



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO EN GESTIÓN AMBIENTAL

Influencia de los reguladores de crecimiento Kinetina y Ácido giberélico sobre la germinación de semillas de *Bixa orellana* en cultivo *in vitro*.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Moncada Martínez, Andrea Stefanía.

DIRECTOR: Lucero Mosquera, Hernán 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

Ingeniero.

Hernán Patricio Lucero Mosquera.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **Influencia de los reguladores de crecimiento Kinetina y Ácido giberélico sobre la germinación de semillas de *Bixa orellana* en cultivo *in vitro*** realizado por Andrea Stefanía Moncada Martínez, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Agosto de 2016

f. _____

Hernán Patricio Lucero Mosquera.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

"Yo Andrea Stefanía Moncada Martínez declaro ser autora del presente trabajo: **Influencia de los reguladores de crecimiento Kinetina y Ácido giberélico sobre la germinación de semillas de *Bixa orellana* en cultivo *in vitro***, de la Titulación de Ingeniería en Gestión Ambiental, siendo el Ingeniero Hernán Patricio Lucero Mosquera director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posible 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 vigente 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 o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

f. _____

Autora: Andrea Stefanía Moncada Martínez

Cédula: 1105556920

DEDICATORIA

A Dios porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mi padre Baltazar y mi madre Olga quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi capacidad para cumplir mis metas.

A mis hermanos Tatiana, Mayra y Luis por sus consejos y su apoyo incondicional.

De manera muy especial a mi querida abuela Elma por su cariño y sus consejos.

Andrea Stefanía Moncada Martínez

AGRADECIMIENTO

Mi sincero agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja, Escuela de Titulación de Ingeniería en Gestión Ambiental, así mismo al laboratorio de Fisiología Vegetal y a su personal de trabajo.

A los distinguidos docentes que a lo largo de la carrera nos han transmitido sus valiosos conocimientos.

De manera especial a mi estimado director de tesis ingeniero Hernán Lucero Mosquera por guiarme en todo momento, por sus sugerencias y enseñanzas, por su amistad y su tiempo, desde el inicio de este trabajo que hicieron posible su realización.

A todos mis amigos dentro de 5 años de carrera por su amistad sincera, cariño, preocupación y confianza, esenciales en el desarrollo de la carrera y mi formación como persona.

Andrea Stefanía Moncada Martínez

INDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	5
CAPITULO I.....	6
1 MARCO TEÓRICO.....	6
1.1 <i>Bixa orellana</i>	7
1.1.1 Etimología.....	7
1.1.1.1 Clasificación botánica.....	7
1.1.1.2 Descripción botánica.....	8
1.1.1.2.1 Tronco.....	8
1.1.1.2.2 Hojas.....	8
1.1.1.2.3 Flores.....	9
1.1.1.2.4 Fruto.....	9
1.1.1.2.5 Semillas.....	9
1.1.1.2.6 Raíz.....	9
1.1.2 Pigmentos carotenoides.....	10
1.1.2.1 Bixina.....	10
1.1.2.2 Norbixina.....	10
1.1.3 Usos médicos.....	10
1.1.4 Distribución geográfica.....	10
1.1.5 Cultivo <i>In vitro</i>	11
1.1.5.1 Generalidades.....	11
1.1.5.2 Condiciones ambientales del cultivo <i>in vitro</i>	12
1.1.5.2.1 Luz.....	12
1.1.5.2.2 Temperatura.....	12
1.1.5.2.3 Humedad relativa.....	13
1.1.6 Problemas asociados al cultivo <i>in vitro</i>	13

1.1.6.1	Contaminación.....	13
1.1.6.2	Oxidación.....	13
1.1.7	Medio de cultivo.....	13
1.1.8	Germinación.....	14
1.1.9	Latencia en semillas.....	14
1.1.10	Reguladores de crecimiento.....	14
1.1.10.1	Generalidades.....	14
1.1.10.1.1	Citoquininas.....	15
1.1.10.1.2	Giberelinas.....	15
CAPITULO II.....		17
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1	Lineamientos del diseño experimental.....	17
2.2	Material Vegetal.....	18
2.3	Medio de cultivo.....	19
2.3.1	Preparación medio de cultivo.....	19
2.4	Semillas.....	20
2.4.1	Protocolo de Desinfección.....	20
2.4.2	Aplicación de Tratamientos.....	20
2.5	Esterilización de materiales.....	21
2.6	Siembra.....	21
2.7	Análisis estadístico.....	21
CAPITULO III.....		22
3	RESULTADOS.....	22
3.1	Germinación <i>in vitro</i>	23
3.2	Tratamientos en diferentes periodos de exposición y concentraciones.....	24
CAPITULO IV.....		25
4	DISCUSIÓN.....	25
4.1	Semillas <i>in vitro</i>	26
CONCLUSIONES.....		28
RECOMENDACIONES.....		29
BIBLIOGRAFÍA.....		30
ANEXOS.....		35

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1 Planta de Bixa orellana en estado de fructificación	8
Figura 2 Distribución de Bixa orellana en provincias de Ecuador	11
Figura 3 Fases de la investigación	18
Figura 4 Pérdida de humedad de semillas	20
Figura 5 Número de semillas de Bixa orellana germinadas por frasco	23
Figura 6 Porcentajes de germinación por tiempos de exposición y concentraciones	24
Tabla 1 Clasificación botánica	7
Tabla 2 Diseño experimental	17

RESUMEN

El programa de investigación “Distribución geográfica, biológica reproductiva, diversidad genética y química de especies vegetales de interés, medicinal, en la región sur del Ecuador” busca aumentar el conocimiento sobre la especie de *Bixa orellana*, para preservar la diversidad y contar con una fuente sustentable de especies productoras de metabolitos de interés. Bajo este contexto el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia de los reguladores de crecimiento Kinetina y Ácido giberélico en concentraciones de 100, 1000, 2000 y 3000 ppm, por tres tiempos de 60, 90 y 120 minutos, sobre la germinación de semillas de *Bixa orellana* en condiciones *in vitro*. Al usar 1000 ppm de Kinetina por 120 minutos se obtuvo un 52% de germinación mientras que para el Ácido giberélico al usar 1000 ppm por 120 minutos se obtuvo un 60% de germinación, siendo el tiempo de 120 minutos y la concentración de 1000 ppm los mejores para ambos tratamientos y en los controles de ambos tratamientos no hubo germinación.

Palabras claves: Ácido giberélico; *Bixa orellana*; cultivo *in vitro*; germinación de semillas; Kinetina; Murashige – Skoog, (1962).

ABSTRACT

The research program "Medicinal geographical distribution, reproductive biological, genetic and chemical diversity of plant species of interest, in the southern region of Ecuador" seeks to raise awareness about the species *Bixa orellana*, to preserve the diversity and have a source sustainable metabolites producing species of interest. In this context the present work was to evaluate the influence of growth regulators kinetin and gibberellic acid at concentrations of 100, 1000, 2000 and 3000 ppm, for three days 60, 90 and 120 minutes on the germination of seeds *Bixa orellana* in conditions *in vitro*. Using 1000 ppm of kinetin for 120 minutes 52% germination was obtained while for gibberellic using 1000 ppm for 120 minutes Acid 60% germination was obtained, the time of 120 minutes and the concentration of 1000 ppm the best for both treatments and controls both treatments were no germination.

Key words: gibberellic acid; *Bixa orellana*; *in vitro* culture; seed germination; Kinetina; Murashige - Skoog, (1962).

