



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Determinación de un método eficiente para la germinación *in vitro* de semillas de *Zapoteca aculeata*

Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previa a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través De la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Michelle Estefanía Yugcha Yugcha

Tutor: PhD. José Homero Vargas López

Ambato – Ecuador

Septiembre - 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. José Homero Vargas López

CERTIFICA

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 11 de agosto del 2022

.....

PhD. José Homero Vargas López

C.I. 1801978048

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Michelle Estefanía Yugcha Yugcha, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyectos de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



Michelle Estefanía Yugcha Yugcha

180412496-2

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

.....
Presidente de Tribunal

.....
PhD. Liliana Paulina Lalaleo Córdova
C.I. 180360185-3


.....
Dra. Helena Maritza de la Torre Olvera
C.I. 130965199-8

Ambato, 06 de septiembre del 2022

DERECHOS DEL AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final de Integración Curricular, o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....

Michelle Estefanía Yugcha Yugcha

180412496-2

AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres Ángel y Magdalena, por ser el pilar fundamental de mi vida, por su infinito amor, por las palabras de ánimo y empuje a la tenacidad que resuenan en mis oídos y por su apoyo incondicional en cada paso que doy.

A mis hermanas, Joselyn y Alexandra por su cariño, por siempre estar en los buenos y malos momentos de mi vida y ser mi ejemplo para no rendirme y seguir cumpliendo mis metas.

Con mucho amor Michelle

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por brindarme salud, vida y darme las fuerzas necesarias para salir adelante permitido alcanzar esta gran meta en mi vida

Quiero agradecer a mis padres por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, este logro es el fruto de todo el esfuerzo que han hecho por mí siempre.

A mis hermanas por brindarme su apoyo en cada etapa de mi vida y sus consejos.

A mi apreciado tutor Dr. Homero Vargas por su guía y ayuda durante todo este proceso de titulación.

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología y sus docentes por haberme formado académicamente para convertirme en una gran profesional.

A mis amigos y futuros colegas Christopher, Dome, Marco y Yonayker, por su amistad infinita, por extender su mano en momentos difíciles y por todos los momentos que compartimos a lo largo de nuestra formación profesional

A mi mejor amiga Vane por sus ocurrencias, locuras, apoyo y consejos.

Muchas gracias, los quiero mucho Michelle

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	III
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	IV
DERECHOS DEL AUTOR.....	V
DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMIENTOS.....	VII
ÍNDICE GENERAL.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.2 Especies vegetales nativas en peligro de extinción y sus causas.....	1
1.1.2.1 Especies amenazadas en Ecuador.....	1
1.1.3 Género <i>Zapoteca</i> H.M. Hern.....	2
1.1.4 Información botánica.....	3
1.1.4.1 <i>Zapoteca</i> . H.M. Hern.....	3
1.1.4.2 <i>Z. aculeata</i>	4
1.1.4.3 Características de la semilla.....	4
1.1.5 Germinación.....	5
1.1.5.1 Latencia de las semillas.....	6

1.1.6	Métodos pregerminativos	6
1.1.6.1	Lixiviación	6
1.1.6.2	Tratamiento con hormonas.....	7
1.1.6.3	Escarificación.....	7
1.1.7	Cultivo <i>in vitro</i>	8
1.1.7.1	Propagación por semilla.....	8
1.2	OBJETIVOS	10
1.2.1	Objetivo General.....	10
1.2.2	Objetivos específicos	10
2.1	Materiales, equipos y reactivos	11
2.1.1	Materiales de laboratorio	11
2.1.2	Equipos de laboratorio	11
2.1.3	Reactivos.....	12
2.1.4	Insumos de laboratorio.....	12
2.1.5	Materiales de escritorio.....	13
2.2	Metodología	13
2.2.1	Recolección de material vegetal	13
2.2.2	Cosecha de vainas.....	13
2.2.3	Tratamientos de desinfección	14
2.2.4	Tratamientos pregerminativos de la semilla	14
2.2.5	Siembra de semillas	15
2.2.6	Evaluación del porcentaje y tiempo de la germinación de la semilla de <i>Z. aculeata</i>	15
2.2.7	Caracterización del desarrollo de la semilla de <i>Zapoteca aculeata</i>	16
2.2.8	Diseño experimental	16

2.2.9 Características del experimento	17
2.2.10 Tipo de Diseño Experimental	18
2.2.11 Análisis estadístico	18
3.1 Análisis y Discusión de resultados.....	19
3.1.1 Porcentaje de contaminación de las semillas en la etapa de desinfección	19
3.1.2 Evaluación del tiempo de la germinación de la semilla.....	23
3.1.3 Evaluación del porcentaje la germinación de la semilla.....	23
3.1.4 Caracterización del desarrollo de la semilla de <i>Z. aculeata</i>	27
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
4.1 Conclusiones	29
4.2 Recomendaciones.....	30
REFERENCIAS BIBLIOGRFICAS.....	31
ANEXOS	43
ANEXO A. Análisis estadística ANOVA y prueba de Tukey para a variable porcentaje de germinación.....	43
ANEXO B. Análisis estadística ANOVA y prueba de Tukey para a variable porcentaje de germinación.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales de Laboratorio	11
Tabla 2. Equipos de laboratorio	11
Tabla 3. Reactivos	12
Tabla 4. Insumos de laboratorio.....	12
Tabla 5. Materiales de laboratorio	13
Tabla 6. Descripción de los tratamientos de desinfección a realizar en el experimento	14
Tabla 7. Descripción de los tratamientos a realizar en el experimento.....	15
Tabla 8. Diseño experimental del proyecto de investigación	16
Tabla 9. Combinaciones de los respectivos tratamientos.....	17
Tabla 10. Análisis de varianza para la variable días de germinación	43
Tabla 11. Prueba de significación de tukey al 5% para métodos pregerminativos en la variable días de germinación.....	43
Tabla 12. Análisis de varianza para la variable porcentaje de germinación	44
Tabla 13. Prueba de significación de tukey al 5% para métodos de desinfección en la variable porcentaje de germinación	44
Tabla 14. Prueba de significación de tukey al 5% para métodos pregerminativos en la variable porcentaje de germinación	44
Tabla 15. Prueba de significación de tukey al 5% para métodos pregerminativos*métodos de desinfección en la variable porcentaje de germinación	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parámetros evaluados en la etapa de desinfección de semillas. A. Hongos; B. Óxidos muertos; C. Óxidos potenciales; D. Viabiles.....	19
Figura 2. Porcentaje (%) promedio de contaminación en las semillas tratadas con dos métodos de desinfección en 6 métodos pregerminativos.	20
Figura 3. Porcentaje (%) promedio de óxidos muertos en las semillas tratadas con dos métodos de desinfección en 6 métodos pregerminativos.	21
Figura 4. Porcentaje (%) promedio de óxidos viables en las semillas tratadas con dos métodos de desinfección en 6 métodos pregerminativos.	22
Figura 5. Porcentaje (%) promedio de semillas viables tratadas con dos métodos de desinfección en 6 métodos pregerminativos.	22
Figura 6. Días de germinación de las semillas tratadas con 6 métodos pregerminativos	23
Figura 7. Porcentaje (%) promedio de germinación en las semillas tratadas con 6 métodos pregerminativos.	25
Figura 8. Porcentaje (%) promedio de germinación en las semillas tratadas con dos métodos de desinfección.	26
Figura 10. Desarrollo del proceso de germinación de las semillas de <i>Z. aculeata</i> . Fase germinativa: A. Hinchazón de la semilla; B. Aparición de la radícula. Fase de plántula; C. Eje radícula-hipocótilo. R =radícula, Hp = hipocótilo	28

