UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO EN GESTIÓN AMBIENTAL

Evaluación de tratamientos químicos para acortar el tiempo de germinación de semillas de *Gynoxys verrucosa* mediante cultivos *in vitro*

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR:
Sarango Salazar Katherine Ivonne

DIRECTOR:

Lucero Mosquera Hernán Patricio, Ing.

LOJA-ECUADOR

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 “Evaluación de tratamientos químicos para acortar el tiempo de germinación de semillas de *Gynoxys verrucosa* mediante cultivos *in vitro*” realizado por Katherine Ivonne Sarango Salazar, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Agosto, 2016

F)……
Lucero Mosquera Hernán Patricio
DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Katherine Ivonne Sarango Salazar declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Evaluación de tratamientos químicos para acortar el tiempo de germinación de semillas de *Gynoxys verrucosa* mediante cultivos *in vitro***,** de la Titulación Ingeniería en Gestión Ambiental, siendo 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 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 o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

f….....

Autora: Katherine Ivonne Sarango Salazar

Cédula: 1105578221

DEDICATORIA

Mi trabajo lo dedico a mi **Dios** porque gracias a él logre la culminación y realización de una de mis metas.

A una de las personas más importantes en mi vida **mi papá** *Tadeo Sarango Castillo* por su amor, comprensión, paciencia y apoyo, por estar a mi lado cada día, este logro es tuyo.

A **mi mama** y **mi hermana** por sus consejos y amor que me brindaron a lo largo de mi carrera.

A mi **sobrino** *Erick David* por ser mi razón de no desfallecer por su amor sincero y alegría eterna.

A **mis abuelitos** por cada palabra de aliento, por su ayuda incondicional para culminar esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Culminado mi trabajo agradezco a mi **Dios** a **mis padres** y a **mi hermana** son la razón de mi vida.

A mi tutor de tesis, Ingeniero Hernán Lucero Mosquera por sus enseñanzas, consejos y palabras de aliento para terminar este trabajo.

A mis maestros por sus enseñanzas durante los cinco años de mi formación profesional.

A mis amigas (Talia, Yesenia, Pamela, Gabriela) por compartir la realización de este trabajo, por su tiempo y cariño.

Con amor Katherine

ÍNDICE DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN……ii
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS..... iii
DEDICATORIA..... iv
AGRADECIMIENTO..... v
RESÚMEN..... 1
ABSTRACT..... 2
INTRODUCCIÓN..... 3
OBJETIVOS..... 5
- Objetivo General: 5
- Objetivo Específico:..... 5

CAPITULO I 6
MARCO TEÓRICO..... 6
1.1 Características del género:..... 7
1.2 Taxonomía: 7
1.3 Distribución de *Gynoxys verrucosa:* 7
1.4 Usos Tradicionales:..... 8
1.5 Metabolitos Secundarios: 8
1.6 Cultivo *in vitro:*..... 8
1.7 Latencia de las semillas: 9
1.8 Factores que afectan a la germinación de las semillas:..... 9
1.8.1 Factores externos: 9
1.8.2 Temperatura: 9
1.8.3 Oxígeno: 10
1.8.4 Luz: 10
1.9 Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales: 10
1.10 Estimulación de la Germinación:..... 10
1.11 Estimulación química en la germinación de Semillas:..... 11
1.12 Peróxido de Hidrogeno: 11
1.13 Nitrato de Potasio: 12
CAPITULO II 13
MATERIALES Y MÉTODOS 13
2.1 Área de estudio: 14
2.2 Selección de semillas de *Gynoxys verrucosa:*..... 14
2.3 Medio de Cultivo: 15
2.4 Proceso de desinfección: 15
2.5 Lineamiento del diseño experimental: 16

2.6 Aplicación del Tratamiento: 16
2.7 Siembra: 16
2.8 Germinación: 17
CAPITULO III 18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 18
3.1 Análisis por Tratamiento: 20
3.2 Tratamientos en diferentes periodos de exposición: 21
3.3 Germinación de las semillas de Gynoxys verrucosa de acuerdo a su origen Celica – Yangana: 22
CONCLUSIONES 24
RECOMENDACIONES: 25
BIBLIOGRAFÍA 26
ANEXOS 31
Anexo 1: Análisis estadístico de germinación en semillas de *Gynoxys verrucosa* en cultivo *in vitro* 32
Anexo 3: Semillas de *Gynoxys verrucosa* en la planta 33
Anexo 4: Medio de cultivo Murashinge & Skoog 1962 34
Anexo 5: Siembra de semillas de *Gynoxys verrucosa* en cultivo *in vitro* 34
Anexo 6: Germinación de semillas de *Gynoxys verrucosa* 35

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.- Inflorescencia *G. verrucosa* spp---------- 14

Figura 2.- Selección de semillas *G. verrucosa* libre de impuresas ---------- 14

Figura 3.- Semillas de *G. verrucosa* con Nitrato de potasio y Peróxido de hidrogeno 16

Figura 4.- Germinación de semillas *G. verrucosa* ---------- 17

Figura 5.- Número de semillas de *G. verrucosa* germinadas por cada frasco en tratamientos y controles---------- 19

Figura 6.- Influencia del Peróxido de hidrogeno y Nitrato de potasio sobre la germinación de semillas de *G. verrucosa*---------- 20

Figura 7.- Periodo de exposición de los tratamientos químicos frente a las semillas de *G. verrucosa* ---------- 21

Figura 8.- Germinación según la procedencia de las semillas de *G. verrucosa*-------- 22

Tabla 1.- Tipo de compuesto y tiempo de exposición para estimular la germinación en semillas de *Gynoxys verrucosa* ---------- 15

RESÚMEN

El programa “Distribución geográfica, biológica reproductiva, diversidad genética y química de especies vegetales de interés, medicinal, en la región sur del Ecuador” tiene como fin contribuir a la producción de plantas de la especie *Gynoxys verrucosa,* Asteraceae, para la extracción de metabolitos secundarios de interés en medicina, bajo este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia de peróxido de hidrogeno y nitrato de potasio a una concentración de 0.1 % en un tiempo de exposición de 6, 12, 24 horas, para acortar el tiempo de geminación de las semillas *Gynoxys verrucosa* en condiciones *in vitro*. Los resultados obtenidos con peróxido de hidrogeno fueron superiores con 6,24%, mientras que en nitrato de potasio se obtuvo una germinación de 3,96 %, esto sugiere que se aumente las concentraciones en este tratamiento. El tiempo de exposición más significativo fue de 6 horas para ambos tratamientos. Los controles frente a ambos tratamientos presentaron una germinación inferior.

Palabras claves: Murashige – Skoog, (1962); Dormancia; Nitrato de Potasio (NO3K); Peróxido de Hidrogeno (H2O2); *Gynoxys verrucosa* Asteraceae.