INTRODUCCIÓN

Los principios activos de las plantas han cumplido roles importantes en la salud y el bienestar del ser humano. En las últimas décadas se ha revalorizado su estudio por el hallazgo de nuevos blancos farmacológicos (KoeHN & Carter, 2005). La mayoría de los metabolitos secundarios cumplen distintas funciones en la interacción de las plantas con el ambiente como: defensa química contra insectos patógenos, atracción de organismos para polinización, entre otras (Hartmann, 2007).

Bixa orellana (*Bixaceae*) comúnmente llamada achiote o achote, es un arbusto de hoja perenne o pequeño árbol originario de América tropical y se cultiva ampliamente en muchos otros países tropicales, incluyendo las partes del sur de la India (Srivastava et al., 1999). Es una planta multipropósito por su adaptabilidad a diferentes sistemas agroforestales, el enorme potencial reforestador de tierras pobres o ácidas y el notable crecimiento en diferentes pisos térmicos que le proporcionan variedades en el color de las cápsulas (negro, colorado y amarillo); (Mercadente & Pfander, 1998).

El uso inicial del achiote fue por etnias indígenas amazónicas y centroamericanas únicamente para pintarse y tatuarse partes de su cuerpo, pero con el pasar del tiempo descubrieron otros usos entre ellos teñir sus tejidos, pintar sus utensilios, protegerse de las picaduras de mosquitos y para facilitar la cicatrización de las heridas (Bernal & Correa, 1989). El colorante extraído de las semillas de *Bixa orellana*, ha sido utilizado cada vez con mayor frecuencia en todo el mundo, tanto en productos alimenticios como en la industria textil, la pintura y en industrias cosméticas, esto debido a la prohibición del uso de colorantes sintéticos en estas industrias, siendo el colorante del achiote uno de los pocos aceptados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), ya que no es tóxico y no presenta ningún cambio en el valor nutricional de los alimentos (Bastos et al., 1999). El 70% de todos los agentes colorantes naturales que se consumen en todo el mundo se derivan de achiote (Thomas et al., 2005).

La importancia de achiote se debe principalmente a la presencia en sus semillas de los pigmentos bixina y norbixina (Scotter, 1998). Según estudios la bixina actúa como protector contra los efectos clastogénicos de agentes antitumorales (Antunes et al., 2005). Por otros estudios se ha demostrado que la Norbixina (NBX) tiene propiedades antígenotóxicas en función de su protección de *Escherichia coli* contra inductores de daño en el DNA, la radiación

UV, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), aniones superóxido y también muestran propiedades antimutagénicas (Junior et al., 2005).

En condiciones naturales durante la germinación de esta especie se hincha el endospermo albuminoso y atrae una infección microbiana y fúngica provocando que las semillas no logren su germinación (Sharon et al., 2012). Los informes sobre la germinación de semillas de *Bixa* indican que posee una latencia fisiológica (Amaral et al., 1995; Amaral et al., 2000; Eira & Mello, 1997; Goldbach, 1979; Yogeeshya et al., 2005) y esta latencia es causado por la permeabilidad de la cubierta de la semilla al agua (Amaral et al., 1995), característica de la familia Bixaceae (Amaral et al., 2000; Nandi, 1998).

Siendo esta especie una planta alógama, surge el inconveniente de una amplia variabilidad en la descendencia y en consecuencia desuniformidad al tiempo de la cosecha, en los rendimientos y en la calidad del producto (Roca & Mroginski, 1991). Convirtiéndose así la técnica del cultivo *in vitro* una herramienta muy útil en una especie como *Bixa orellana*, permitiendo la obtención de plantas de sanidad controlada, gran cantidad de individuos en espacios reducidos, obtención de individuos uniformes y la independencia del clima, suelo y distribución geográfica (Roca & Mroginski, 1991; Pérez, 1998).

Por otra parte las semillas de muchas especies vegetales germinan enseguida cuando se las somete a unas condiciones de humedad y temperatura favorables, muchas otras especies poseen un determinado grado de latencia de la semilla (Justice, 1972). Cuando la latencia es fuerte, es necesario alguna forma de tratamiento previo de la semilla, a fin de obtener una tasa de germinación razonablemente alta en poco tiempo, así mismo existen semillas de algunas especies que pueden permanecer durmientes pero vivas durante muchos años y son capaces de germinar si se produce un hecho que interrumpa su latencia y se ha demostrado que en el mantenimiento o interrupción de la latencia interactúan hormonas promotoras del crecimiento, entre las cuales la giberelina es un ejemplo muy conocido (FAO, 1991).

Es por ello que este trabajo evaluará la influencia de reguladores de crecimiento kinetina (citoquininas) y ácido giberélico (giberelinas), para estimular la germinación de semillas de *Bixa orellana* bajo condiciones *in vitro* con el fin de contribuir con la producción de plantas de esta especie para el programa de "Distribución geográfica, biológica reproductiva, diversidad genética y química de especies vegetales de interés, medicinal, en la región sur del Ecuador" que busca aumentar el conocimiento sobre las especies en mención para intentar preservar la diversidad y contar con una fuente sustentable de especies productoras de los metabolitos de interés.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la influencia de los reguladores de crecimiento Kinetina y Ácido giberélico sobre la germinación de semillas de *Bixa orellana* en condiciones *in vitro*.

Objetivo específico

Determinar la influencia de la Kinetina y Ácido giberélico sobre la germinación de semillas de *Bixa orellana*.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 *Bixa orellana*

1.1.1 Etimología.

Bixa orellana fue descrita por Carlos Linneo (1753), posteriormente publicado en *Species Plantarum* (TRÓPICOS, 2011). El nombre común achiote es una castellanización del náhuatl achiotl, la etimología del nombre binomial corresponde a *bixa* que es una latinización del portugués *bixa* y *orellana* dedicado al nombre de Francisco de Orellana (1490-1546), el mismo que fue el primer europeo en navegar por el Amazonas (Silva et al., 2010).

1.1.1.1 Clasificación botánica.

Tabla 1. Clasificación botánica

Reino:	Plantae (vegetal)
Subreino:	Tracheobionta
División:	Embriofita
Subdivisión:	Diploidalia
Sección:	Espermatofita (fanerógamas)
Subsección:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledónea
Subclases:	Arquiclamidea
Orden:	Parietales
Familia:	Bixaceae
Género:	<i>Bixa</i>
Especie:	<i>orellana</i>

Fuente: FOLIA AMAZÓNICA VOL. Nº 4(1) – 1992. Agustín González Coral.

1.1.1.2 Descripción botánica.

Bixa orellana, arbusto americano conocido generalmente como “achiote” (Fonnegra & Jiménez, 1999). Puede alcanzar una altura de 3 a 5 metros, en ocasiones puede llegar a medir hasta 10 metros (Revilla, 2001).



Figura 1. Planta de *Bixa orellana* en estado de fructificación.

1.1.1.2.1 Tronco.

Es corto teniendo un diámetro de 20 a 30 cm, su corteza presenta un color gris oscuro con lenticelas en filas verticales (Revilla, 2001). La ramificación del tallo es dicotómica, iniciándose desde la base del tronco, presentando ramas por lo general delgadas, tendiendo a leñosas, al final de las ramitas jóvenes se producen los racimos con flores (Hernández et al., 1988).

