. Esto nos indica que posiblemente los argumentos sobre el efecto del Hg y demás metales pesados influyeron en este proceso, retrasando su germinación.
3. La producción de plántas, para el 2do año del proyecto, ha sido cumplida con un número alto de plántulas. (2746 individuos).
4. Este trabajo ha ayudado a conocer un poco más sobre la biología reproductiva de esta especie, tanto *in vitro* como *ex vitro*. Lo cual constituye por sí en un aporte importante para el futuro de las intervenciones en fitoremediación en la zona de estudio.
5. La evaluación general arroja que el método *in vitro* exige mayor tiempo hasta producir un número requerido de individuos;
 - a. La comparación entre los métodos en *in vitro* y *ex vitro*, nos demuestra que es necesario un mayor cuidado en el manejo de los productos que intervienen en el proceso: caso del H₂O₂;
 - b. Las concentraciones de productos químicos y reguladores de crecimiento también es un tema que se debe afinar, en función de cada especie en estudio.

RECOMENDACIONES

Se recomienda partir de una concentración de 100 ppm de Kinetina, luego efectuar un concentración de 200ppm de concentración de Kinetin y una disolución 50 ppm de concentración, para ver cual de estas concentraciones nos brinda una germinación en menor tiempo.

Igualmete hacer tratamientos con luz para determinar si tiene efecto en la germinación. Luz sin reguladores de crecimiento y obscuridad, sin reguladores de crecimiento.

Realizar estudios en cuanto muerte descendiente (ver Figura 27).



Figura 27. Muerte Descendiente

Fuente: Yauri, R 2015.

Investigar otras formas alternativas de trataminetos fisicos, quimicos y biológicos que nos permitan la obtención de un mayor número de germinación en *Miconia zamorensis*.

Habrà que tener en cuenta que a partir de los 30 días de germinación, se debe realizar el cambiò de medio alternativo con reguladores de crecimiento, ya que se pudo observar en este estudio existe una deficiencia de algùn oligoelemento bien puede ser el hierro o cobalto (Albareda *et al.*, 1952).

Que el laboratorio de fisiología vegetal: debe ser exclusivo para esta actividad, el ingreso de otros proyectos o actividades tiene un efecto negativo sobre el control de la asepsia que se intenta mantener.

Mantener un registro gráfico lo más completo posible de todo el proceso de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albareda, J. M., & Herrera, G. M. (1952). Los Oligoelementos en Geología y Biología. Real Academia Nac. Medicina, 12-17.
2. Ali, H., Khan, E., y Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals concepts y applications. Chemosphere, 91.7, 869-881.
3. Amaya, R., y Eliécer, J. (2014). Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas, 18-30.
4. Armijos, K. (2015). Determinación de metales pesados en especies vegetales de un área explotada por la minería aurífera en el sector de La Pangui-Zamora Chinchipe, obtención del título Ingeniera en Gestión Ambiental, Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, 6-10.
5. Baskin, C. C., y Baskin, J. M. (1998). Germination ecology of seeds with physical dormancy. Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination, 5-42.
6. Betancur, L. M. A., Mazo, K. I. M., y Mendoza, A. J. S. (2005). Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. Red Revista Lasallista de Investigación, 57-59.
7. Bian, L., Yang, L., Wang, J. A., y Shen, H. L. (2013). Effects of KNO₃ pretreatment and temperature on seed germination of *Sorbus pohuashanensis*. Journal of forestry research, 24(2), 309-316.
8. Bogatek, R., Gniazdowska, A., Zakrzewska, W., Oracz, K., y Gawronski, S. W. (2006). Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth. Biologia Plantarum, 50(1), 156-158.
9. Bonilla Valencia, S. M. (2013). Estudio para tratamientos de biorremediación de suelos contaminados con plomo, utilizando el método de fitorremediación. 2-26.
10. Burneo, S. (2013). Megadiversidad. Letras Verdes. Revista Latinoamericana de Estudios Socioambientales, (3), 6-7.
11. Carpena, R. O., y Bernal, M. P. (2007). Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. Revista Ecosistemas, 16(2).
12. Divya, B., y Kumar, M. D. (2011). Plant microbe interaction with enhanced bioremediation. Research Journal of Biotechnology, 6, 72-79.
13. Durango, J. V. V., Negrete, J. L. M., Colorado, B. J., y Castro, L. M. P. (2010). INGENIERÍA Y D E. Ingeniería y desarrollo, (27), 113-129.