ABSTRACT

"Geographical distribution, reproductive biological, genetic and chemical diversity of plant species of interest, medicinal, in the southern region of Ecuador" the same that aims to contribute to the production of plants *Gynoxys verrucosa*, Asteraceae, for extraction of secondary metabolites of interest in medicine. In this context this work was to evaluate the influence of chemical treatments hydrogen peroxide and potassium nitrate to shorten the time of germination of the *Gynoxys verrucosa* seeds by conditions in vitro, the results with hydrogen peroxide were superior to 6.24%, potassium nitrate 3.96%, this suggests that concentrations should be increased in this treatment. The exposure time of seed treatments was 6, 12, 24 hours, with the most significant 6 hours for both treatments. Controls against both treatments had a lower germination.

Key words: Murashige - Skoog, (1962); dormancy; Potassium nitrate (NO3K); Hydrogen Peroxide (H2O2); Asteraceae.

INTRODUCCIÓN

La flora andina del Ecuador está constituida por 289 géneros pertenecientes a 93 familias y se listan 1568 especies de árboles y arbustos nativos registrados sobre los 2400 metros de altitud, siendo de estos la familia más rica en especies la Asteraceae con 251 géneros (Balslev et al., 2008).

Dentro de la familia Asteraceae se encuentra nuestra especie de estudio *Gynoxys verrucosa* que es originaria de la provincia de Loja y Provincia de Zamora - Chinchipe, tiene varios usos, uno de estos es que una planta usada en la medicina tradicional en el sur de Ecuador para el tratamiento y la curación de las heridas (Ordoñez et al., 2015). Una de las características principales que rodea la especie estudiada es que ha sido investigada y es prometedora para generar nuevos medicamentos contra el cáncer (Tene et al., 2007).

El uso de semillas para la germinación *in vitro* permite mantener la variabilidad genética de las poblaciones naturales, ya que las semillas contienen toda la información genética dentro de sus embriones (John, Peacock, & Willianís, 1993).

Mantener la variabilidad genética es una prioridad. La pérdida de la variabilidad genética puede disminuir la capacidad de las especies para responder a cambios en el ambiente y, como consecuencia, disminuir su probabilidad de adaptación futura, su sobrevivencia y su potencial evolutivo, por medio de técnicas moleculares se puede cuantificar la variabilidad genética. Esto puede ayudar a definir prioridades, reducir costos y tomar decisiones importantes en cuanto al manejo de las especies en peligro de extinción (CIN, 2015).

Una de las ventajas que se presentan en esta técnica es optimizar el tiempo de producción y del espacio físico; ya que en un metro cuadrado de cultivos *in vitro*, hay el mismo número de individuos que en una hectárea, estas plantas pueden ser almacenadas por largos periodos de tiempo (George et al., 2008).

Considerando que las semillas se pueden encontrar en un periodo de dormancia o estado de latencia, existen muchas especies arbóreas que germinan enseguida cuando se las somete a unas condiciones de humedad y temperatura favorable (Willan, 1991). Por lo tanto, mediante el procedimiento de desinfección y las horas aplicadas del tratamiento químico se pretende descartar la latencia de las semillas.

Latencia de las semillas se refiere a un estado en el que las semillas viables no germinan cuando se les proporciona condiciones favorables para la germinación, la humedad adecuada, el régimen de temperatura adecuada, un ambiente normal y en algunos casos la iluminación (Schmidt, 2000).

Los tratamientos previos para romper la latencia física de la cubierta tienen por finalidad ablandar, perforar, rasgar o abrir la cubierta para hacerla permeable, sin dañar el embrión ni el endosperma que están en su interior. Comprenden métodos físicos y biológicos, calor seco y remojado en agua o soluciones químicas (Willan, 1991).

Hasta la fecha no se ha desarrollado estudios sobre la reproducción *in vitro* de la especie, por lo que se pretende con este proyecto es encontrar las mejores condiciones de cultivo para la germinación de las semillas, así como diseñar una estrategia ideal para su conservación.

Por lo cual, con el presente estudio se busca la propagación de las semillas de la especie *Gynoxys verrucosa* induciendo su germinación en condiciones *in vitro*, para contribuir a la producción de plantas, sometiéndolas a un análisis químico antes mencionado el cual será determinado mediante el programa “Distribución geográfica, biológica reproductiva, diversidad genética y química de especies vegetales de interés, medicinal, en la región sur del Ecuador”.

Razón por la cual en este estudio se utilizarán tratamientos químicos como peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y nitrato de potasio (KNO_3), los mismos tienen la intención de acortar el tiempo para la germinación de semillas de *Gynoxys verrucosa* y la obtención de plantas de una manera aséptica, eficaz y rápida.

OBJETIVOS

- **Objetivo General:**

Evaluar tratamientos químicos para acortar el tiempo de germinación de las semillas *Gynoxys verrucosa* mediante cultivos *in vitro.*

- **Objetivo Específico:**

Determinar el efecto del peróxido de hidrogeno y nitrato de potasio sobre los porcentajes y tiempo de germinación de *Gynoxys verrucosa.*

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Características del género:

Arbusto de 1-2 m, corteza marrón levemente tomentosa, ramas canaliculadas. Hojas opuestas, ápice agudo, haz foliar bullada, envés cubierto de un denso indumento lanosa, deciduo al tacto, nerviación reticulada, nervios secundarios pátulos de 8 – 15 por lado. Inflorescencias piramidales, con ramas y pedúnculos gruesos y densamente lanosos; pedúnculos y pedicelos cubiertos por abundantes bractéolas triangulares de menos de 2 mm Long. Flores radiadas, femeninas, liguladas, 4 por capitulo, corola glabra de 8.5-9 mm Long, ramas del estilo lineares, contortas de 1.8-2mm, con ápice agudo, y con un mechón de pelos más largos, dorsalmente pilosulas (Diaz & Correa, 2016).

1.2 Taxonomía:

El género fue descrito por Alexandre Henri Gabriel de Cassini y publicado en *Dictionnaire des Sciences Naturelles*; *Gynoxys verrucosa* es un arbusto perteneciente a las Senecioneae, tribu de la familia de las Asteracea (Naturalista, 2016).

1.3 Distribución de *Gynoxys verrucosa:*

Crece en las partes altas de los Andes a veces se los confunde con los quishuares. Este género pertenece a la familia Asteraceae. En Ecuador se los observa en la ceja andina y en el subpáramo hasta 4400 msnm y sobre una diversidad de suelos (Loján, 1992). Se encuentra distribuida a 167 km al sur occidente de la ciudad de Loja en el cantón Celica, de la misma manera la podemos encontrar en el sector las chichas, se encuentra distribuida también a pocos kilómetros de la ciudad de Loja en la parroquia Vilcabamba, y en la parroquia de Yangana.

1.4 Usos Tradicionales:

Gynoxys verrucosa Wedd (Asteraceae), es una hierba usada en la medicina tradicional en el sur de Ecuador para el tratamiento y la curación de las heridas (Lojan, 1992).