1.1.1.2.2 Hojas.

Son simples, alternas, enteras, ovadas, pecioladas y glabras en ambas caras, con ápice acuminado, disminuyendo gradualmente y la base truncada es algo acorazonada, el color del envés es algo plateado, especialmente cuando están maduras, se tornan algo coriáceas (Saux, 1987).

1.1.1.2.3 Flores.

Dispuestas en panículas terminales en las ramitas jóvenes, el botón floral es globuloso y recubierto por sucesivas capas que son los sépalos, al abrirse es posible notar que la flor tiene 5 pétalos de un color blanco, rosado o lila y de forma redondeada u ovalada, dependiendo de la variedad. Los estambres son pequeños y numerosos, de pedúnculos cortos y dispuestos alrededor del pistilo. Al abrirse la antera, esta tiene 8 sacos embrionarios que producen abundante polen (Hernández et al, 1988). Dependiendo de la coloración de la flor las capsulas son verdes, rojizas o amarillas, por ello flores Blancas, cápsulas verdes y flores rosadas, capsulas rojizas (Bonilla, 2009). Son regulares, actinomorfas, de sexualidad hermafrodita (Saux, 1987).

1.1.1.2.4 Fruto.

Es una cápsula que presenta una forma ovoide, alargada o globosa (Fig. 1) que mide de 3 a 5 cm. de largo con una superficie cubierta de pelos, suaves a manera de espinas, pueden ser abundantes o ralos (Hernández et al, 1988). En lo que se refiere al color que tiene la cápsula estas difieren según la variedad, pueden ser verdes, rojas ocre y amarillas. El fruto contiene un número variable de semillas que puede ser entre 20 y 55, la cual parece estar ligada a la polinización entomófila o por insectos (Bonilla, 2009).

1.1.1.2.5 Semillas.

Las semillas miden 0,3-0,5 cm de longitud y 0,2-0,3 cm de diámetro, y su forma varía de piramidal a casi cónica (Oliveira et al., 1966). Están formadas por una membrana porosa debajo de la cual empiezan a formarse los colorantes bixina y orellina (materia colorante amarilla), los cuales al ser exudados a través de esa membrana forma una capa cerosa que contienen los colorantes rojos o amarillos cuando la semilla ya ha madurado y está seca (Bonilla, 2009).

1.1.1.2.6 Raíz.

La raíz del achiote es pivotante y bien desarrollada, por lo cual puede penetrar a profundidad si el suelo es pobre o si no es apropiado, son además leñosas, cilíndricas y ramificadas (Ramos, 1991).

1.1.2 Pigmentos carotenoides.

1.1.2.1 Bixina.

Se presenta de un color rojo oscuro. Químicamente es un ácido carotenóico con su fórmula empírica $C_{25}H_{30}O_4$, el mismo que se presenta como un isómero geométrico del tipo cis, el cual puede convertirse a su forma trans, más estable (Jaramillo & Muñoz, 1992).

1.1.2.2 Norbixina.

Es un ácido di carboxílico con su fórmula empírica $C_{24}H_{28}O_4$, químicamente es conocida como diapo 6-6 caroteno-diólico, que es obtenida de la saponificación del éster metílico de la bixina, convirtiéndose hidrosoluble a valores de pH alcalinos (Reith, 1971).

1.1.3 Usos médicos.

Varias investigaciones han demostrado que los carotenoides (Provitamina A) han sido acreditados con otros efectos que promueven la salud, tales como inmuno-mejora y reducción del riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas crónicas tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares (ECV), cataratas; y degeneración, siendo ampliamente atribuida a su actividad atioxidante (Krinsky & Johnson, 2005; Olson, 1999; Rao & Rao, 2007; Riccioni, 2009; Tapiero et al, 2004; Voutilainen et al, 2006).

Otros mecanismos se han notificado cada vez más para carotenoides tales como la señalización retinoid-dependiente, modulación del metabolismo carcinógeno, regulación del crecimiento celular, la inhibición de la proliferación celular, la mejora de la diferenciación celular, inducción de enzimas desintoxicantes, hormonal e inmune modulación del sistema y el filtrado de la luz azul (Rodríguez, 2015).

1.1.4 Distribución geográfica.

B. orellana es una planta nativa de Brasil, pero también se desarrolla en otras regiones de América del Sur y Central (Alonso, 2004). Se cultiva en países tropicales como Perú, México,

aséptico de plantas enteras de tales estructuras definidas como primordios de la hoja, flores inmaduras, frutos y su crecimiento *in vitro* (George, et al, 2008).

El cultivo *in vitro* permite realizar estudios sobre fisiología y bioquímica general, introducción de características nuevas en plantas mediante ingeniería genética, mejora genética mediante la inducción de mutaciones, conservación de germoplasma, selección *in vitro* o la hibridación somática, producción de metabolitos secundarios y propagación masiva de plantas libres de patógenos (Roca & Mroginski, 1991).

1.1.5.2 Condiciones ambientales del cultivo *in vitro*.

Los cultivos de tejidos vegetales deben mantenerse en condiciones ambientales semejantes a las naturales. La luz, la temperatura y la humedad relativa son los principales factores del ambiente que inciden sobre los cultivos (Vidalie, 1986).

1.1.5.2.1 Luz.

Las semillas presentan sensibilidad a la luz la misma que varía dependiendo de la especie, esta respuesta que tienen las semillas a la luz se encuentra ligada a una cromoproteína denominada fitocromo, que es el pigmento responsable de atraparla (Rodríguez & Nieto, 1999).

El comportamiento de muchos cultivos depende de la calidad, intensidad y fotoperíodo de la luz que reciben, dado que varias enzimas involucradas en el desarrollo y en el metabolismo secundario son influenciadas por la luz. La mayoría de los cultivos desarrollan a una intensidad luminosa entre 5 a 25 W/m² (1000 a 5000 lux). Si bien la calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfogénicas, en general se utiliza luz blanca, pobre en longitudes de onda larga. El fotoperíodo habitualmente utilizado es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, aunque algunos cultivos requieren oscuridad (Marín, 1993).

1.1.5.2.2 Temperatura.

La temperatura de las cámaras de cultivo se regula en general entre 22 y 28°C, permitiendo así el desarrollo tanto de especies de climas templados como de plantas tropicales. Es de destacar que durante el período iluminado, la temperatura en el interior de los frascos de cultivo es 1-2°C superior a la de la cámara, debido al efecto invernadero; se crea así un termoperíodo suave

(Marín, 1993). De esta manera temperaturas bajas como 6°C pueden ocasionar que la tasa de crecimiento se vea reducida significativamente, mientras que altas temperaturas como 30°C pueden inhibir la multiplicación de brotes (Hartmann *et al.*, 1997).

1.1.5.2.3 Humedad relativa.

Se mantiene en alrededor del 70 % en las condiciones en las que se realizan habitualmente los cultivos, aunque varía con la temperatura de la cámara y el tipo y cierre de los recipientes (George, 1987).

1.1.6 Problemas asociados al cultivo *in vitro*.

1.1.6.1 Contaminación.

La presencia de microorganismos en los cultivos *in vitro* afecta el éxito de los resultados, estos se desarrollan debido a las condiciones físicas del cultivo que resulta un ambiente propicio para que es su desarrollo (Debergh & Zimmerman, 1991). Dicha contaminación es producida generalmente por bacterias y hongos, dependiendo en su mayoría de la manipulación al momento de la siembra (Roca & Mroginski, 1991).