RESUMEN

Las especies endémicas a menudo se encuentran entre las más sensibles a los cambios y perturbaciones ambientales y, por lo tanto, en mayor riesgo de extinción. Para solucionar este problema la germinación *in vitro* de semillas es un método adecuado para propagar especies de plantas amenazadas para su conservación. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar un método eficiente para la germinación *in vitro* de semillas de *Zapoteca aculeata*. Primero, se aplicó dos tratamientos de desinfección a las semillas para calcular el porcentaje de contaminación. Luego, se aplicó seis tratamientos pregerminativos a las semillas para evaluar el porcentaje y tiempo de germinación. Finalmente se caracterizó el proceso de germinación de la semilla. En cada etapa se eligió al tratamiento que dio el mejor porcentaje de germinación mediante el análisis de varianza para verificar estadísticamente la diferencia significativa de los tratamientos y las diferencias significativas entre los grupos evaluados se valoraron mediante la prueba de Tukey. Se obtuvo los mejores resultados con la desinfección D1 alcanzando un porcentaje de germinación de 27.08 por ciento, esto se debe a la concentración y el tiempo de exposición de las semillas en las soluciones desinfectantes. Con el método pregerminativo T2 se obtuvo un porcentaje de germinación de 46.25 por ciento y fueron las semillas más tempranas en germinar, tardando 17,4 días. Por lo que se recomienda usarlo en investigaciones futuras debido a que no existe información en la literatura científica con respecto a trabajos de investigación para la germinación de semillas de *Z. aculeata*

Palabras clave: germinación *in vitro*, plantas ornamentales, *Z. aculeata*, botánica, biotecnología vegetal.

ABSTRACT

Endemic species are often among the most sensitive to environmental changes and disturbances and therefore most at risk of extinction. To solve this problem, *in vitro* seed germination is a suitable method to propagate threatened plant species for conservation. The present work aimed to determine an efficient method for *in vitro* germination of *Zapoteca aculeata* seeds. First, two disinfection treatments were applied to the seeds to calculate the percentage of contamination. Then, six pre-germination treatments were applied to the seeds to evaluate the percentage and time of germination. Finally, the seed germination process was characterised. At each stage, the treatment that gave the best germination percentage was chosen using analysis of variance to statistically verify the significant difference of the treatments and the significant differences between the evaluated groups were evaluated using Tukey's test. The best results were obtained with disinfection D1, reaching a germination percentage of 27.08 percent, this is due to the concentration and exposure time of the seeds in the disinfectant solutions. With the pre-germinative method T2 a germination percentage of 46.25 percent was obtained and the seeds were the earliest to germinate, taking between 17.4 days. Therefore, it is recommended to use it in future research because there is no information in the scientific literature regarding research work on the germination of *Z. aculeata* seeds.

Key words: *in vitro* germination, ornamental plants, *Z. aculeata*, botany, plant biotechnology.

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

1.1.1 Generalidades

La degradación de los ecosistemas ha llegado a los rincones más lejanos de nuestro planeta, desde nuestras preciosas selvas tropicales hasta nuestros invaluable arrecifes. Las actividades humanas irresponsables han causado y exacerbado nuestra crisis climática y la degradación de los ecosistemas, obligándonos a hacer frente a la pérdida de biodiversidad, la destrucción del hábitat, los fenómenos meteorológicos dramáticos y más. Un informe reciente de la ONU encontró que las acciones humanas han alterado significativamente el 75% de la superficie terrestre de nuestro planeta y han llevado a un aumento en la tasa de pérdida de biodiversidad sin precedentes en la historia humana; en relación con las plantas, esto ha resultado en una desaparición del 40% de las especies que se encuentran en peligro de extinción (**Breman et al., 2021**). Muchas de estas son endémicas, por lo tanto, únicas, y a menudo solo unas pocas y pequeñas poblaciones silvestres resisten (**Sarasan et al., 2006**). Las especies endémicas son un componente importante de la administración de la biodiversidad y el capital natural de un país (**Darbyshire et al., 2019**). A menudo estas especies se encuentran entre las más sensibles a los cambios y perturbaciones ambientales y, por lo tanto, en mayor riesgo de extinción (**Burlakova et al., 2011**).

Para solucionar este problema la germinación *in vitro* de semillas es un método adecuado para propagar las especies de plantas amenazadas para su conservación, con el fin de mantener la variabilidad genética de las plantas (**Utami & Hariyanto, 2019**).

1.1.2 Especies vegetales nativas en peligro de extinción y sus causas

La preservación de especies nativas es una preocupación importante en un contexto mundial. Entre las principales causas de la pérdida de plantas endémicas, suele estar

relacionada con la destrucción y alteración de sus hábitats, como consecuencia de la sobreexplotación humana y más recientemente de la contaminación y los cambios climáticos, que conducen a la pérdida de la diversidad genética **(Hyvärinen, 2020)**.

Una especie endémica se puede definir como una especie que ocurre de forma natural y exclusiva, y que está altamente adaptada a un área geográfica específica **(Behroozian et al., 2020)**. En la mayoría de las especies endémicas se puede encontrar un conjunto de características, que las hacen más vulnerables a las amenazas antropogénicas o cambios naturales: distribución restringida, una o pocas poblaciones, tamaño de población pequeño, tamaño de población en declive, exceso de recolección por humanos, poca capacidad de reproducción, condiciones de hábitat específicas y necesidad de ambientes estables y constantes **(İşik, 2011)**. Cuantas más de estas características muestren estas especies, más vulnerables serán a la extinción. Por lo tanto, las especies endémicas deben ser monitoreadas y manejadas cuidadosamente, y su conservación debe considerarse una prioridad mundial **(Coelho et al., 2020)**.

1.1.2.1 Especies amenazadas en Ecuador

La protección de plantas amenazadas en el Ecuador es un gran reto, debido a la escases de información y la forma de conservación de especies en peligro de extinción **(León-Yáñez et al., 2011)**

De acuerdo con el “Libro Rojo de plantas endémicas del Ecuador” el 78% (3508), de especies endémicas del Ecuador están amenazadas; el 46% (2080) se consideran Vulnerables (VU), el 24% (1071) En Peligro (EN) y el 8% (353) En Peligro Crítico (CR) **(León-Yáñez et al., 2012)**.

La principal amenaza para la conservación de la biodiversidad en Ecuador es la deforestación, de acuerdo con la **FAO, (2020)** Ecuador mantuvo las tasas de deforestación más altas de América Latina con una deforestación general de 21,340 km² entre 1990 y 2020. Además, la recolección de leña, la expansión urbana, la exploración y explotación de petróleo, la agricultura, la minería, la pesca, la sobreexplotación de los recursos naturales, el desarrollo turístico y las especies

introducidas son otros aspectos importantes que contribuyen al deterioro de la riqueza biológica del país (**Tapia-Armijos et al., 2015; Velasco, 2001**). En contexto, la rápida desaparición de la vegetación endémica en el Ecuador ha evidenciado la urgente necesidad de poner en marcha proyectos de gestión sostenible para especies en peligro de extinción.

De acuerdo con **León-Yáñez, 2019 & Vargas et al., (2000)** *Zapoteca aculeata*, se enfrenta al riesgo de desaparición en un futuro próximo a causa de su distribución natural y la deforestación. Se encuentra catalogada dentro del “Libro Rojo de plantas endémicas del Ecuador”, como especie en peligro de extinción por pérdida de hábitat, debido a que las poblaciones naturales conocidas de esta especie se encuentran ubicadas en las faldas del volcán Tungurahua, estando en constante presión como consecuencia del proceso de erupción volcánica (**Vargas et al., 2000**). Las poblaciones silvestres de esta especie han disminuido drásticamente y solo subsisten unos pocos ejemplares en los encañonados de los ríos de Tungurahua (**Bustamante & Zalles, 2020**).