1.5 Metabolitos Secundarios:

Gynoxys verrucosa ha sido utilizada para la determinación de metabolitos secundarios. Luego de un extracto metanólico, la especie *Gynoxys verrucosa* posee los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides (AL), flavonoides (FL), taninos (TA), esteroides (ES), lactonas sesquiterpénicas (LS). (Ordoñez et al., 2016). La planta, comúnmente conocido como guangalo están siendo utilizada en medicina tradicional para los tratamiento de infección de piel y heridas la curación directa en la piel (Tene et al., 2007).

1.6 Cultivo *in vitro:*

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de hongos o bacterias o presencia mínima de ellas), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas; es decir el cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante (Castillo, 2005).

El método consiste en mantener los explantes (semillas, embriones, yemas, plántulas derivadas de nudos o directamente de meristemas) en condiciones físicas (factores ambientales) y químicas (composición del medio de cultivo) que permitan extender al máximo el intervalo de transferencia a los medios frescos. Sin que ello afecte la viabilidad de los cultivos (Toledo et al., 1998).

1.7 Latencia de las semillas:

La semilla al madurar por completo, inicia un periodo de letargo producido por factores internos y externos, impidiendo así que una semilla viable sea incapaz de iniciar su proceso de germinación, a pesar de tener condiciones de agua, temperatura, etc. apropiadas para tal efecto (CATIE, 1996).

La latencia, dormancia o letargo, sirve como mecanismo de supervivencia o adaptación frente a ciertas condiciones ambientales o de sitio que se dan en la naturaleza (Ruiz, 2012).

Hay varios grados de latencia que varían desde muy leve a muy fuerte (profunda), por lo general el desarrollo o el grado de cambios de latencia se dan durante la vida de la semilla como una respuesta a las condiciones externas. Para romper la latencia natural de la semilla se aplica un proceso de pretratamiento, el propósito de pretratamiento es garantizar tanto que las semillas germinen, y que la germinación sea rápida y uniforme, el pretratamiento normalmente se lleva a cabo poco antes de la siembra, es decir, después del almacenamiento (Schmidt, 2000).

1.8 Factores que afectan a la germinación de las semillas:

1.8.1 Factores externos:

La velocidad de germinación de las semillas depende de varios factores ambientales que actúan en forma continua y por periodos prolongados. Entre los más importantes se encuentran la disponibilidad de agua, la temperatura, el oxígeno, el dióxido de carbono y la disponibilidad de luz. Cada uno de estos factores puede inhibir o estimular la germinación, por lo que el efecto combinado de todos ellos determinaría la duración y la tasa de germinación (Herra et al., 2006).

1.8.2 Temperatura:

Es un factor decisivo en el proceso de la germinación, ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación. Por eso, las

semillas solo germinan dentro de cierto margen de temperatura. Si la temperatura es muy alta o muy baja, la germinación no tiene lugar aunque las demás condiciones sean favorables (UPV, 2016).

1.8.3 Oxígeno:

El oxígeno es indispensable para la germinación. En general, la estructura porosa de las cubiertas seminales permite la retención de una cierta cantidad de gases, que son liberados en el momento de la imbibición, y pueden ser utilizados por el embrión en forma disuelta en el agua (Herra et al., 2006).

1.8.4 Luz:

La luz tiene efectos multiples en las semillas, y tanto su calidad como su intensidad afectan, según la especie y el proceso germinativo (Faccini & Puricelli, 2016).

1.9 Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales:

La contaminacion por microorganimos continua siendo hoy en dia, uno de los principales problemas para los micropropagadores de plantas en el mundo. Por esta razón, las pérdidas en el cultivo de tejidos de numerosas especies son cuantiosas, lo cual hace economicamente ineficientes muchos procesos. Entre los microorganismos frecuentemente aislados como contaminantes, se menciona a los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras. Muchos microorganismos no son conocidos por provocar daños a las plantas en campo y sin embargo, se convierten en patogenos *in vitro* (Alvarado, 1998).

1.10 Estimulación de la Germinación:

Las semillas de muchas especies germinan enseguida cuando se las somete a unas condiciones de humedad y temperatura favorables, en caso de que exista dormancia, la germinación artificial exige de manera esencial alguna forma de tratamiento previo de la semilla, a fin de obtener una tasa de germinación razonablemente alta en poco tiempo, la decisión de tratar previamente o no las semillas dependerá no sólo de la especie de que se trate, sino también de la

procedencia, el año de fructificación, las condiciones del vivero local y la duración y condiciones del almacenamiento (FAO, 1991).

La longevidad de las semillas es una característica de las semillas influida por factores internos y el almacenamiento, como el contenido de humedad y la temperatura, algunas se deterioran rápidamente mientras que otras se mantienen por largos periodos de tiempo. La pérdida del poder germinativo se puede evitar con buen manejo, almacenamiento y con un pretratamiento (Trujillo, 2013).

1.11 Estimulación química en la germinación de Semillas:

Los productos químicos son necesarios para estimular la germinación en las semillas, con pequeñas cantidades del mismo se puede tener un porcentaje o tasa de germinación alta; la ventaja de los tratamientos químicos consiste en que, cuando se logra fijar el producto con exactitud, uniformidad y seguridad, este queda ubicado en el sitio donde su acción es más eficaz (Arriagada, 2016).

1.12 Peróxido de Hidrogeno:

El compuesto peróxido de hidrogeno tiene ventajas siendo la principal la base bioquímica $H_2 O_2$. Se cree que el $H_2 O_2$ amplía las fases tempranas de germinación incrementando el nivel de oxígeno en el ambiente y por tanto estimulado la respiración; del mismo modo para tener un mejor resultado se abre un pequeño hueco en el extremo radicular de la testa de la semilla, el objetivo de este procedimiento es acelerar la germinación de ciertas clases de semillas que germinan lentamente o muestran latencia en una prueba de germinación (CATIE, 2000).

El peróxido de hidrogeno también es un eficaz esterilizante de semillas, dentro de sus ventajas están que es menos toxico y puede aumentar la germinación porque ablanda la cubierta de la semilla y permite que el agua y el oxígeno entren con más facilidad. En el caso del peróxido de hidrógeno, las semillas se remojan directamente en él durante un periodo de hasta cuatro horas (Villalobos et al., 2007).

1.13 Nitrato de Potasio:

El empleo de nitrato de potasio en semillas, además de escarificarlas, produce un efecto desinfectante y elimina impurezas. Muchas semillas que están en latencia responden al remojo en una solución de nitrato de potasio al 0.2%, este tratamiento se hace en el laboratorio cuando se lleva a cabo pruebas de germinación en cajas Petri o en bandejas. El nitrato de potasio se aplica una sola vez, y si se requiere más humedad para el medio de germinación, se debe agregar agua destilada (Sierra, 2005).

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio:

Las semillas de *Gynoxys verrucosa* fueron colectadas en el cantón Celica ubicado a 78 km al oeste de la ciudad de Loja, su temperatura media oscila entre 15,3°C. La especie de estudio se colectó en la zona de ingreso del cantón, se utilizó además semillas de la parroquia Yangana que está ubicada a 69 km de la cuidad de Loja, su temperatura oscila entre 22°C y 19°C.