1.1.6.2 Oxidación.

Durante el cultivo *in vitro* el explante se ve sometido siempre en mayor o menor medida a situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo *in vitro* como la composición del medio, todas estas situaciones promueven la estimulación del metabolismo de los componentes fenólicos, estos a su vez producen una serie de reacciones de hipersensibilidad, como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas, llevando finalmente a una muerte prematura (Debergh & Read, 1991).

1.1.7 Medio de cultivo.

Consiste en una solución de sales que suministran los elementos mayores y menores necesarios para el crecimiento de plantas. Está compuesto por cantidades relativamente

grandes de macronutrientes (nitrógeno, potasio, calcio. Fosforo, magnesio y azufre), pequeñas cantidades de micronutrientes (hierro, níquel, cloro, manganeso, zinc, boro, cobre, y molibdeno), pequeñas cantidades de ciertos compuestos orgánicos, especialmente las vitaminas y los reguladores del crecimiento vegetal, una fuente de energía generalmente sacarosa y un agente solidificante el más usado el agar utilizado cuando se requiere un medio semi-sólido. El pH del medio se altera durante el cultivo, pero como regla general, el pH inicial se establece en el 5,5 - 6,0. El medio más comúnmente utilizado es la formulación de Murashige y Skoog (1962). Cada especie de planta tiene su propia composición elemental característica que se puede utilizar para adaptar la formulación del medio (George, et al, 2008).

1.1.8 Germinación.

Algunas semillas presentan dormancia externa e interna, por ello según estudios se recomienda utilizar tratamientos pre-germinativos para romper la dormancia, uno de ellos es el ácido giberélico siendo un factor muy importante para lograr la germinación de las semillas y para su posterior desarrollo, principalmente cuando se trabaja en cultivos *in vitro* (Azcón & Talón, 2000).

1.1.9 Latencia en semillas.

Las semillas latentes son aquellas que no tienen la capacidad de germinar en un momento determinado bajo condiciones de factores ambientales como la temperatura, luz, humedad, entre otras, las mismas condiciones que en otros casos resultan favorables para su debida germinación (Baskin & Baskin, 2004).

1.1.10 Reguladores de crecimiento

1.1.10.1 Generalidades.

El desarrollo de las plantas está influenciado por la interacción de factores externos e internos, dentro de los factores internos se encuentran incluidas las hormonas o también llamadas fitohormonas, las mismas que son definidas como señales químicas que facilitan la comunicación entre las células y coordinan sus actividades (Azcon & Talón, 2000). Su efecto es

mediado por su presencia o por su ausencia, siendo muy importante su concentración para un normal crecimiento vegetativo (Castillo & Davies, 1999).

1.1.10.1.1 Citoquininas.

Producen diversos efectos cuando se aplica a plantas intactas. En particular, estimulan la síntesis de proteínas y participa en el control del ciclo celular. Promueven la maduración de los cloroplastos, retrasan la senescencia de las hojas, superan la dominancia apical y liberan yemas laterales de inactividad (George, et al, 2008). Las semillas también están relacionadas con la síntesis de las citoquininas a lo largo de todo su desarrollo, desde su formación en el fruto hasta la germinación (Pérez & Martínez, 1994), promoviendo durante la germinación la elongación de las células de los cotiledones en respuesta a la luz (Mok & Mok, 2001).

1.1.10.1.2 Giberelinas.

Son el grupo más numeroso de reguladores de crecimiento, se conocen más de 100 miembros, este grupo está involucrado en una amplia gama de respuestas de desarrollo, estos incluyen la promoción de la elongación de los tallos y hojas, debido en parte a la activación del meristema intercalar (George, et al, 2008). Así mismo las giberelinas intervienen en la regulación de la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray & Estelle, 1998).

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lineamientos del diseño experimental

Para inducir a mayores porcentajes en germinación de semillas de *B. orellana* se evaluó la influencia de la Kinetina y Ácido giberélico en cultivo *in vitro*.

Se utilizaron las siguientes variables:

Dependientes: porcentaje de semillas germinadas.

Independientes: tiempo de exposición a la Kinetina y Ácido giberélico.

Tabla 2. Diseño experimental

Regulador de crecimiento	Concentración (ppm)	Tiempo (minutos)
GA ₃	100	60
	1000	90
	2000	120
	3000	
KIN	100	60
	1000	90
	2000	120
	3000	
Control		

Se hicieron 5 repeticiones por cada tratamiento en los tres tiempos y en las concentraciones establecidas y sus respectivos testigos, colocando 5 semillas por frasco.

Para cumplir con nuestro objetivo el diseño experimental se realizó en las siguientes fases guiadas por la metodología de George et al, (2008) y Schmidt (2000):

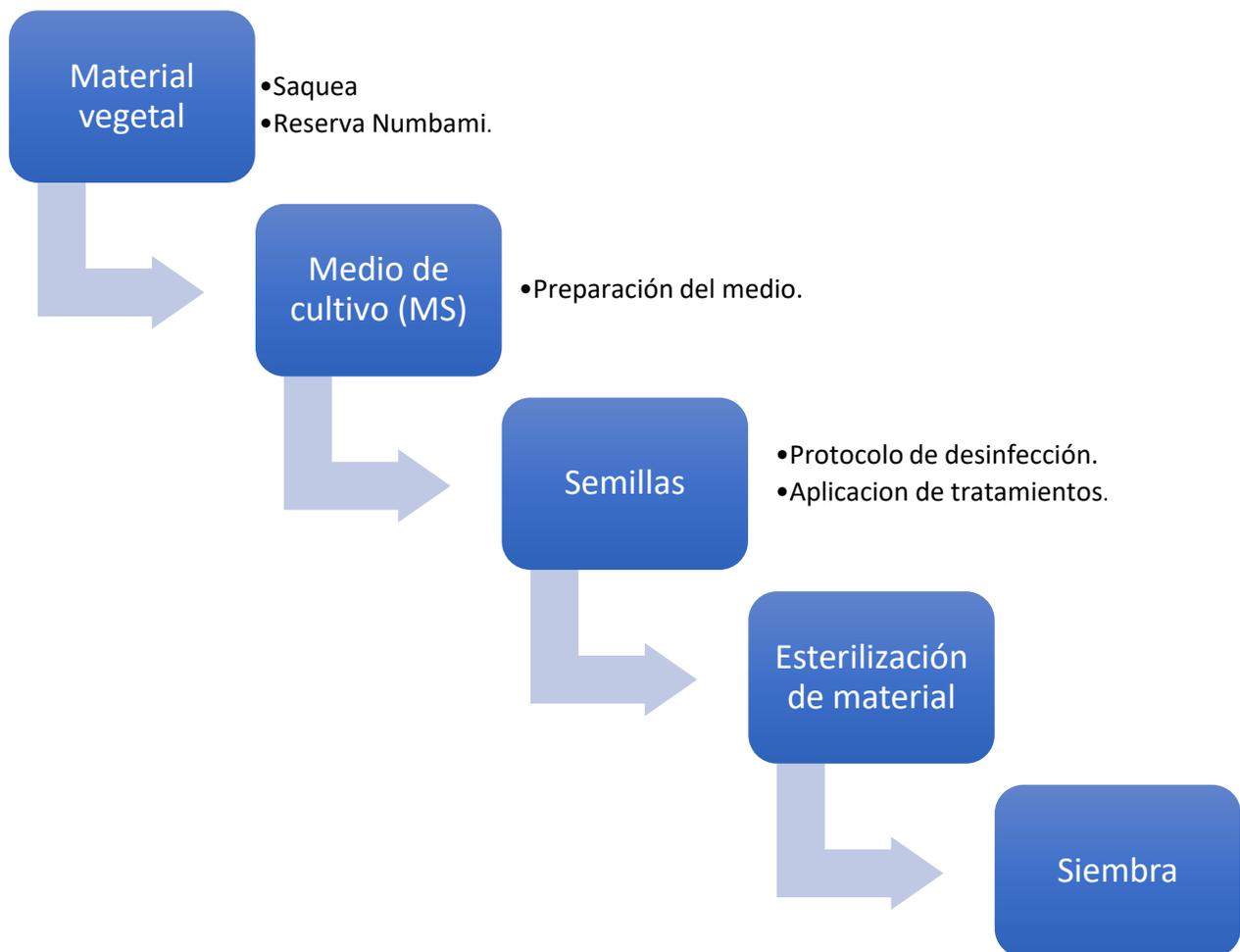


Figura 3. Fases de la investigación.