1.1.3 Género *Zapoteca* H.M. Hern.

El género *Zapoteca* H.M.Hern pertenece a la familia Fabaceae, siendo la tercera familia más grande de angiospermas con 770 géneros y más de 19,500 especies en todo el mundo (**Abusaief & Boasoul, 2021**). Esta familia incluye una variedad de plantas con gran importancia agrícola y económica. Se encuentra distribuida en regiones templadas y tropicales del mundo, variando su forma de crecimiento, desde hierbas anuales hasta grandes árboles (**Fernández-Marín et al., 2017**). Además, esta familia de plantas tiene varias funciones ecológicas importantes como; la fijación de nitrógeno atmosférico a través de asociaciones simbióticas con bacterias (**Andrews & Andrews, 2017**), y la provisión de alimentos altamente nutritivos para animales. La familia Fabaceae se ha clasificado tradicionalmente en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Papilionoideae y Mimosoideae (**Borges et al., 2013**).

1.1.4 Información botánica

1.1.4.1 *Zapoteca*. H.M. Hern

Se ubica dentro de la subfamilia Mimosoideae representada por árboles y distribuida especialmente en los bosques tropicales secos (**Duno & Cetzal-IX, 2017**). Se caracteriza por comprender principalmente arbustos con una altura de 3 a 4 metros. Poseen tallos leñosos y se distinguen por tener hojas estipuladas bipinnadas. Otra característica representativa es que contienen inflorescencias axilares con atractivos florales densamente ensambladas, cada una con 30 a 60 estambres con filamentos largos, de colores llamativos como; blancos, rosados, morados o bicolors (**Ferm, 2019**).

En Ecuador se han registrado 4 especies de *Zapoteca* H.M. Hern. distribuidas en los bosques andinos del país, desde los 1600 hasta 2800 m., estas son: *Z. andina*, *Z. caracasana*, *Z. tetragona*, y *Z. aculeata* siendo esta endémica del país (**Lewis & Klitgaard, 2002**). Según **Tropicos.org**, (**2018**) se encuentran clasificadas de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Mimosoideae

Género: *Zapoteca* H.M. Hern.

Especie: *andina*, *caracasana*, *tetragona*, y *aculeata*

1.1.4.2 *Z. aculeata*

Esta especie es endémica de la provincia de Tungurahua (**León-Yáñez, 2019**), llega a medir hasta 10 metros de altura. Se caracteriza por poseer hojas con folíolos coriáceos (textura de la hoja dura y flexible similar al cuero) y tener estípulas espinescentes de tamaño mediano (**Ferm, 2019**). Esta especie de árbol posee atractivos florales con inflorescencias en las cabezuelas con numerosos estambres rojizos o púrpuras (**Villavicencio, 2013**). Debido a esta peculiaridad, esta especie arbórea perennifolia poco conocida, tiene importantes propiedades ornamentales, pues representa un componente florístico único en el mundo (**Vargas et al., 2000**).



Figura 1. *Zapoteca aculeata* (**Ferm, 1969**).

1.1.4.3 Características de la semilla

Las semillas son duras y están dispuestas en serie protegidas dentro de vainas. Las vainas son secas y planas con márgenes engrasadores y dehiscentes explosivos desde el ápice hasta la base con valvas recurvadas (**Hernandez, 1989**).

En las semillas de algunos miembros de las subfamilias Fabaceae Mimosoideae está presente una estructura visiblemente demarcada llamada línea fisural, ubicada en la región lateral de la cubierta de la semilla (**Rodrigues Junior et al., 2019**). La línea fisural tiene una importancia funcional porque crea una amplia abertura, que permite

que el agua puede llegar al embrión e iniciar la germinación (**Rodrigues-Junior et al., 2021**).

1.1.5 Germinación

La germinación de semillas es el primer paso para establecer una planta. El proceso de germinación de semillas se clasifica en tres fases: (1) fase de imbibición (absorción de agua), (2) fase de retraso (metabolismo de reservas) y (3) protrusión radicular (**Nonogaki & Nonogaki, 2017**). En términos fisiológicos, la germinación es un proceso de dos etapas, donde la ruptura de la testa es seguida por la ruptura del endospermo. Finalmente emerge la radícula y la germinación está completa (**Bentsink & Koornneef, 2008**).

La semilla de *Zapoteca* H.M. Hern. se caracteriza por presentar una germinación epigea, que es común en la familia Fabaceae-Mimosoideae (**De Oliveira et al., 2014**). La germinación epigea, es calificada como rápida y sincrónica, en este tipo de germinación el hipocótilo comienza alargarse distanciando a los cotiledones del suelo, a continuación, surgen las hojas cotiledonarias que realizan funciones fotosintéticas durante el crecimiento temprano de la plántula (**Del Amo Rodríguez et al., 2002**).

La capacidad de las semillas para germinar fácilmente cuando las condiciones son adecuadas y evitar la germinación en momentos inapropiados son esenciales para la supervivencia de una especie (**Matilla, 2016**). Según **Doria, (2010)** se requieren tres condiciones para iniciar la germinación:

1. La semilla debe ser viable
2. La latencia de la semilla debe ser superada
3. La semilla debe estar sujeta a las condiciones ambientales apropiadas: agua disponible, temperatura adecuada, suministro de oxígeno y ausencia o presencia de luz.

1.1.5.1 Latencia de las semillas

La latencia de la semilla se ha definido como la incapacidad de una semilla viable para germinar en condiciones favorables (**Bentsink & Koornneef, 2008b**).

Para terminar el estado de latencia se requiere en determinados casos, estímulos ambientales, como luz o bajas temperaturas. En otros casos, la formación de una barrera dura y gruesa alrededor de la semilla impide el intercambio de gases y el paso de agua o ejercen una resistencia física a la prolongación de la radícula, que provoca latencia física y les impide germinar aun cuando las condiciones ambientales son favorables (**Bareke, 2018**).

Las semillas que presentan esta llamada "latencia física" como es el caso de los miembros de las subfamilias Fabaceae Mimosoideae que se caracterizan por presentar testa dura, condición que inhibe temporalmente la germinación (**Zapata et al., 2017**). A menudo requieren de métodos como la escarificación, el agrietamiento de la cubierta de la semilla, la eliminación de inhibidores químicos mediante la lixiviación con agua, etc., con el propósito de romper la barrera y promover la germinación (**Penfield, 2017**).

1.1.6 Métodos pregerminativos

El objetivo de los tratamientos pregerminativos es romper la latencia de las semillas para mejorar la tasa de germinación, asegurando al mismo tiempo el desarrollo exitoso de las plántulas (**Varela & Arana, 2011**).

Existen diversos tratamientos pregerminativos, los siguientes son los métodos más empleados:

1.1.6.1 Lixiviación

Este método consiste en remover los inhibidores químicos presentes en la cubierta de la semilla, mediante el remojo en agua fría o caliente. El tiempo de remojo varía entre 12 a 72 horas (**Varela & Arana, 2011**). Sumergir las semillas en agua ablanda las

cubiertas duras de las semillas, lo que las hace permeables al agua y puedan germinar (**Missanjo et al., 2013**).

1.1.6.2 Tratamiento con hormonas

La germinación de las semillas se puede estimular mediante la aplicación de fitohormonas producidas artificialmente o por medios naturales. Las giberelinas son un grupo de reguladores del crecimiento de las plantas que desempeñan un papel importante en la regulación de la germinación de las semillas y la interrupción de la latencia (**Guney et al., 2016**). La germinación de semillas puede requerir giberelinas para: la activación del crecimiento vegetativo del embrión y el debilitamiento de la capa de endospermo, que limita el crecimiento que rodea al embrión y la movilización de las reservas de alimentos almacenados en el endospermo (**Miransari & Smith, 2014**).

El ácido giberélico (GA_3) es una fitohormona natural que promueve el crecimiento celular y es fundamental para romper la latencia y desencadenar la germinación. En las semillas, el GA_3 induce la imbibición y la división celular mitótica pero su acción es contrarrestada por el ácido abscísico (ABA), una fitohormona que promueve la latencia e inhibe la germinación. El aumento de la concentración de GA_3 en los tejidos de las semillas puede superar la inhibición de ABA e inducir la germinación o acortar la latencia para algunas especies, especialmente aquellas con latencia física (**Tuan et al., 2019**).