Con las semillas ya recolectadas, se realizó una extracción de los frutos; clasificación de las semillas y desinfección de las mismas.

Figura 1.- Inflorescencia *G. verrucosa* spp

2.2 Selección de semillas de *Gynoxys verrucosa:*

Para la selección de las semillas se separó la inflorescencia en donde se encuentran las semillas, la misma que debe estar seca en su totalidad. Seguidamente con la ayuda de una pinza pequeña se seleccionó las semillas y colocándolas en una caja Petri.

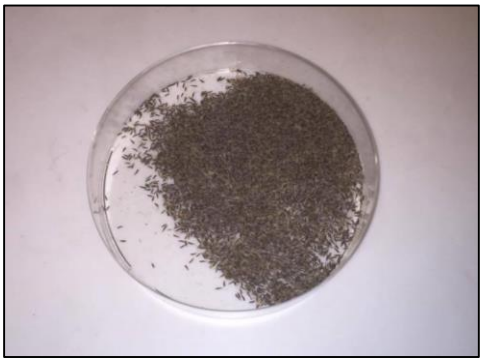


Figura 2.- Selección de semillas *G. verrucosa* libre de impurezas

2.3 Medio de Cultivo:

El medio que se utilizó para la germinación de las semillas de *Gynoxys verrucosa* fue Murashige & Skoog (1962), se pesó en la balanza Sartorius agar (0,07%), sacarosa (2%), KINETIN (0,005 g), 2,4 – DICHLORO PHENOXYACETIC ACID (0,001). Luego se ajustó el pH del medio de cultivo a 5.8 finalmente se colocó en frascos de vidrios los mismos que fueron esterilizados a 121 °C por 20 min en el autoclave.

2.4 Proceso de desinfección:

Las semillas fueron desinfectadas con alcohol al 70% por 1 minuto, seguido por enjuagues con agua destilada estéril; luego fueron inmersas en hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos para ser enjuagadas dos veces; seguidamente se enjuagó en agua oxigenada al 10% por 5 min (George et al., 2008). Finalmente las semillas fueron divididas en dos grupos, el primero fue colocado en nitrato de potasio y el segundo en peróxido de hidrogeno según se presenta en la siguiente tabla 1:

Tabla 1.- Tipo de compuesto y tiempo de exposición para estimular la germinación en semillas de *Gynoxys verrucosa*

Procedencia	**Compuesto**	**Tiempo de Exposición (horas)**
Celica	Nitrato de Potasio	6
		12
		24
	Peróxido de Hidrogeno	6
		12
		24
Yangana	Nitrato de Potasio	6
		12
		24
	Peróxido de Hidrogeno	6
		12
		24
Control o testigo: 5 frascos por cada tiempo de exposición, es decir 15 frascos total.		

Se realizaron 5 repeticiones por cada tratamiento en los tres tiempos con 25 semillas por frasco y sus respectivos testigos.

2.5 Lineamiento del diseño experimental:

Variable dependiente: porcentaje de semillas germinadas
Variable independiente: tiempo de exposición Peróxido de nitrógeno y Nitrato de potasio

2.6 Aplicación del Tratamiento:

Luego de la desinfección se procede a colocar el tratamiento ya sea el de Nitrato de Potasio o el de peróxido de hidrogeno (agua oxigenada), el cual se determina por horas las cuales son 6, 12, 24 horas; la finalidad de aplicar el tratamiento químico por horas establecidas es conocer si el tiempo que se aplica el tratamiento a las semillas incide a su germinación. De esta manera se sabrá el tiempo requerido para la aplicación del tratamiento y con cual se presenta una germinación más eficaz.

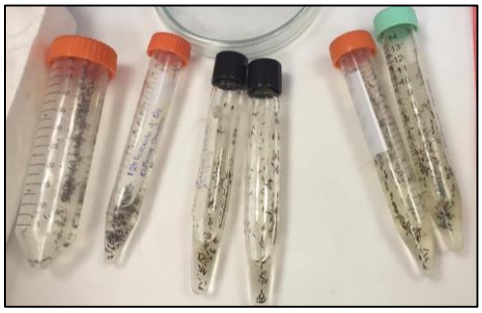


Figura 3.- Semillas de *G. verrucosa* con Nitrato de potasio y Peróxido de hidrogeno

2.7 Siembra:

Luego de cumplir el tiempo establecido de la colocación del tratamiento se enjuaga con agua destilada estéril a las semillas y se les coloca Benomil al 2% por 5 minutos antes de la siembra.
Para la siembra se procedió de la siguiente manera a) se coloca todos los materiales de laboratorio en las cabinas de flujo laminar y se coloca los rayos UV por un periodo de 30 minutos, se desinfecta con alcohol la zona de siembra para tener una siembra con

una contaminación mínima; b) con la ayuda de una micropipeta de 5 ml se procede a la extracción de las semillas que se encuentran en el tubo Falcon con benomil y se las coloca en el frasco donde se encuentra el medio, luego con un pinza estéril se distribuye las semillas de una manera uniforme en el medio y se cierra rápidamente y se sella con cinta de polietileno; c) una vez terminada la siembra se coloca las réplicas en el cuarto de incubación para que estén a una temperatura estable que consiste en un fotoperiodo de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad a una temperatura ambiental de 22 °C ± 3. El cultivo fue mantenido por 15 días en los cuales se mostró germinación, sin embargo se sigue conservando la siembra en el cuarto de incubación; d) Registro y análisis de datos: en total se realizó el seguimiento a las semillas germinadas divididas en 5 repeticiones por hora establecida y por tratamiento dando un total de 32 frascos en la siembra total, tomando en cuenta el control que es 1 por tratamiento. Así también los datos con contaminación por hongos u bacterias fueron registrados y desechados. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa PRISM 5.

2.8 Germinación:

Para la germinación se consideró el número total de semillas sembradas por tratamiento que fue 2.625 (100%) en 105 frascos, la cantidad de semillas por frasco fue de 25, de estas en su totalidad germinaron 164 a los 14 días.

El total de semillas sembradas por control fue de 2.625 (100%) en 105 frascos con una cantidad de 25 semillas por frascos, teniendo de estos una germinación poco significativa con un total de 50 semillas germinadas.

Figura 4.- Germinación de semillas *G. verrucosa*

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según Atencio et al. (2003) los tratamientos químicos permiten mejorar la germinación y a su vez aumentar la viabilidad de las semillas. Para facilitar la germinación de las semillas se puede aplicar tratamientos químicos. Por lo cual los efectos de los tratamientos químicos realizados en las semillas de *Gynoxys verrucosa* ayudaron para su germinación a corto plazo y a su vez a eliminar la dormancia de las mismas.

En la figura 5, se observa la germinación de las semillas en un periodo de 15 días, y la germinación de controles en un periodo de 30 días.