2.2 Material Vegetal

El material vegetal está conformado por semillas colectadas de frutos maduros próximos a la dehiscencia en dos sitios de la provincia de Zamora Chinchipe:

La Saquea

Provincia: Zamora Chinchipe

Cantón: Zamora

Parroquia: Guadalupe.

Coordenadas:

3°54'38" S

78°51'24" O

Reserva de Numbami

Naturaleza y Cultura Internacional

Provincia: Zamora Chinchipe

Cantón: Zamora

Coordenadas

4°8'4" S

78°56'33" O

2.3 Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionando sacarosa, Agar (Difco™), Kinetina 6-furfurilaminopurina (SIGMA), ácido 2,4- diclorofenoxiacético (SIGMA).

2.3.1 Preparación medio de cultivo.

Se preparó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), con 7 g/l de agar, 20 g/l sacarosa, 0,005 g/l Kinetina y 0,001 g/l de ácido 2,4- diclorofenoxiacético, el pH se ajustó a 5.8 ± 0.02 se procedió a esterilizar en autoclave por un tiempo aproximado de dos horas, una vez pasado el proceso de esterilización del medio lo colocamos dentro del cuarto de cultivo.

2.4 Semillas

Una vez obtenidos los frutos en el laboratorio se procedió a extraer las semillas de las capsulas maduras, para luego ser colocadas en tubos falcón con sílica gel para quitar la humedad de las semillas (Figura 4).



Figura 4. Reducción de humedad de semillas.

2.4.1 Protocolo de Desinfección.

El protocolo empleado para la desinfección e introducción *in vitro* de semillas de *Bixa orellana* fue el siguiente: se colocó las semillas en un tubo falcon (50ml); posteriormente, fueron sumergidas en alcohol al 70% agitando por un minuto, en hipoclorito de sodio comercial (5%) diluido al 20% con una gota de jabón líquido agitando por 5 minutos y en agua oxigenada al 10% por 5 min, siendo lavadas con agua destilada estéril después de cada proceso.

2.4.2 Aplicación de Tratamientos.

Luego de la desinfección de las semillas se procede a colocar el tratamiento con reguladores de crecimiento (Tabla2). Una vez transcurrido este tiempo retiramos el tratamiento y colocamos 2g

de Benomil 50 (fungicida) preparado en 100ml de agua destilada, el Benomil se retira antes de la siembra.

En el caso de las semillas de los testigos luego de la desinfección solo se aplica el Benomil 50 y se procede a sembrar.

2.5 Esterilización de materiales

Se utilizó el equipo de autoclave (RAYPA) para esterilizar todos los materiales necesarios para la siembra y desinfección de semillas. Los materiales que son esterilizados en autoclave son las pinzas, cajas Petri y botellas con agua destilada, todos estos materiales son envueltos con papel aluminio, una vez terminado el tiempo de esterilización se los guarda en el cuarto de siembra para su posterior uso.

2.6 Siembra.

En las cámaras de flujo laminar previo a la siembra colocamos todos los materiales que vamos a utilizar, mandil de laboratorio, mascarilla, guantes, gorro, pinzas, caja petri, alcohol, cinta, papel, frascos del medio y tubos falcon con las semillas, con las medidas de asepsia respectivas (alcohol al 70% y UV por unos 30 min). Se procedió a sembrar 5 semillas por frasco, debidamente sellados y etiquetados para luego ser colocados en el cuarto de crecimiento con una temperatura de 22 °C, y un fotoperiodo de 12 horas para esperar su germinación.

El total de las semillas sembradas por tratamiento al igual que el control fue de 1125 semillas, colocando 5 semillas por frasco; en 225 frascos.

2.7 Análisis estadístico.

En el programa Microsoft Excel 2010 se organizaron los datos obtenidos en cada una de las manipulaciones, luego se empleó 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

CAPITULO III
RESULTADOS

3.1 Germinación *in vitro*

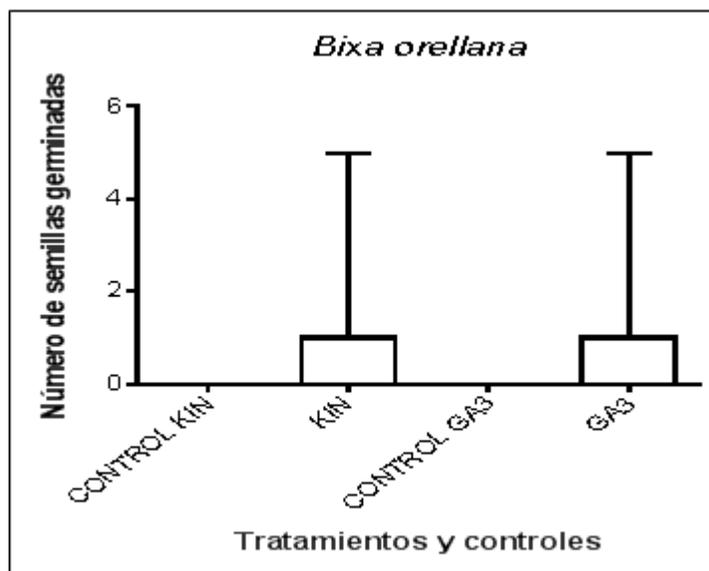


Figura 5. Número de semillas de *Bixa orellana* germinadas por frasco a los 28 días.

El análisis de varianzas de los tratamientos KIN, GA3 y controles no presentaron una diferencia significativa ($P < 0.05$), de acuerdo a la prueba de TUKEY. En lo relacionado a los tratamientos y controles tenemos que los controles tanto de KIN como de GA3 frente a los tratamientos tienen un nivel de significancia, tomando en cuenta que los controles no tenían ninguna concentración de reguladores de crecimiento, con esta especie en este proceso vemos que los controles se separan completamente de los tratamientos tanto de KIN y GA3 por tanto son los tratamientos que muestran frente a los controles una influencia que induce a la germinación de las semillas. El control de KIN frente al control de GA3 no presenta nivel de significancia al igual que el tratamiento de KIN frente al tratamiento de GA3.