1.1.6.3 Escarificación

Entre los métodos utilizados para romper la latencia del tegumento, se suele utilizar la escarificación por ser simple, eficaz y de bajo costo. Sin embargo, esta técnica debe realizarse con cuidado para evitar dañar los tejidos vitales de la semilla (**Martins et al., 2012**).

La escarificación de las semillas, es un procedimiento que permite romper, ablandar, alterar mecánicamente o rayar la envoltura de la semilla sin disminuir su calidad. De

tal manera que las semillas sean permeables al agua y a los gases, lo que facilita y acelerará automáticamente la germinación de las semillas **(Gutiérrez et al., 2011)**.

La escarificación química es un método para derretir la cubierta de la semilla y ablandar la semilla dura. La efectividad de la escarificación química depende de la concentración de ácido, la duración de la escarificación y las especies. El ácido sulfúrico es el químico más popular y eficaz para reducir la dureza de las semillas de la familia Fabaceae **(Kimura & Islam, 2012)**.

1.1.7 Cultivo *in vitro*

En la actualidad, el método de cultivo *in vitro* se utiliza ampliamente para resolver los problemas de preservación y restauración del acervo genético de especies vegetales poco comunes y en peligro de extinción **(Chokheli et al., 2020)**. La tecnología de cultivo de tejidos vegetales se está utilizando ampliamente para la multiplicación de plantas a gran escala. Además de su uso como herramienta de investigación, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han adquirido en los últimos años una gran importancia industrial en el área de la propagación de plantas, la eliminación de enfermedades, la mejora de plantas y la producción de metabolitos secundarios **(García-González et al., 2010)**.

Pequeños fragmentos de tejido (llamados explantes) se puede utilizar para producir cientos y miles de plantas en un proceso continuo. Un solo explante se puede multiplicar en varios miles de plantas en un período de tiempo y espacio relativamente cortos bajo condiciones controladas, independientemente de la estación y el clima durante todo el año. Las especies en peligro de extinción, amenazadas y raras se han cultivado y conservado con éxito mediante la micropropagación debido al alto coeficiente de multiplicación y las pequeñas demandas de número de plantas iniciales y espacio **(Soumare et al., 2021)**.

1.1.7.1 Propagación por semilla

La germinación *in vitro* de semillas es un método ideal para obtener material vegetal joven y superficialmente estéril para el posterior establecimiento de protocolos de

propagación *in vitro*, necesarios para la explotación prevista de plantas autóctonas a través de medios biotecnológicos. Las plántulas obtenidas *in vitro* son de gran importancia ya que se utilizan directamente para otros experimentos de cultivo de tejidos sin ningún tipo de esterilización (**Koné et al., 2015; Sorokin et al., 2021**).

La información detallada sobre los patrones de germinación de las semillas es importante no sólo para el cultivo exitoso de las plantas, sino también para comprender el establecimiento de las especies vegetales y su tolerancia a los factores de estrés abióticos (**Hu et al., 2018**).

La propagación *in vitro* por semillas, es una herramienta que ofrece grandes ventajas: obtener plantas libres de enfermedades; transportar material vegetal libre de enfermedades; germinación de semillas que de forma natural es dificultoso de realizar; conservar la variación genética; almacenar material vegetal en bancos de genes donde pueda mantenerse libre de enfermedades en condiciones que limiten el crecimiento y el desarrollo (**Zurita-Valencia et al., 2014**).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Determinar un método eficiente para la germinación *in vitro* de semillas de *Zapoteca aculeata*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el porcentaje y tiempo de germinación de la semilla de *Zapoteca aculeata* aplicando diferentes métodos de desinfección y pregerminativos.
- Caracterizar el proceso de germinación de la semilla de *Zapoteca aculeata*.
- Establecer el método óptimo para la obtención del mayor porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *Zapoteca aculeata*

CAPITULO II
METODOLOGÍA

2.1 Materiales, equipos y reactivos

2.1.1 Materiales de laboratorio

Tabla 1. Materiales de Laboratorio

Detalle	Cantidad
Frascos de vidrio	12
Matraces de varios volúmenes	3
Probetas volumétricas	3
Micropipetas de varias capacidades	3
Puntas de varias capacidades	3
Pipeteador manual	1
Mechero de alcohol	2
Pipetas graduadas	3
Cajas Petri	24

2.1.2 Equipos de laboratorio

Tabla 2. Equipos de laboratorio

Detalle	Cantidad
Autoclave	1
Plancha de calentamiento	1
Balanza analítica	1

Termómetro	3
Cámara de flujo	1
Microscopio óptico	1
Incubadora	1

2.1.3 Reactivos

Tabla 3. Reactivos

Detalle	Cantidad
Agua destilada	1 litro
Hipoclorito de sodio al 5.5 %	30 ml
Hipoclorito de sodio al 7 %	30 ml
Hipoclorito de sodio (NaOH)	60 ml
Alcohol etílico 70%	50 ml
Ácido giberélico 100 mg/L	25 ml
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 98%	25 ml

2.1.4 Insumos de laboratorio

Tabla 4. Insumos de laboratorio

Detalle	Cantidad
Guantes de nitrilo	1 caja
Papel filtro	1 rollo
Cinta adhesiva	1 unidad
Frascos de vidrio	1 paquete

Alcohol antiséptico	2 unidades
---------------------	------------

2.1.5 Materiales de escritorio

Tabla 5. Materiales de laboratorio

Detalle	Cantidad
Computadora	1
Calculadora	1
Esfero y lápiz	2 unidades
Cuaderno	1
Rotuladores	2

2.2 Metodología

2.2.1 Recolección de material vegetal

Las semillas se recolectaron del Jardín Botánico Atocha-La Liria (Ambato). Se elaboraron pequeñas bolsas que se colocaron en las vainas de los árboles de *Z. aculeata* debido a que esta especie tiene vainas dehiscentes explosivos. Se seleccionaron los mejores frutos con mejor apariencia fenotípica y libres de plagas. Las bolsas se ubicaron en el fruto con la ayuda de una escalera. Para elaborar las bolsas se usaron los siguientes materiales: malla anti-áfidos, elástico para asegurar la malla, tijera, hilo y aguja (para coser la malla).

2.2.2 Cosecha de vainas

Se estimó el periodo de maduración de las semillas, y se procedió a organizar expediciones de recolección para las vainas. Se retiraron las bolsas de los árboles que contenían las semillas y se colocaron en frascos de vidrio para su traslado a los laboratorios de la Universidad Técnica de Ambato.

2.2.3 Tratamientos de desinfección

La desinfección se realizó en frascos de vidrio, se colocarán 40 semillas en cada frasco, y se enjuagaron con solución de agua jabonosa con el fin de retirar la tierra de las semillas. Se usó dos métodos de desinfección, variando la concentración de las soluciones desinfectantes y el tiempo de exposición como se muestra en la **Tabla 6**. Después de colocar cada solución desinfectante se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril con permanencia durante 1 minuto.

Todos los procesos de desinfección se realizaron dentro de la cámara de flujo laminar. Se usaron un total de 480 semillas divididas en dos tratamientos desinfectantes.

Tabla 6. Descripción de los tratamientos de desinfección a realizar en el experimento

Soluciones desinfectantes	Desinfección 1	Desinfección 2
	Tiempo (min)	Tiempo (min)
Alcohol etílico 70%	1	0.5
Hipoclorito de sodio al 5.5 %	15	-
Hipoclorito de sodio al 7 %	-	30
	Minchala-Patiño et al.	Koné et al.
	(2014)	(2015)

Nota: (-) ausencia de solución desinfectante.