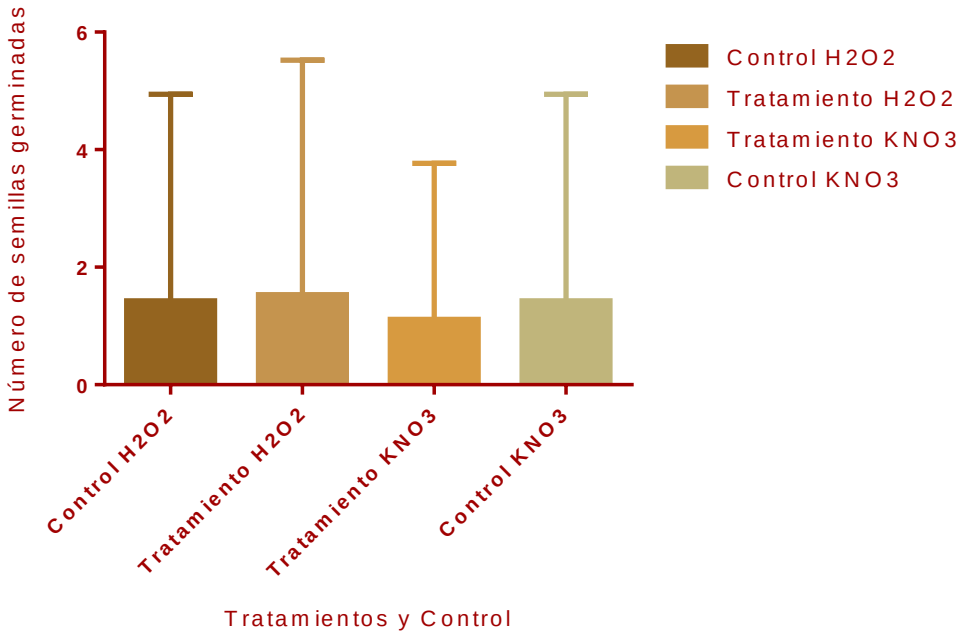


Figura 5.- Número de semillas de *G. verrucosa* germinadas por cada frasco en tratamientos y controles

De esta manera el análisis de varianza de los tratamientos químicos peróxido de hidrogeno y nitrato de potasio y controles, presentaron diferencia significativa ($P<0.05$), de acuerdo con la prueba de *Tukey*.

El porcentaje de germinación de peróxido de hidrogeno fue de 6,24% en nitrato de potasio se obtuvo un porcentaje de germinación de 3,96 %. Comparando con el estudio de Clarke & Stevenson (1943) los mismos que probaron el uso de soluciones de nitrato de potasio indican que su uso no fue efectivo para producir un incrementoen el porcentaje o velocidad de germinación, se infiere que la concentración de KNO_3 debe ser más alta.

Así mismo el porcentaje de germinación del control de peróxido de hidrogeno fue 2,57%. Así como el porcentaje de germinación de nitrato de potasio fue de 1,90%, siendo el porcentaje de germinación de semillas con peróxido de hidrogeno superior a la germinación de las mismas con la aplicación del tratamiento.

3.1 Análisis por Tratamiento:

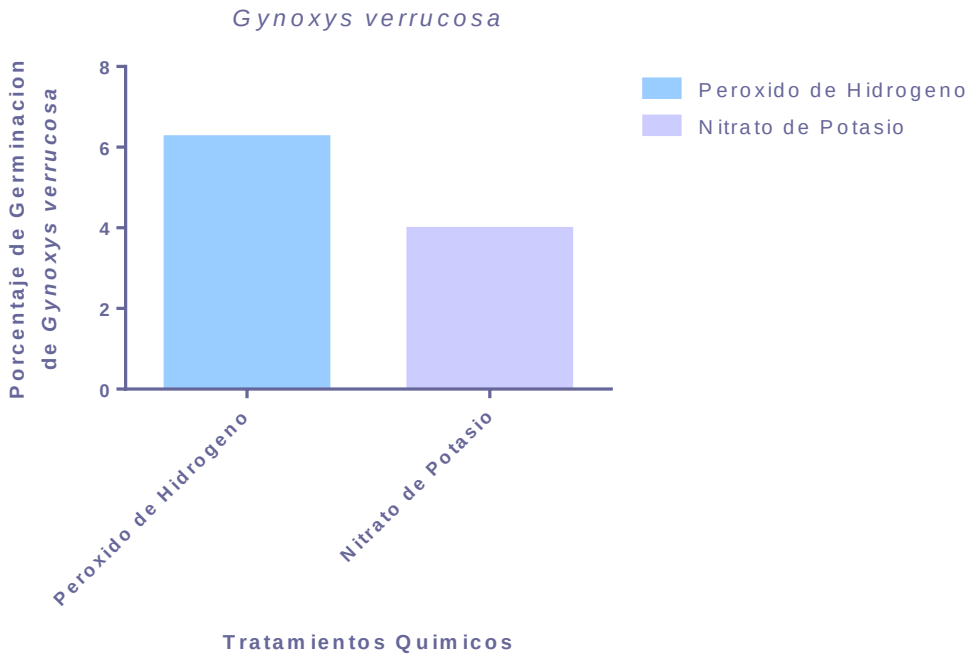


Figura 6.- Influencia del Peróxido de hidrogeno y Nitrato de potasio sobre la germinación de semillas de *G. verrucosa*

Se trabajó a una concentración de 0.1% de KNO_3, según Steinbauer (1957), indica que las concentraciones optimas de nitrato de potasio van de 0.1 a 0.5 %.

Por otro lado, Gutormson y Weiesner (1987), indican que una solución de 0.2% de KNO3 es el mejor agente humectante a usar para probar la viabilidad de las semillas. De esta manera se puede ratificar que con una solución de 0.2% de KNO3 es más efectiva con mayor porcentaje de germinación.

Sin embargo el peróxido de hidrogeno ha demostrado que incrementa la germinación en semillas, porque ablanda su testa y aumenta la permeabilidad del agua y oxigeno (Barnett, 1998), evidenciando de esta manera que la germinación con este tratamiento

en las semillas de *Gynoxys verrucosa* fue más significativo. Menciona que el efecto positivo del H_2O_2 sobre la germinación de semillas puede ser atribuido al hecho de que la eliminación de H_2O_2 resulta en la producción de oxígeno necesario para diversos procesos metabólicos (Díaz, 2013).

La concentración de peróxido de hidrógeno fue de 0.1% la cual fue eficaz para aumentar el porcentaje de germinación.

Con un porcentaje de 6,24% se puede inferir que el tratamiento que induce y aumenta la germinación de las semillas de *Gynoxys verrucosa* es Peroxido de hidrogeno, cumpliendo así el objetivo propuesto.