3.2 Tratamientos en diferentes periodos de exposición y concentraciones

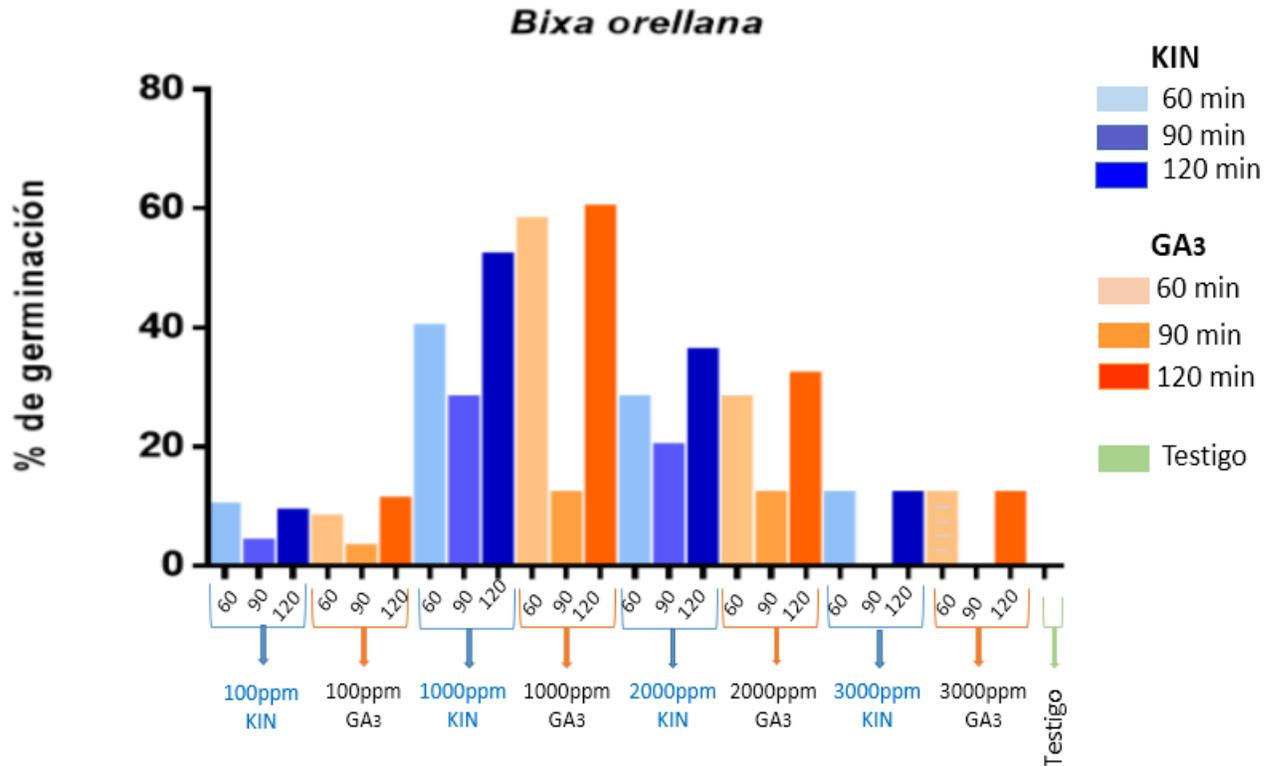


Figura 6. Porcentajes de germinación por tiempos de exposición y concentraciones.

En la Figura 6. Se observa que para el tratamiento con KIN se obtuvo un mayor porcentaje de germinación (52%) en el tiempo de 120 min en una concentración de 1000 ppm, así mismo para el tratamiento de GA3 el tiempo de 120 min obtuvo mayor germinación (60%) en una concentración de 1000 ppm, la germinación disminuyó a medida que se aumentaron las concentraciones a 2000 y 3000ppm. Mientras que en los controles de ambos tratamientos se obtuvo un 0% de germinación.

CAPITULO IV
DISCUSIÓN

4.1 Semillas *in vitro*

Varela & Arana (2011) indican que los tratamientos pre-germinativos son de gran relevancia para mejorar el proceso de germinación en las semillas que presentan algún tipo de latencia, en este trabajo se ha recurrido a usar los reguladores de crecimiento Kinetina y ácido giberélico, para estimular la germinación y romper la latencia fisiológica de semillas de *Bixa orellana*. Sin embargo autores como Copeland & McDonald (2004), reportan que estos reguladores de crecimiento tienen un efecto nulo, así como positivo mencionado por Ramakrishna & Ramakrishna (2006), sobre la inducción de la germinación y el rompimiento de la latencia de semillas.

Con relación al efecto positivo de las giberelinas, Gashi et al., (2012) indican que están directamente implicadas en el control y promoción de la germinación. Al respecto, Finch & Leubner, (2006) informaron que el ácido giberélico estimula la germinación por la vía de síntesis de amilasas; siendo esta enzima importante para el paso de los productos almacenados en el cotiledón y así iniciar el crecimiento de las plántulas, debido a que se promueve la división celular en la semilla haciendo que se rompa la latencia, desencadenando las actividades metabólicas previas a la germinación de los embriones (Gutiérrez et al., 2011). Como tal en este trabajo se demostró que el GA₃ es un tratamiento eficaz para disminuir la latencia fisiológica de las semillas de *Bixa orellana*, utilizando concentraciones de 1000ppm de GA₃ con el cual se produjo significativamente la germinación más alta (60%) con un tiempo de exposición de 120 min, sin embargo los porcentajes de germinación se consideran bajos al compararlos con los obtenidos por Joseph et al., (2010) en donde obtuvieron un máximo de germinación en semillas de *Bixa orellana* (93%) utilizando concentraciones más bajas de GA₃ en este caso de 50 ppm en un tiempo de exposición de 24 horas.

Las citoquininas se han conocido para estimular la germinación, e incluso romper la latencia en algunas plantas (Sharon & Kishore, 1975). Investigaciones realizadas por Sharon et al., (2012) utilizaron concentraciones de 500 ppm de Kinetina comprobando la efectividad de esta fitohormona en donde las semillas de *Bixa orellana* alcanzaron su máximo de germinación al 90% en un tiempo mínimo de 8 días y utilizando también concentraciones de 1000ppm de KIN obteniendo un 30% de germinación guardando relación con los resultados obtenidos en este estudio con concentraciones de 1000ppm con una germinación del 52% en un tiempo de exposición de 120 min con esta especie.

La exposición de las semillas de esta especie durante 90 min a una concentración de 100ppm tanto de KIN y GA₃ disminuyó el porcentaje de germinación (4% y 3%) y en concentraciones de

3000ppm a un 0%, lo que indica que estos tratamientos a esas concentraciones y tiempo no son los adecuados para lograr la germinación de semillas de *Bixa orellana*.

Las semillas de *Bixa orellana* presentan características de semillas recalcitrantes, según Cabrera & Ordoñez (2004) estas no pueden ser almacenadas y tienen escasa longevidad a diferencia de las ortodoxas, estas semillas son liberadas de la planta madre con un alto contenido de humedad (entre el 40 y 60% de agua sobre su peso). Así mismo, su latencia es de una naturaleza más efímera y menos profunda, en el caso de *Bixa orellana* posee una latencia fisiológica (Amaral et al., 1995; Amaral et al., 2000; Eira & Mello, 1997; Goldbach, 1979; Yogeeshha et al., 2005), causada por la permeabilidad de la cubierta de la semilla al agua (Amaral et al., 1995).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación la Kinetina y el Ácido giberélico influyen sobre la germinación de las semillas de *Bixa orellana* en condiciones *in vitro*.

En las concentraciones de 1000 ppm de ambos reguladores el porcentaje de germinación fue superior a los demás. La germinación disminuyó a medida que se aumentaron las concentraciones a 2000 y 3000 ppm, demostrando que estos tratamientos a esas concentraciones y tiempo no son los adecuados para influir positivamente en la germinación de las semillas de esta especie.