En esta fase se evaluaron los siguientes parámetros de contaminación: bacteria, hongo, oxidados potenciales, oxidados muertos y viables. Se calculó el porcentaje de contaminación, que se realizó contabilizando el número de semillas las cuales se dividieron para el total de semillas totales y se multiplica por cien.

2.2.4 Tratamientos pregerminativos de la semilla

Se utilizaron 240 semillas divididas en seis tratamientos como se detalla en **Tabla 7**, y a su vez se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento.

Tabla 7. Descripción de los tratamientos a realizar en el experimento

Tratamiento	Descripción	Tiempo de inmersión de las semillas	Numero de semillas	Referencia
Control	Siembra de semilla sin ningún tratamiento	-	10	-
T1	Remojo en agua caliente a 70 °C	1min	10	Seng & Cheong (2020)
T2	Remojo en ácido giberélico 100 mg/L	24h	10	Luera et al. (2021)
T3	Remojo en ácido sulfúrico al 98%	30min	10	Boeri et al. (2019)
T4	Remojo en ácido clorhídrico al 50%	15min	10	(Jaganathan et al., 2019)
T5	Estratificación a 4°C	48h	10	(Long et al., 2012)

Nota: (-) ausencia de tratamiento pregermiantivo.

2.2.5 Siembra de semillas

Las semillas (10) se colocaron uniformemente con la ayuda de una pinza quirúrgica esterilizada por calor con un mechero, sobre algodón esterilizado saturado con agua destilada estéril en cajas Petri (12 cm). Una vez colocado las semillas se selló con cinta para film. El algodón se humedeció cada tres días para garantizar una humedad uniforme. Las cajas Petri se mantuvieron en condiciones de 16h luz y 8 h de oscuridad a una temperatura de a 22 °C (**Boeri et al., 2019**). El experimento se repitió 4 veces con 10 semillas por cada tratamiento.

2.2.6 Evaluación del porcentaje y tiempo de la germinación de la semilla de *Z. aculeata*

Las variables evaluadas fueron: días a germinación y porcentaje de germinación;

Días de germinación: se contabilizaron los días transcurridos desde la siembra, hasta que no hubo más germinación de las semillas. Se considero una semilla germinada, cuando está presentó un crecimiento de la radícula de ≥ 2 mm, de largo (**Garduza-Acosta et al., 2019**).

Porcentaje de germinación: se calculó contando las semillas germinadas en relación a las semillas sembradas inicialmente en el experimento. Mediante el método descrito por la ecuación (Seng & Cheong, 2020a):

$$PG = \frac{N}{NS} \times 100$$

donde N: número de semillas germinadas, y NS: número de semillas sembradas.

2.2.7 Caracterización del desarrollo de la semilla de *Zapoteca aculeata*

El desarrollo de las semillas se evaluó cada dos días durante un periodo de 8 semanas, considerando que las semillas germinadas mostraron la emergencia de la radícula libre de la cubierta de la semilla (Seng & Cheong, 2020b).

Para caracterizar el desarrollo de la semilla se tomaron en cuenta dos fases. La primera fase la germinativa, donde se consideró desde la hinchazón de la semilla hasta la aparición de la radícula. La segunda fase de plántula, se consideró desde el crecimiento de eje radícula-hipocótilo hasta la liberación del tegumento y formación del epicótilo (Cunha et al., 2020).

La observación se realizó mediante un microscopio compuesto.

2.2.8 Diseño experimental

Se detalla los tratamientos utilizados (Tabla 6 y Tabla 7). Las variables de estudio en este caso son los tratamientos pregerminativos con 6 niveles y tratamientos de desinfección con 2 niveles, considerando que estos son el resultado de la combinación de los factores de estudio anteriormente citados.

Tabla 8. Diseño experimental del proyecto de investigación

Factores	Código	Niveles
Métodos pregerminativos	T	T0
		T1

		T2
		T3
		T4
		T5
Métodos de desinfección	D	D1
		D2

2.2.9 Características del experimento

Tabla 9. Combinaciones de los respectivos tratamientos

Número de tratamientos	Código	Tratamiento pregerminativo	Desinfección
1	T ₀ D ₁	Control	D1
2	T ₀ D ₂	Control	D2
3	T ₁ D ₁	Remojo en agua caliente a 70 °C	D1
4	T ₁ D ₂	Remojo en agua caliente a 70 °C	D2
5	T ₂ D ₁	Remojo en ácido giberélico 100 mg/L	D1
6	T ₂ D ₂	Remojo en ácido giberélico 100 mg/L	D2
7	T ₃ D ₁	Remojo en ácido sulfúrico al 98%	D1
8	T ₃ D ₂	Remojo en ácido sulfúrico al 98%	D2
9	T ₄ D ₁	Remojo en ácido clorhídrico al 50%	D1
10	T ₄ D ₂	Remojo en ácido clorhídrico al 50%	D2
11	T ₅ D ₁	Estratificación a 4°C	D1
12	T ₅ D ₂	Estratificación a 4°C	D2

2.2.10 Tipo de Diseño Experimental

Se aplicó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) ($T \times D$) que suman 12 tratamientos con 4 repeticiones por tratamiento, considerando cada caja Petri como la unidad experimental.

2.2.11 Análisis estadístico

El porcentaje de germinación (GP) y los días de germinación (DG), se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) para verificar estadísticamente la diferencia significativa de los tratamientos y las diferencias significativas entre los grupos evaluados se valoraron mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

CAPITULO III

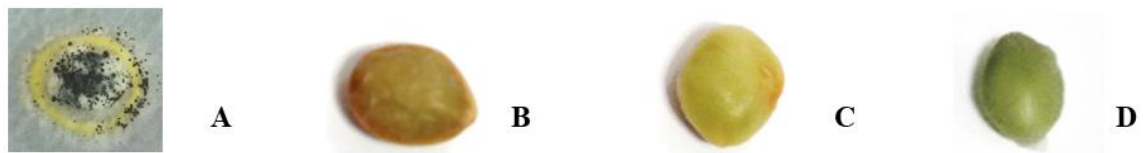
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y Discusión de resultados

3.1.1 Porcentaje de contaminación de las semillas en la etapa de desinfección

Para determinar el mejor tratamiento de desinfección se evaluaron los siguientes parámetros (**Figura 1**) en cada método de desinfección. Las semillas fueron clasificadas de acuerdo a las características que mostraron después de aplicar la desinfección.

Figura 1. Parámetros evaluados en la etapa de desinfección de semillas. **A.** Hongos; **B.** Óxidos muertos; **C.** Óxidos potenciales; **D.** Viables.



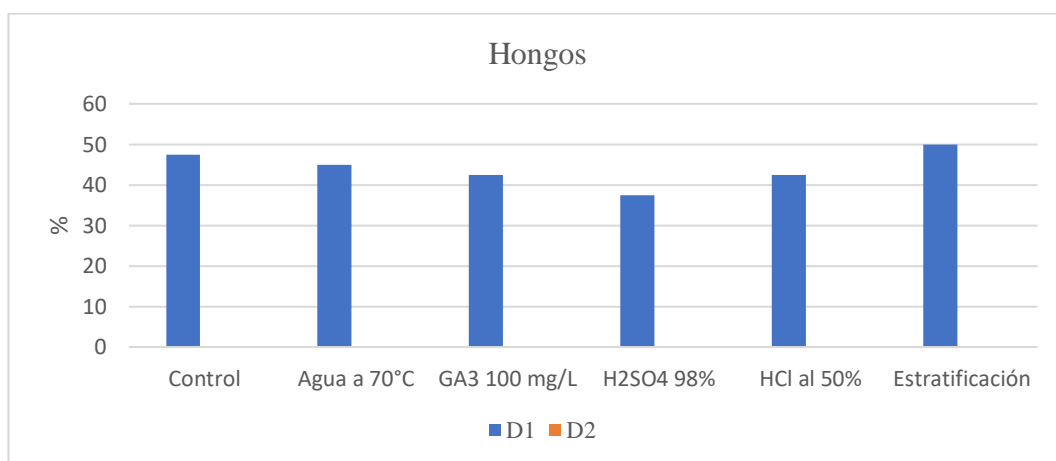
La obtención de semillas estériles de alta calidad se ve afectada por varios factores, como el tipo de desinfectante, el tiempo de duración de la esterilización, el pH del medio, etc. (Si et al., 2022). Se ha informado que las semillas recogidas en el campo y almacenadas de forma inadecuada suelen estar gravemente infectadas por diversos hongos, en contraste con las semillas almacenadas en un entorno controlado (Ahmadi et al., 2012). Por lo tanto, la germinación *in vitro* de semillas muy contaminadas constituye un reto especial, sobre todo cuando el suministro de semillas es limitado (Alatar et al., 2017).