3.2 Tratamientos en diferentes periodos de exposición:

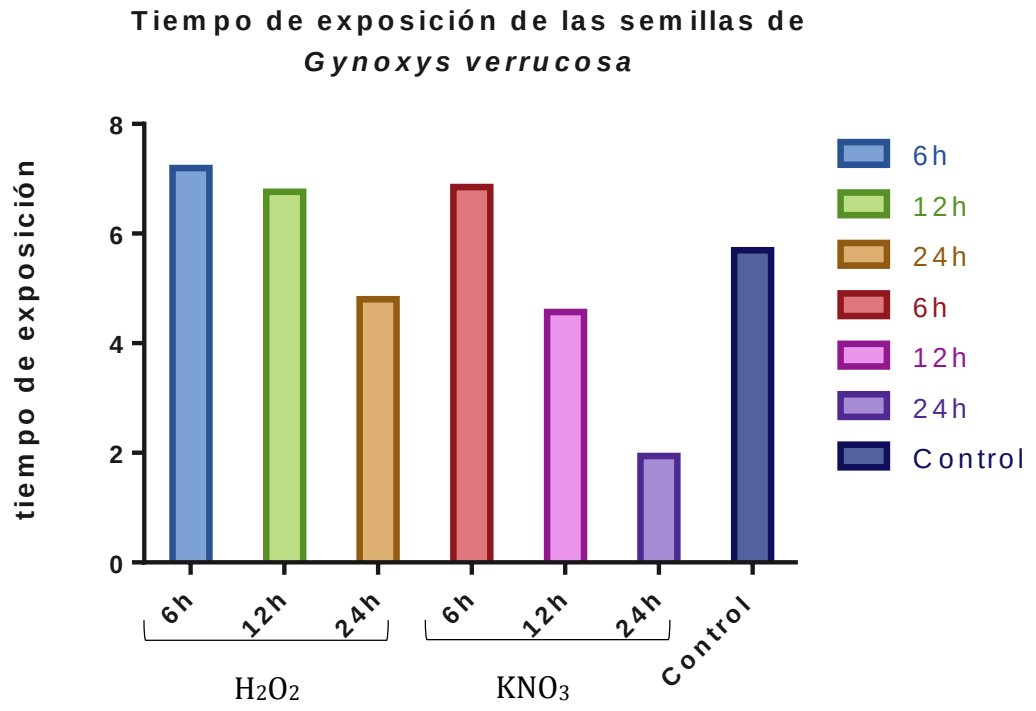


Figura 7.- Periodo de exposición de los tratamientos químicos frente a las semillas de *G. verrucosa*

Para estimular la germinación en semillas de *Gynoxys verrucosa,* se establecieron tres tiempos (6, 12, 24 horas), obteniendo como resultado en el tratamiento de peróxido de hidrogeno con tiempo de exposición de 6 horas un 7,2%; en el tiempo de exposición de 12 horas un 6,76%; y finalmente en el tiempo de exposición de 24 horas un 4,8%.

Así mismo para el tratamiento de nitrato de potasio se estableció el mismo periodo de tiempo; obteniendo como resultado en el tiempo de exposición de 6 horas un 6,85%; en el tiempo de exposición de 12 horas un 4,57% y en el tiempo de exposición de 24 horas un 1,94%.

Según (Salisbury & Ross) 2000, las semillas responden de diferente manera de acuerdo a la concentración y tiempo de exposición en el peróxido de hidrógeno. En este trabajo el tiempo más idóneo para la germinación de las semillas de *Gynoxys verrucosa* es el de 6 horas para ambos tratamientos (H_2O_2 7,2% - KNO_3 6,85%).

La Asociación Internacional de Semillas (ISTA, 1985) mencionan que las semillas pueden germinar más rápidamente después de ser remojadas entre 24 y 48 horas, dependiendo de la especie y la variedad.

Cabe destacar que el bajo porcentaje de germinación se puede explicar por la alta sensibilidad de la semilla a la desecación (Barbedo & Bilia, 1998).

3.3 Germinación de las semillas de Gynoxys verrucosa de acuerdo a su origen Celica – Yangana:

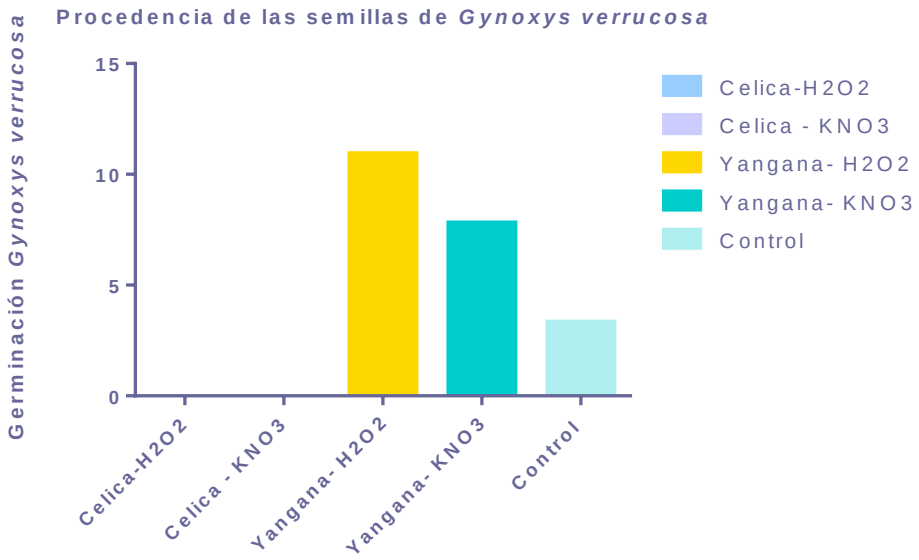


Figura 8.- Germinación según la procedencia de las semillas de *G. verrucosa*

Como se indica en la metodología tomando en cuenta la procedencia de las semillas de *G. verrucosa* del cantón Celica no hubo germinación. En las semillas procedentes del cantón Yangana se obtuvo una germinación significativa, en Peróxido de hidrogeno una germinación de 10,93% y en Nitrato de potasio una germinación de 7,8%.

La naturaleza/tipo de la semilla de *G. verrucosa* es recalcitrante, por este motivo se considera que por el tiempo de colecta y almacenamiento de ambos procederes se

obtuvo una diferencia significativa, ya que las semillas de Celica tuvieron un almacenamiento de cinco meses, y las semillas de Yangana un almacenamiento de un mes. Donde se puede presentar dormancia o latencia de las mismas.
Los posibles mecanismos de mantenimiento de la viabilidad de las semillas recalcitrantes incluyen las relaciones de carbohidratos tipo sacarosa, que interviene en el mantenimiento de la estabilidad de la membrana durante la desecación de la semilla y previenen su daño (Koster, 1991; Black & Pritchard, 2002).

Por otro lado las semillas ortodoxas se secan hasta alcanzar un contenido de humedad bajo y a temperaturas bajo cero (Rao., et al 2007). Esto se debe a la tasa de perdida de agua se relaciona con el grosor de las cubiertas de las semillas (Chacón & Bustamante, 2001).