El cultivo *in vitro* brinda una excelente oportunidad para el desarrollo de investigaciones de plantas de interés medicinal bajo condiciones controladas.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda mantener todas las condiciones de asepsia durante la siembra en la cámara de flujo laminar para evitar fuentes de contaminación externa que alteren los resultados de la investigación.
- Obtener las semillas directamente del árbol pues si la semilla pierde humedad tras su salida de la cápsula, esta disminuye progresivamente la capacidad de germinar debido a que posiblemente sean semillas recalcitrantes.
- Evaluar nuevas concentraciones y tiempos de exposición de los reguladores de crecimientos para incrementar el porcentaje de germinación de las semillas de esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J. (2004). *Tratado de fitofármacos y nutraceuticos*. 1. ed. Rosário: Corpus, 1144p.
- Amaral, L., Pereira, F., & Cortelazzo, A. (1995). Dormancy breaking in seeds of *Bixa orellana*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 7(2): 151-157
- Amaral, L., Pereira, M., & Cortelazzo, A. (2000). Germination in developing sedes of *Bixa orellana*. *Revista Brasileira de fisiologia vegetal*. 12: 273-285.
- Antunes, L., Pascoal, L., Bianchi, L., Días, F. (2005). Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of thecarotenoid bixin in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 585, 113–119.
- Azcón, J., & Talón, M. (2000). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Ediciones Mc GrawHill, Interamericana. Barcelona, España.
- Baskin, J., & Baskin, C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14:1-6.
- Bastos, A., Carvalho, J., Assis, R., & Filho A. (1999). Marcha de absorção de nutrientes em urucum (*Bixa orellana* L.) tipo cultivado piave vermelha em fase de viveiro. *Cerne*; 5:76–85.
- Bernal, H., & Correa, J. (1989). *Especies vegetales promisorias de los países pertenecientes al convenio Andrés Bello*. Tomo 2.
- Bonilla, J. (2009). *Manual de cultivo de achiote*. Proyecto de Desarrollo de la Cadena de Valor y Conglomerado Agrícola.
- Cabrera, M., & Ordoñez, O. (2004). *Fenología, Almacenamiento de Semillas y Propagación a Nivel de Vivero de Diez Especies Forestales Nativas del Sur de la Corporación de desarrollo forestal y maderero del Ecuador/OIMT*.
- Castillo, R., & Davies, A. (1999). *Introducción completa a la fisiología vegetal*. Cuarta edición. Greenwood.
- Copeland, L., & McDonald, M. (2004). *Principles of seed science and technology*. 4th edition. Kluwer Academic Publishers. 467 p.
- Debergh, P., & Read, P. (1991). *Micropropagation Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers. U.S.A. 479 p.
- Debergh, P., & Zimmerman, R. (1991). *Micropropagation Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers. U.S.A. 479 p.

- Eira, M., & Mello, C. (1997). *Bixa orellana* L. seed germination and conservation. *Seed Sci. Technol.* 25:373-380.
- Elias, M., Schroth, G., Macêdo, J., Mota, M., & D'Angelo, S. (2002). Mineral nutrition, growth and yields of annatto trees (*Bixa orellana*) in agroforestry on an Amazonian Ferralsol. *Experimental Agriculture*; 38(3):277–289.
- FAO. (1991). Guía para la manipulación de semillas forestales. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/AD232S/AD232S00.HTM>
- Finch, W., & Leubner, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501-523.
- Fonnegra, R., & Jiménez, S. (1999). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia, serie Yuluka, 1o ed pp 15-17.
- Gashi, B., Kasamedin, A., Mata, V., & Kongjika, E. (2012). Effect of gibberellic acid and potassium nitrate on seed germination of the resurrection plants *Ramonda serbica* and *Ramondana thaliae*. *African Journal of Biotechnology* 11(20):4537-4542.
- George, E. (1987). Factors affecting growth and morphogenesis. I. Genotype and the physical environment. In: *Plant Propagation by Tissue Culture. Part I: The Technology* (George, E., ed.), pp.: 183-230. 2nd Ed. Exegetics. Edington. UK.
- George, E., Hall, M., Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3ra Ed. Springer, The Netherlands. 501 p.
- Goldbach, H. (1979). Germination and storage of *Bixa orellana* sedes. *Seed Sci. Technol.* 7: 399-402.
- González, A. (1992). *Folia amazónica* Vol. N° 4(1).
- Gray, W., & Estelle, M. (1998). Biochemical genetics of plant growth. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 196-201.
- Gutiérrez, M., Miranda, D., & Cárdenas, J. (2011). Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 5(2):209-219.
- Hartmann, H., Kester, D., Davies F., & Geneve, F. (1997). *Plant propagation principles and practices*. 6ª ed. Prentice Hall Inc. New Jersey, U.S.A. 747 p.
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831-2846
- Hernández, T., Trujillo, L., Arevalo, G., Hernandez, T. (1988). Sistemas de producción de Achiote en la Amazonia Peruana. CORDEHUANUCO, Tingo María. Perú. *Industria alimentaria* N°3".1987. 7 – 8 p.

- Jaramillo, M., & Muñoz, M. (1992). Extracción de colorante de Achiote. Trabajo de Grado (Ingeniero Químico). Medellín: Universidad Nacional. Facultad Nacional de Minas. Departamento de Procesos Químicos.
- Joseph, N., Siril, E., & Nair, G. (2010). Duración imbibición, tratamiento de semillas, Semillas de masas y Población Influencia La germinación de achiote (*Bixa orellana* L.). *Tecnología de Semillas*, 32 (1), 37-45.
- Junior, A., Asad, L., Oliveira, E., Kovary, K., Nasser, R., Asad, N., & Felzenszwalb, I. (2005). Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Gen. Mol. Res.* 4, 94–99.
- Justice, O. (1972). Essentials of seed testing. *En Seed Biology* Vol. 3 (Ed. T.T. Kozlowski). Academic Press, Nueva York y Londres, 301–370.
- Koehn, F., & Carter, G. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 206-220.
- Krinsky, N., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459–516.
- Marín, J. (1993). Micropropagación de especies frutales. *HortoFrutic.* 1: 56-62.
- Mercadante, A., Pfander, H. (1998). Carotenoids from annato: areview. *Recent Research Developments in Agriculture and Food Chemistry*, 2 (1): 79-91 (2).
- Mok, D., & Mok, M. (2001). «Cytokinin Metabolism and Action». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52. ISSN, pp. 89- 118.
- Nandi, O. (1998). Ovule and seed anatomy of Cistaceae and related Malvaneae. *Plant System. Evol.* 209: 239-264.
- Oliveira, F., Akisue, G., & Akisue, M. (1996). *Farmacognosia*. São Paulo, Brazil: Atheneu.
- Olson, J. (1999). Carotenoids and human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49, 7S–11S.
- Pérez, M., & Martínez, F. (1994). Cultivo de tejidos vegetales aplicado a la producción agrícola. *Revista Iberoamericana. Vol. I*, 49.
- Pérez, P. (1998). Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Ed. Santa Clara. Instituto de Biotecnología de las plantas. Cuba.
- Ramakrishna, V., & Ramakrishna, P. (2006). Effect of in vivo administered plant growth hormones on the development of amylase and protease during germination of indian bean (*Dolichos lablab* L. var. *lignosus*). *Acta Physiol. Plant.* 28, 245-260.
- Ramos, S. (1991). El cultivo del achiote en Venezuela En: Fonaiap divulga, No 3 Maracay. Venezuela. p 15-17.