14. Evangelou, M. W. H., y Ratte, U. D. H. T. (2007). Biochelators as an alternative to EDTA and other synthetic chelators for the phytoextraction of heavy metals (Cu, Cd, Pb) from soil. Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften. Aachen, RWTH Aachen University. 2-9
15. Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., y Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2), 179-187.
16. Fries, A., Rollenbeck, R., Göttlicher, D., Nauss, T., Homeier, J., Peters, T., y Bendix, J. (2009). Thermal structure of a megadiverse Andean mountain ecosystem in southern Ecuador and its regionalization. *Erdkunde*, 321-335.
17. Garmendia, G., y Méndez, S. V. (2006). Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. *Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*, (197), 18-27.
18. Gaur, A., y Adholeya, A. (2004). Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Curr Sci*, 86(4), 528-534.
19. George, E. F., Hall, M. A., y De Klerk, G. J. (2008). Plant propagation by tissue culture: volume 1. the background (Vol. 1). Springer Science y Business Media. 1-127.
20. Klekailo, G., Tuesca, D., y Barberis, I. M. (2012). Efectos de la temperatura, el ambiente lumínico y la escarificación sobre la germinación de semillas de *Bromelia serra* Griseb.(Bromeliaceae). *Journal of Seed Science*, 34(4).
21. Majure, L. C., Neubig, K. M., Skean Jr, J. D., Bécquer, E. R., y Judd, W. S. (2015). Evolution of the Sandpaper clade (Miconieae, Melastomataceae). *International Journal of Plant Sciences*, 176(7), 607-626.
22. Murcia, D., Soliz Torres, M. F., Valladares, C., y Maldonado, A. (2012). Infancia de oro en la cordillera Del Cóndor. 10-16.
23. Ocampo, G., Michelangeli, F. A., y Almeda, F. (2014). Seed diversity in the tribe Miconieae (Melastomataceae): Taxonomic, systematic, and evolutionary implications. *PloS one*, 9(6).
24. Ortega-Ortiz, H., Benavides-Mendoza, A., Alonso, R. A., y Zermeño-González, A. Fitorremediación De Suelos Contaminados Con Metales Pesados.2-20.

25. Parra, H. (2009). LA RESPONSABILIDAD AMBIENTAL DE LAS EMPRESAS MINERAS CONFORME A LA LEGISLACIÓN DEL ECUADOR. Obtención del título Postgrado con especialidad en Derecho empresarial. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, 9-21.
26. Samaniego, S. J. P. (2012). Análisis de la realidad social-jurídica de la población colombiana en el cantón Yantzaza, provincia de Zamora Chinchipe. *Cognitio Juris*, 2(4), 24-31.
27. Sandoval, F. (2001). La pequeña minería en el Ecuador. IIED and WBCSD (Ed.), Mining, Minerals and Sustainable Development (MMSD), 75, 30.h
28. Sarango, S. (2013). La minería artesanal y pequeña minería en el cantón Yacuambi, provincia de Zamora Chinchipe: Análisis socioeconómico y ambiental, período 2001-2013, obtención del título Economista, Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, 6-23.
29. Schmidt, L. (2000). Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. Danida Forest Seed Centre, 76-79.
30. Sepúlveda, T. V. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Instituto Nacional de Ecología. 19-21.
31. Singh, S., Kang, S. H., Mulchandani, A., y Chen, W. (2008). Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering. *Current opinion in biotechnology*, 19(5), 437-444.
32. Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., y Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011. 2-5.
33. Ullah, A., Heng, S., Munis, M. F. H., Fahad, S., y Yang, X. (2015). Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 117, 28-40.
34. Villalobos, V. M., y Thorpe, T. A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones prácticas. CIAT, 127-142.

ANEXOS

	CONTROL 1 CL	CONTROL 2 SL	NO ₃ K	KIN	H ₂ O ₂	GA ₃
1	12	17	12	37	1	18
2	10	4	1	14	4	0
3	0	3	9	18	4	1
4	0	4	3	27	14	11
5	1	11	4	33	8	50
6	0	18	3	3	3	25

Anexo 1: Número de manipulaciones y número de germinaciones por cada tratamiento *in vitro*, *Miconia zamorensis*.

Residual (random)	2368	25	94.71		
Total	4825	35			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
CONTROL1 vs CONTROL2	-2.833	0.7132	No	ns	-20.16 to 14.49
CONTROL1 vs NO3K	-1.500	0.3776	No	ns	-18.83 to 15.83
CONTROL1 vs KIN	-18.17	4.573	Yes	*	-35.49 to -0.8399
CONTROL1 vs H2O2	-1.833	0.4615	No	ns	-19.16 to 15.49
CONTROL1 vs GA3	-13.67	3.440	No	ns	-30.99 to 3.660
CONTROL2 vs NO3K	1.333	0.3356	No	ns	-15.99 to 18.66
CONTROL2 vs KIN	-15.33	3.859	No	ns	-32.66 to 1.993
CONTROL2 vs H2O2	1.000	0.2517	No	ns	-16.33 to 18.33
CONTROL2 vs GA3	-10.83	2.727	No	ns	-28.16 to 6.493
NO3K vs KIN	-16.67	4.195	No	ns	-33.99 to 0.6601
NO3K vs H2O2	-0.3333	0.08390	No	ns	-17.66 to 16.99
NO3K vs GA3	-12.17	3.062	No	ns	-29.49 to 5.160
KIN vs H2O2	16.33	4.111	No	ns	-0.9934 to 33.66
KIN vs GA3	4.500	1.133	No	ns	-12.83 to 21.83
H2O2 vs GA3	-11.83	2.978	No	ns	-29.16 to 5.493

Anexo 2: Análisis estadístico de Germinación en semillas *Miconia zamorensis* con tratamientos, *in vitro*.

TOTAL DE SEMILLAS GERMINADA EX VITRO	% MIN DE GERMINACIÓN	% MAX DE GERMINACIÓN	PROMEDIO	INFERENCIA
2746	0	187	30.1758242	16.04

Anexo 3. Germinación de semillas *Miconia zamorensis ex vitro*. se analizan mediante una inferencia partiendo de los resultados: Sacamos una media e inferimos el % de germinación. Sabiendo que en cada maceta hay 5 frutos. Éstos tienen una media de 40 semillas cada uno

lo que resulta en un total de 200 semillas / maceta. Y dividimos este dato para el total de plántulas obtenidas. Tenemos así el % de germinación.