Se debe tener en claro que no existen estudios de la especie ni tampoco se han realizado germinación en cultivo *in vitro* de la misma. Sin embargo se ha realizado la reproducción asexual de la planta *Gynoxys verrucosa* teniendo un brote en 31 dias (Ochoa., 2015). Por lo cual se considera a la propagación *in vitro* como una técnica más efectiva, según Mejia, (1988) el cultivo *in vitro* posee mayores ventajas que otro tipo de siembra; el éxito de la micropropagación en condiciones de laboratorio, es mayor en comparación al de condiciones de campo, evitando el riesgo de pérdidas por factores climáticos (presencia de heladas, sequias prolongadas, temperaturas elevadas) o sanitarios.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que para la estimulación de la germinación mediante cultivo *in vitro* de las semillas de *Gynoxys verrucosa* el tratamiento que más influenció en la germinación fue peróxido de hidrogeno en un tiempo de exposición de seis horas.

La influencia de nitrato de potasio sobre la germinación de las semillas no fue significativo, sin embargo con este tratamiento y en los tiempos de exposición propuestos, el tiempo de seis horas tuvo más germinación que el de 12 y 24 horas.

La siembra mediante propagación *in vitro* tiene mayores ventajas en la propagación de plantas, debido a las ventajas que presenta la misma, las condiciones de asepsia y a las temperaturas controladas en donde se desarrollan. Obteniendo así un mayor número de germinación en cultivo *in situ* y no en cultivos *ex situ.* Acortando así el tiempo de germinación de la especie.

RECOMENDACIONES:

Las técnicas de asepsia en el laboratorio deben ser estrictas para evitar la contaminación por hongos, bacterias, etc. De esta manera las semillas *in vitro* tendrán una germinación mayor y libre de contaminación

Se puede aumentar la concentración de Nitrato de potasio para tener mayor germinación con este tratamiento, según la bibliografía citada la concentración óptima es de 0,2 y la concentración con la que se trabajó fue de 0,1.

Se debe tomar en cuenta el tiempo de colecta de las semillas y su procedencia, ya que mientras más tiempo tengan de almacenamiento la germinación disminuirá, o será nula.

Aparentemente el almacenamiento de las semillas afecta su germinación, por tanto se debe considerar esto en estudios de germinación y probar germinación a los 2 o 3 días de colecta y otros tiempos de almacenamiento. Además se podrían realizar estudios de viabilidad de esta especie y los factores que influyen sobre la calidad de las semillas.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarado, Y. (1998). Control de Prevención de la contaminacion microbiana en la micropropagacion de plantas. *CENIC Ciencias Biologicas*, 87-91.

Arévalo, J. (1998). *Tratamiento para mejorar la germinacion de semillas de yerba mate (Ilex paraguariensis) y algarrobo (Proposis spp).* Honduras : Zamorano.

Arriagada, V. (20 de 01 de 2016). *Semillas Inspeccion, análisis, tratamiento y legistacion*. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=5lL0hrSuzq8C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false

Atencio, L., Colmenares, R., Ramirez, M., & Marcano, D. (2003). *Tratamientos pregerminativos en acacia San Francisco (Peltophorum pterocarpum) Fabaceae.* Caracas - Venezuela: Rev. Fac. Agron. v.20 n.1.

Balslev, H., Navarrete , H., de la Torre , L., & J. Ma, M. (2008). *Enciclopedia de plantas utiles del Ecuador.* Quito: Herbario QCA & Herbario AAU.

Barbedo, C. & D. Bilia, (1998). Evolution of research on recalcitrant seed. Sci. Agric. Pira cicaba 55; 121 – 125

Barnett, H. L and B. B. Hunter. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi 4th edition. St. Pad. Mn APS Press 218 pp.

Black, M. & H. Pritchard. (2002). Desiccation and plant survival. CABI Publishing. 399 9.

Castillo, A. (2005). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: un biotecnologia que nos acompaña hace mucho tiempo.* Uruguay: Unidad de biotecnologia, INIA Las Brujas.

CATIE. (1996). *Recoleccion de Semillas Forestales.* Turrialba, Costa Rica: PROSEFOR.

CATIE. (2000). *Tecnicas para la escarificacion de semillas forestales .* Turrialba - Costa Rica : Proyecto de Semillas Forestales - PROSEFOR.

Chacón, P. y R.O. Bustamante. 2001. The effects of seed size and pericarp on seedling recruitment and biomass in Cryptocarya alba (Lauraceae) under two contrasting moisture regimes. Vegetatio 152 (2), 137-144.

Chen, Y.-J., Chen, Y.-Y., Wu, C.-Y., & Chi, C.-C. (2016). Oral Chinese herbal medicine in combination with phototherapy for vitiligo: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complementary Therapies in Medicine*, *26*, 21–27. http://doi.org/10.1016/j.ctim.2016.02.009

CIN. (23 de 11 de 2015). *Variabilidad genética y cultivo in vitro para conservar las orquídeas en Costa Rica*. Obtenido de http://www.dicyt.com/noticias/variabilidad-genetica-y-cultivo-in-vitro-para-conservar-las-orquideas-en-costa-rica

Clarke, A. E. & F.S. Stevenson. (1943). Factors influencing the germination of seed of the potato. Am. Potato J.

Diaz, P. (2013). *Agua Oxigenada y Germinación de semillas.* Murcia, España: CEBAS-CSIC.

Diaz, S., & Correa, A. (20 de 01 de 2016). *Novedades en Senecionae de Colombia. Nuevas especies de Scrobicaria, Gynoxys y Aequatorium.* Obtenido de http://www.accefyn.org.co/revista/Vol_26/100/341-346.pdf

Ezzedine, K., Sheth, V., Rodrigues, M., Eleftheriadou, V., Harris, J. E., Hamzavi, I. H., & Pandya, A. G. (2015). Vitiligo is not a cosmetic disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *73*(5), 883–885. http://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.07.039

Faccini, D., & Puricelli, E. (21 de 04 de 2016). *Scielo*. Obtenido de Efecto de la Temperatura y la luz sobre la germinacion Nicotiana longiflora Cavaniles y Oenothera indecora Camb: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-298X2006000100003

FAO. (1991). *Guia de Manipulacion de semillas forestales .* Roma - Italia : DADIDA.

Gazquez, M. (2014). *Recuperar con plantas el suelo contaminado.* Loja - Ecuador : Universidad Tecnica Particular de Loja.

George, E., Hall, M., & Jan De Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture.* United States : Springe.

Gutormson, T. & E. Wiesner. (1987). Methods for the germination of bear dless wildrye (Elymus triticoides)

International Seed Testing Association on (ISTA) 1985. International Rules for Seed Testing Seed Sci and Tech.

John, H., Peacock, J., & Willianís, T. (1993). *Manejo y Evaluación de Recursos Fitogenéticos.* Cambridge University Press.

Koster, K.L. 1991. Glass formation and desiccation tolerance in sedes. Plant Physiol. 96, 302- 304.