En este estudio se observó el efecto tanto del método de desinfección sobre el porcentaje de contaminación por bacterias, hongos, óxidos potenciales, óxidos muertos y viables (**Figuras 2, 3, 4 y 5**). Las semillas desinfectadas con el método 1 presentaron porcentajes altos de contaminación por hongos con valores de hasta el 50% frente a la desinfección 2 que no presentó contaminación. Esto se debe a que las concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) superiores al 7% e inferiores al 40%

garantiza una esterilización eficaz incluso de los lotes de semillas muy contaminados. (Mekonnen et al., 2013; Wang et al., 2018).

No hubo presencia de bacterias en la unidad experimental, según Davoudpour et al., (2020) los tratamientos con etanol al 70% combinado con hipoclorito de sodio podrían reducir el número de semillas que muestran crecimiento microbiano (al 50 %) en comparación con otros tratamientos (100 %). Una posible explicación podría ser la formación de cloraminas oxidantes a partir de NaClO pueden reaccionar con los componentes celulares al ingresar a la membrana celular y prevenir el crecimiento microbiano (Miche & Balandreau, 2001). Sin embargo, el tratamiento D1 no fue eficiente en el control de la contaminación fúngica, corroborando con Aziz et al., (2018), quienes observaron que las semillas de *Mucuna bracteata* tratadas con Clorox® (producto comercial con 5,25% p/v de NaClO) presentaron un alto porcentaje de semillas contaminadas.

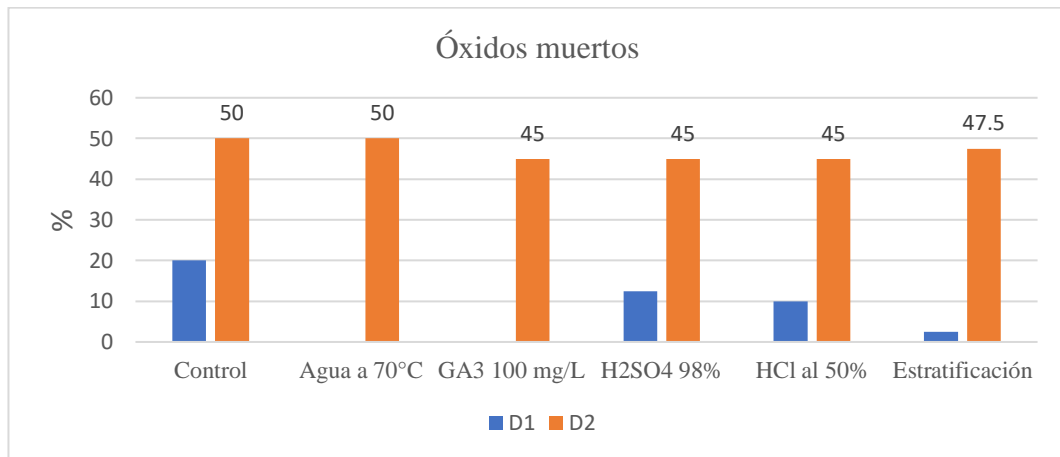
Figura 2. Porcentaje (%) promedio de contaminación en las semillas tratadas con dos métodos de desinfección en 6 métodos pregerminativos.



El uso de NaClO como desinfectante puede haber influido negativamente en las semillas debido a la larga exposición, como se observa en la **Figura 3** con la desinfección D2 a un tiempo de exposición de 30 min. que dio como resultado altos porcentajes de semillas oxidadas muertas en un intervalo de 45-50% para los seis tratamientos pregerminativos. El NaClO actúa aumentando la permeabilidad del tegumento y lixiviando los inhibidores de la germinación. Sin embargo, puede actuar negativamente a altas concentraciones y causar daños en el tejido embrionario (Silva et al., 2019). El NaClO tiene una fuerte oxidación y un tiempo de esterilización

prolongado significa que es fácil causar que las semillas se oscurezcan, generalmente se aplica una concentración más baja con una exposición corta para los tejidos delicados (Sahu et al., 2022)) Así como lo reportado por Santos et al., (2020) que desinfectaron semillas de *Dalbergia nigra* con alcohol al 70% (1 min) y NaClO (14 min), la cual fue eficiente para no promover la toxicidad de las plántulas y aumentar la germinación *in vitro* de las semillas.

Figura 3. Porcentaje (%) promedio de óxidos muertos en las semillas tratadas con dos métodos de desinfección en 6 métodos pregerminativos.

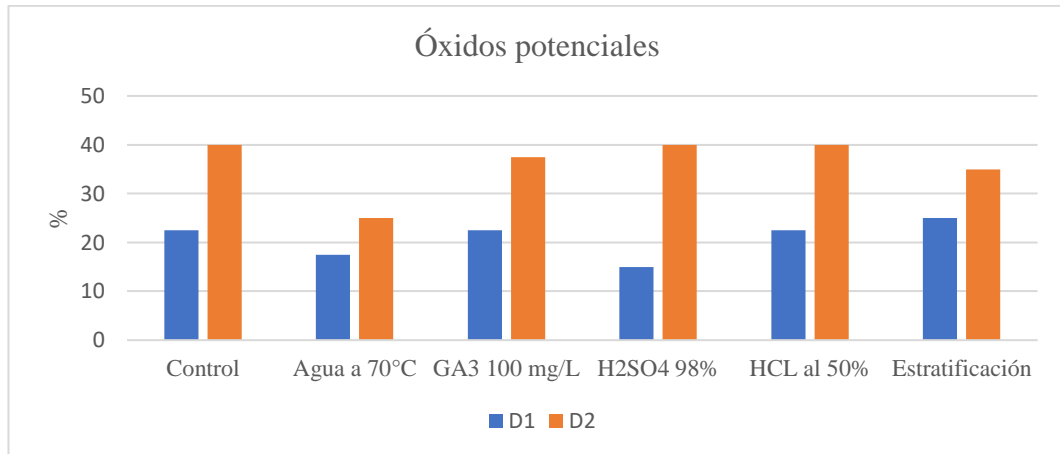


El NaClO se absorbe en la superficie de la semilla, incluso después de varios lavados con agua, a medida que aumenta el tiempo de exposición, más residuo es adsorbido por la semilla, provocando un efecto fitotóxico, citotóxico y genotóxico, lo que sugiere que puede influir en la formación de plántulas anormales de *Z. aculeata* (Yoo, 2018). En la **Figura 4** se observa que en el parámetro óxidos potenciales el método de desinfección D1 obtuvo bajos porcentajes de oxidación con valores mínimos de 15% en los seis métodos pregerminativos frente a la D2, esto debe atribuirse al tiempo de exposición que fue de 15 min. Así como lo corrobora Agobua & Okoli, (2022), que, para obtener cultivos estériles, los explantes (semillas de *Zehneria capillacea*) se sumergieron en etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de un tratamiento con varias concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 15 minutos, obteniendo un porcentaje de germinación (96%), lo que indica una esterilización eficiente sin dañar el tejido vegetal.