- Rao, A., & Rao, L. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 207–216.
- Reith, J. (1971). "Properties of bixin and norbixin and the composition of Annatto Extracts". *Journal of Food Science*. Vol. 36, Num 97. Estados Unidos..
- Revilla, J. (2001). *Plantas da Amazônia: Oportunidades Economicas e Sustentáveis*. 2nd edition. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico.
- Riccioni, G. (2009). Carotenoids and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 11, 434–439
- Roca, M., & Mroginski, L. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internaciol de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. p. 542-575.
- Rodriguez, A. (2015). Carotenes and xanthophylls. En F. Shahidi, *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (págs. 17-50). Woodhead Publishing.
- Rodriguez, J., & Nieto, V. (1999). Investigación en semillas forestales nativas. CONIF. Serie Técnica/N|43. Bogotá, 89 pp.
- Saux, A. (1987). El pigmento del Achiote *Bixa orellana* L. Centro de Desarrollo para la Industria alimentaria N°3". 1987. 7 – 8 p.
- Schmidt, L. (2000). Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. Danida Forest Seed Centre.
- Scotter, M. (1998). Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by highperformance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 46, p.1031-1038, 1998.
- Sharon, M., & Kishore, H. (1975). *Indian Journal Of Agricultural Sciences*, 45, 490.
- Sharon, M., Claire, M., & Sharan, M. (2012). *In Vitro* Culture studies of *Bixa orellana* L: IV-In Vitro and In Vivo Trials for Breaking the Dormancy of Seeds of *Bixa Orellana*. *European Journal of Experimental Biology*, 2012, 2 (1):174-179
- Silva, S., Amaral, C., Rebouças, T. (2010). Adoption of conservation practices on farm and selection of varieties by producers of annatto in the city of Vitoria da Conquista-BA. *Revista Brasileira de Agroecologia*; 5:106–113.
- Srivastava, A., Shukla, Y., Jain, S., & Kumar, S., (1999). Chemistry, pharmacology and uses of *Bixa orellana*—a review. *J. Med. Aro. Pl. Sci.* 21, 1145–1154.
- Tapiero, H., Townsend, D., & Tew, K. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 58, 100–110.

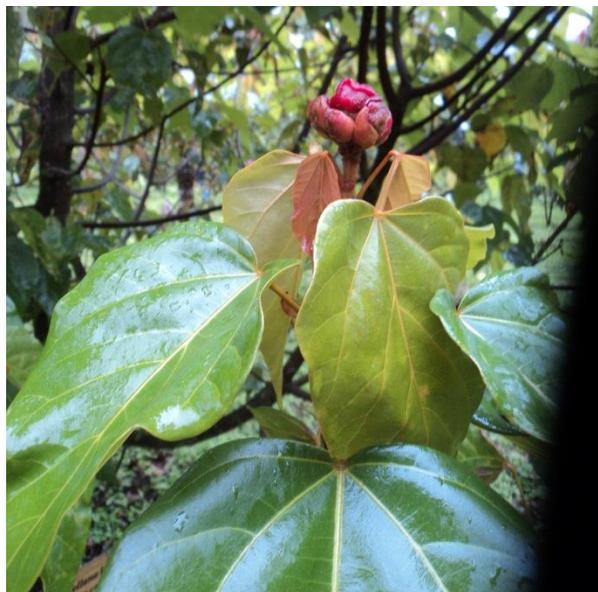
- Thomas, E., Colvin, M., Rosen, S., Zuccarini, C., Petzer, S., & Buffalo, N. (2005). USA: Medical.
- Trópicos. (2011). Missouri Botanical Garden. 14 January 2016. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/3800005> .
- Vidalie, H. (1986). *Cultivo in vitro*. Editorial Científica, S.A. de C.V. México.
- Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J., & Rissanen, T. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1265–1271.
- Yogeesha, H., Shivananda, T., & Bhanuprakash, K. (2005). Effect of seed maturity, seed moisture and various pre- treatments on seed germination of onatto (*Bixa orellana* L.). *Seed Sci. Technol.* 33: 97-104.

ANEXOS

Anexo 1: Análisis estadístico de germinación de semillas de Bixa orellana en cultivo *in vitro*

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	One-way ANOVA data				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	4				
8	F	48.78				
9	R square	0.1404				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)	3.400e+038				
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	70.06	3	23.35		
19	Residual (within columns)	428.9	896	0.4787		
20	Total	499.0	899			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
23	CONTROL KIN vs KIN	-0.5689	12.33	Yes	***	-0.7382 to -0.3996
24	CONTROL KIN vs CONTROL GA3	0.0	0.0	No	ns	-0.1693 to 0.1693
25	CONTROL KIN vs GA3	-0.5467	11.85	Yes	***	-0.7160 to -0.3773
26	KIN vs CONTROL GA3	0.5689	12.33	Yes	***	0.3996 to 0.7382
27	KIN vs GA3	0.02222	0.4818	No	ns	-0.1471 to 0.1916
28	CONTROL GA3 vs GA3	-0.5467	11.85	Yes	***	-0.7160 to -0.3773

Anexo 2: Inflorescencia de Bixa orellana.



Anexos 3: Planta de *Bixa orellana* en estado de fructificación.



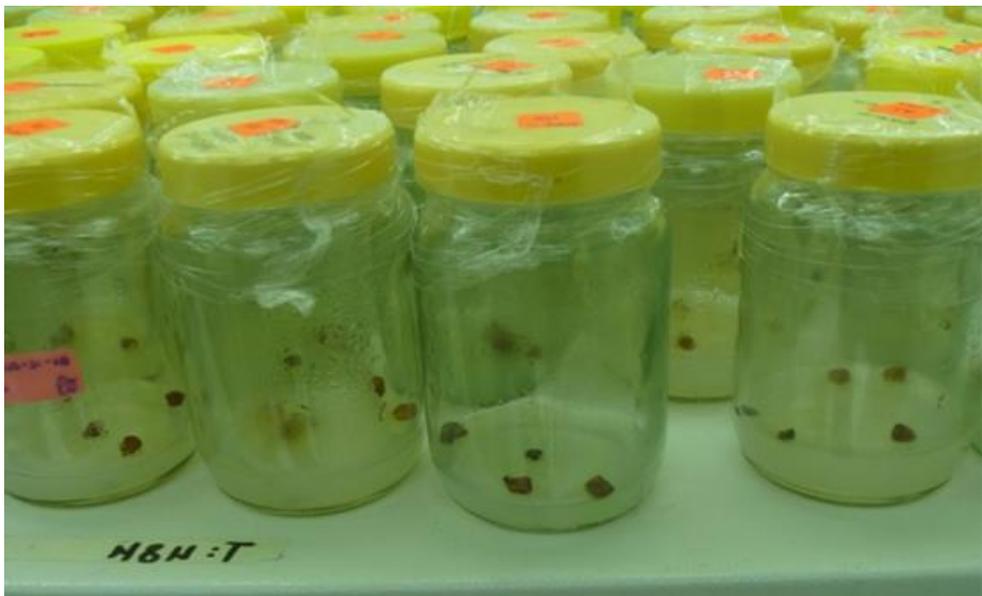
Anexo 4: Semillas de *Bixa orellana*



Anexo 5: Medio de cultivo (Murashige y Skoog, 1962).



Anexo 6: Siembra de semillas en medio MS (1962).



Anexo 7: Geminación de *Bixa orellana*.