Kramarenko, G. G., Hummel, S. G., Martin, S. M., Buettner, G. R., Kramarenko, G. G., Hummel, S. G., … Buettner, G. R. (2006). Ascorbate Reacts with Singlet Oxygen to Produce Hydrogen Peroxide Ascorbate Reacts with Singlet Oxygen to Produce Hydrogen Peroxide, *82*(6), 1634–1637. http://doi.org/10.1562/2006-01-12-RN-774

Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y., Liu, Y.-G., & Y-g, L. (2016). CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications Running Title: CRISPR/Cas9 platforms for plant genome editing. *Molecular Plant*, *9*(7), 961–974. http://doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.009

Monyethabeng, M. M., & Krügel, M. (2016). The effect of UV-C treatment on various spoilage microorganisms inoculated into Rooibos iced tea. *LWT - Food Science and Technology*, *73*, 419–424. http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.045

Mejia, R., Vitirelli, C. (1988). Cultivo “in vitro” de plantas de papa. 1:112.

Murashinge, T., and Skoog (1962). A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiologia plantarum 15: 473 – 497

Naturalista. (16 de 04 de 2016). *Taxonomia Gynoxys* . Obtenido de http://naturalista.conabio.gob.mx/taxa/185538-Gynoxys

Rao, N. K., J. Hanson, M.E. Dulloo, K. Ghosh, D. Nowell & M. Larinde. (2007). Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manual para bancos de Germoplasma No. 8. Biodiversity International, Roma, Italia, 182 pp.

Ochoa, K. (2015). Análisis de la reproducción asexual y porcentaje de colonización de *Gynoxys verrucosa,* perteneciente a la etnobotánica de la etnia Saraguro. Tesis de grado académico no publicada. UTPL, Loja, Ecuador

Oktay, K., Turan, V., Titus, S., Stobezki, R., & Liu, L. (2015). BRCA Mutations, DNA Repair Deficiency, and Ovarian Aging. *Biology of Reproduction*, *93*(3), 67. http://doi.org/10.1095/biolreprod.115.132290

Peters, P. N., Schryver, E. M., Lengyel, E., & Kenny, H. (2015). Modeling the Early Steps of Ovarian Cancer Dissemination in an Organotypic Culture of the Human Peritoneal Cavity. *Journal of Visualized Experiments*, (106), 1–10. http://doi.org/10.3791/53541

Ruiz, P. (2012). Latencia: Cuando las semillas duermen. *Forestal*, 12.

Schmidt, L. (2000). *Guide to Handling of Tropical and subtropical Forest Seed.* Danida Forest Seed Centre.

Salisbury, F. & C. Ross. (2000). Fisiología de las plantas. Tercera edición, Thomson Learning, España, 988p.

Schmidt, L. (2000). *Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed.* Gotemburgo, Suecia: Danida, Forest Seed Centre.

Sierra, J. (2005). *Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos de forrajeros .* Medellin - Colombia : Universidad de Antioquia.

Steinbaver, G. P. (1957). Interaction of temperatura and Moistening Agents in the germination and Early Development of potato seed – Lings Am. Potato j.

Trujillo, E. (2013). *Guia de Reforestacion .* Bogota - Colombia : DAYBERMEDIOS.

UPV. (21 de 04 de 2016). *Universidad Politecnica de Valencia*. Obtenido de Factores que afectan a la Germinación: http://www.euita.upv.es/varios/biologia/temas/tema_17.htm#Temperatura

Vargas, G. (2011). *Botanica General desde los musgos hasta los Arboles .* Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia San Jose.

Willan. (1991). *Guia para la Manipulacion de semillas forestales.* Roma: FAO.

ANEXOS

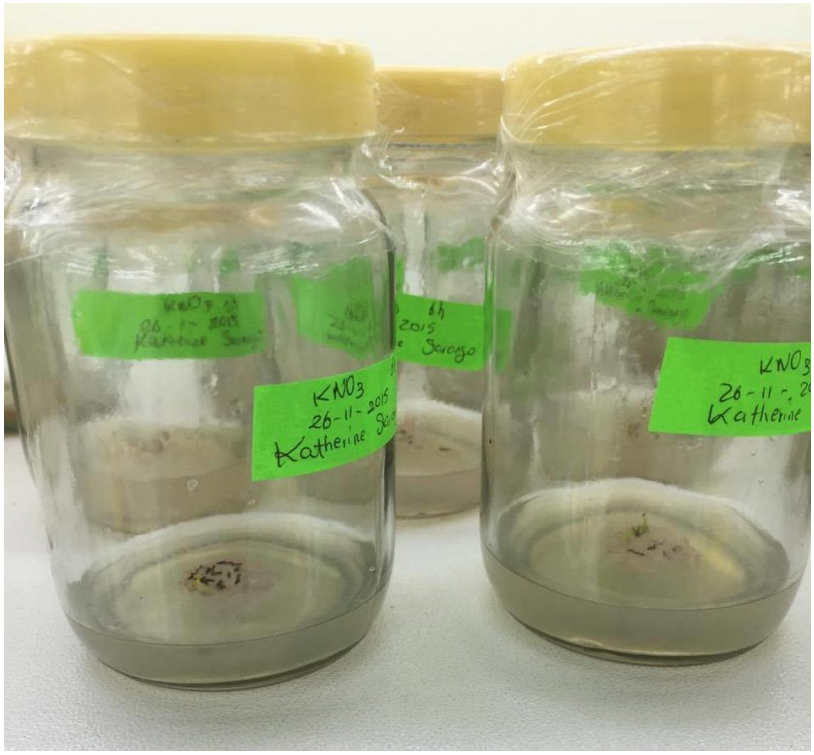
	1way ANOVA					
1	Table Analyzed	Data 1				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	0.0688				
5	P value summary	ns				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
7	Number of groups	4				
8	F	2.391				
9	R square	0.02374				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)	12.90				
13	P value	0.0049				
14	P value summary	**				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	107.8	3	35.93		
19	Residual (within columns)	4434	295	15.03		
20	Total	4542	298			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
23	CONTROL H2O2 vs TRATAMIENTO H2O2	1.053	2.353	No	ns	-0.5949 to 2.702
24	CONTROL H2O2 vs TRATAMIENTO KNO3	1.640	3.664	No	ns	-0.008208 to 3.288
25	CONTROL H2O2 vs CONTROL KNO3	1.173	2.611	No	ns	-0.4808 to 2.827
26	TRATAMIENTO H2O2 vs TRATAMIENTO KNO3	0.5867	1.311	No	ns	-1.062 to 2.235
27	TRATAMIENTO H2O2 vs CONTROL KNO3	0.1196	0.2664	No	ns	-1.534 to 1.773
28	TRATAMIENTO KNO3 vs CONTROL KNO3	-0.4670	1.040	No	ns	-2.121 to 1.187
29						

Anexo 1: Análisis estadístico de germinación en semillas de *Gynoxys verrucosa* en cultivo *in vitro*

Anexo 2: Inflorescencia *Gynoxys verrucosa*

Anexo 3: Semillas de *Gynoxys verrucosa* en la planta

Anexo 4: Medio de cultivo Murashinge & Skoog 1962



Anexo 5: Siembra de semillas de *Gynoxys verrucosa* en cultivo *in vitro*

Anexo 6: Germinación de semillas de *Gynoxys verrucosa*