Si et al., (2022) recomienda el 20% de NaClO durante 15 minutos para la esterilización de las semillas debido a que es menos tóxico, tal como se observa en la **Figura 4** con

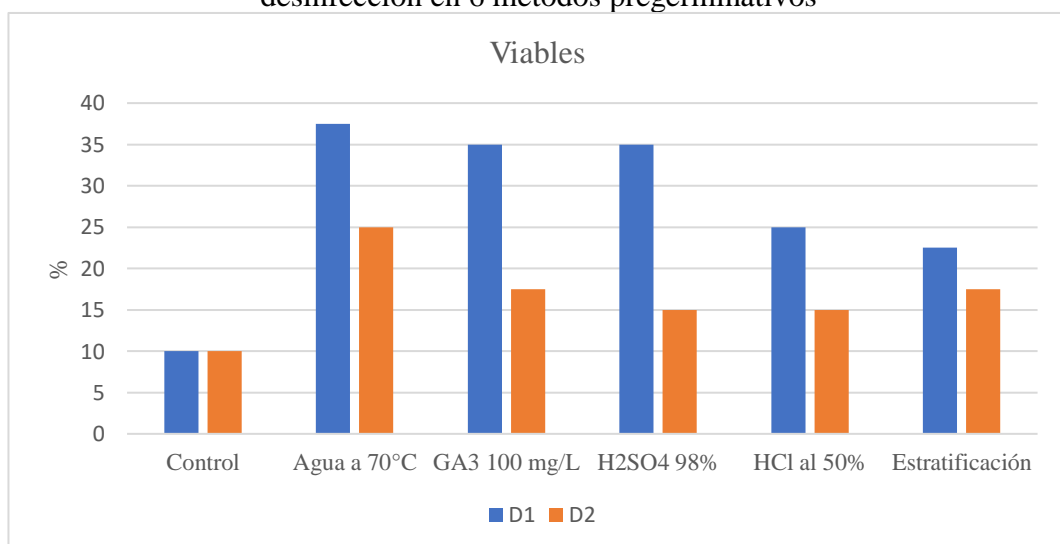
la D1 donde se utilizó NaClO al 5,5% durante 15 min. y las semillas no presentaron alta toxicidad.

Figura 4. Porcentaje (%) promedio de óxidos potenciales en las semillas tratadas con dos métodos de desinfección en 6 métodos pregerminativos.



El proceso de desinfección en las semillas es un factor de riesgo puesto que el porcentaje de semillas viables es mínimo en los dos tratamientos debido a que no superó el 50%, con valores máximos de 37,5 % y 25 % para la D1 y D2 respectivamente con el método pregerminativo Agua caliente a 70°C siendo estos los porcentajes más altos. La determinación del tiempo de exposición del agente desinfectante NaClO y alcohol es de suma importancia ya que ayuda a reducir las citotoxicidades y genotoxicidades.

Figura 5. Porcentaje (%) promedio de semillas viables tratadas con dos métodos de desinfección en 6 métodos pregerminativos



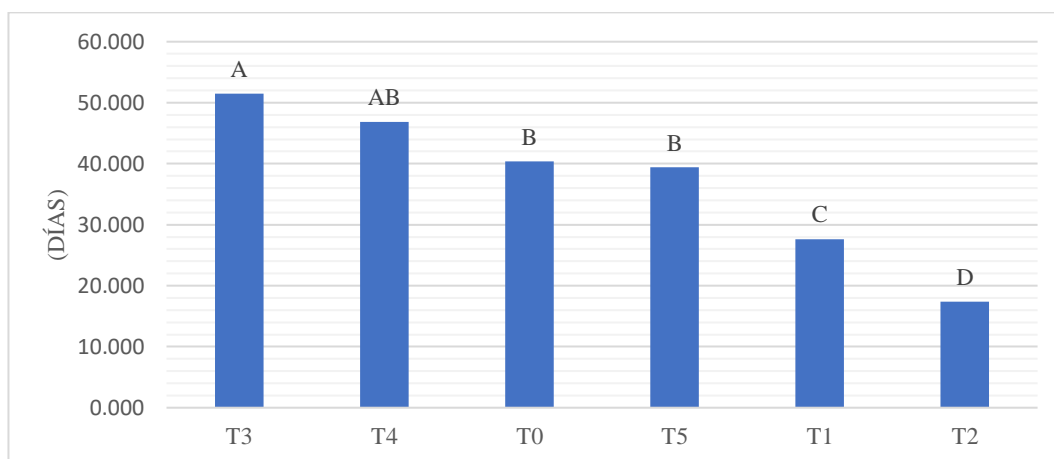
3.1.2 Evaluación del tiempo de la germinación de la semilla

En el análisis de varianza (ANOVA) de la variable de Tiempo de germinación se observa que hay diferencias significativas para los métodos pregerminativos, (ANEXO A).

El tiempo de germinación se contabilizó desde la siembra, hasta que no hubo más germinación. Realizando la prueba de Tukey al 5% para los métodos pregerminativos, se observa en la **Figura 6** varios rangos de significación. Las semillas en las se emplearon el método T2 fueron las más tempranas en germinar, tardando entre 17,4 días, seguidas del tratamiento T1 con un promedio de 27,6 días. El tratamiento T3 y T4 fueron los últimos en germinar, tardando entre 51,5 y 46,9 días (**Figura 6**).

Las giberelinas (GA_3) promueven la germinación de las semillas (S. Y. Chen et al., 2010). Resultados similares obtuvo Fang et al., (2017) donde el GA_3 ayudo a la germinación de semillas. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que muestran que la aplicación exógena de ácido giberélico (GA_3) es efectiva para romper la latencia de semillas y disminuir el tiempo de germinación (Balaguera-López et al., 2009; Ochoa et al., 2015; Szekely-Varga et al., 2017; Rout et al., 2017).

Figura 6. Días de germinación de las semillas tratadas con 6 métodos pregerminativos.



3.1.3 Evaluación del porcentaje la germinación de la semilla

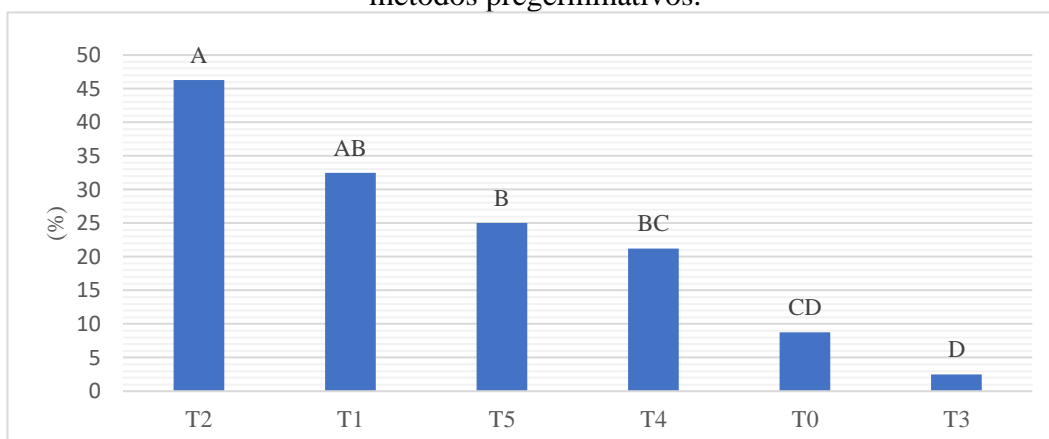
En el de análisis de varianza (ANOVA) de la variable de Porcentaje de Germinación se observa que hay diferencias significativas para los métodos pregerminativos,

métodos de desinfección y para la interacción entre estos dos factores, esto con un intervalo de confianza del 95 %, siendo los valores calculados F mucho más altos que los valores de significancia, por ello es importante identificar cuáles fueron los tratamientos que dieron los mejores resultados (**ANEXO B**).

Realizando la prueba de Tukey al 5% para los métodos pregerminativos, se observa en la **Figura 7** varios rangos de significación, sobresaliendo en el rango A el tratamiento T2 con un porcentaje de germinación 46.25%. Resultados similares obtuvo **Chen et al., (2022)** al trabajar con semillas de una planta leñosa rara y en peligro de extinción con GA₃ a dosis de 100, 200, 400, 600 y 800 mg/litro y tiempo de imbibición de 8 horas con un porcentaje final de germinación del 44.67%. Además, señala que en general, una mayor concentración de GA₃ y un mayor tiempo de imbibición de semillas aumenta el porcentaje de germinación de semillas. Resultados más favorables obtuvo **Minchala-Patiño et al., (2014)** con tasas absolutas (100%) de germinación.

A continuación, se obtuvo en el rango AB al tratamiento T1 (semillas sumergidas en agua caliente a 70°C durante 1 minuto) con un promedio de 32.50%; siendo un tratamiento óptimo. Este resultado obtenido va en línea con los hallazgos de **Seng & Cheong, (2020)** quien reveló que se logró maximizar el porcentaje de germinación y observaron que el tratamiento previo a la siembra con agua caliente en semillas de *Dalbergia cochinchinensis* durante un minuto pueden mejorar la germinación hasta en un 34,44%. Se ha informado que el tratamiento con agua caliente mejora la germinación al afectar varios factores, como por ejemplo ablandar el tegumento de la semilla y la eliminación de inhibidores, aumentando así la germinación. Además, las semillas en remojo en agua caliente pueden tener la ventaja de hacer que las cubiertas de las semillas sean permeables al agua, las semillas se embeben y se hinchan a medida que el agua se enfría (**Jaganathan et al., 2018**). Se sabe que este tratamiento rompe la latencia física de las semillas, lo que mejora la absorción de agua y el intercambio gaseoso.

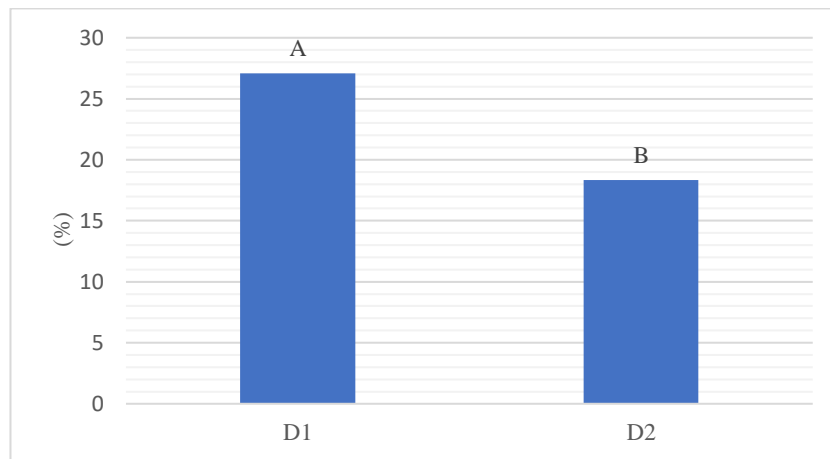
Figura 7. Porcentaje (%) promedio de germinación en las semillas tratadas con 6 métodos pregerminativos.



El agente líquido más utilizados para la desinfección seminal en el cultivo *in vitro* es el hipoclorito de sodio, porque presentan una amplia eficacia en la eliminación de microorganismos. La concentración y la exposición de NaClO pueden variar de una especie a otra. Los protocolos de esterilización basados en NaClO se combinan a menudo con un enjuague con etanol al 70% (**Lindsey et al., 2017**). Sin embargo, el aumento de la concentración del agente desinfectante, a pesar de presentar una mayor eficiencia en la eliminación de los microorganismos, también conduce a una disminución del porcentaje de germinación (**Cavalcante et al., 2018**), como se puede observar en la **Figura 7** que al aumentar la concentración de NaClO de un 5.5% (D1) a un 7% (D2) el porcentaje de germinación disminuye de un 27.08%, a un 18.33%.

Similar a los resultados de estudios anteriores cuando utilizaron hipoclorito de sodio para esterilizar semillas de algodón usando NaClO al 20% durante 30 minutos encontraron que el hipoclorito de sodio no es eficaz para la esterilización de la superficie de las semillas muy contaminadas y da lugar a una mala germinación, con porcentajes de germinación que oscilan entre el 2,22 y el 4,44 % (**Barampuram et al., 2014**).

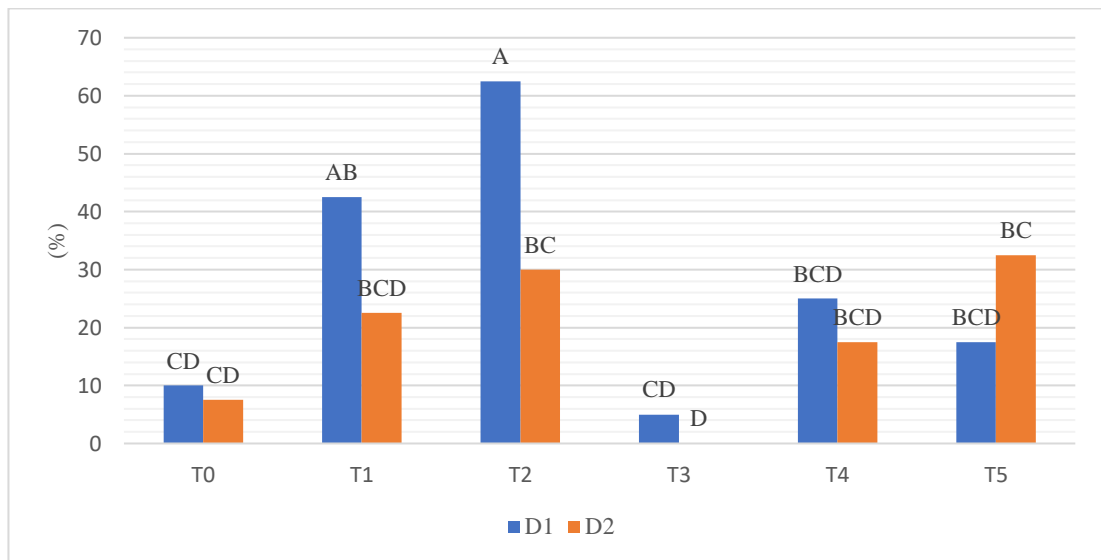
Figura 8. Porcentaje (%) promedio de germinación en las semillas tratadas con dos métodos de desinfección.



La evaluación de la germinación bajo la interacción de los 5 métodos pregerminativos y los 2 métodos de desinfección mostró una variación sustancial en el porcentaje de germinación. Sin embargo, los datos de la **Figura 9** indicaron que el mejor método para obtener un máximo porcentaje de germinación (62.5%) se notó en las semillas tratadas con el método T2D1. Por el contrario, los porcentajes mínimos (10, 7.5 y 5 %) se registraron en los métodos T0D1, T0D2 y T3D2; mientras que las semillas donde se aplicó el método T3D2 no tuvieron germinación.

De lo anterior se puede inferir que las semillas que tuvieron un porcentaje de germinación nulo en el tratamiento T3D2 se debe a que la exposición de las semillas durante 30 min en ácido sulfúrico concentrado disminuyó el porcentaje de germinación, lo que indica que este tratamiento a la dosis y tiempo evaluado mostró un posible efecto tóxico en la especie *Z. aculeata*. Estos resultados difieren con los reportados por **Boeri et al. (2019)** quien logro un 94,82% de germinación al usar este ácido por 30 min. Estas respuestas pueden ser atribuidas a la diferencia entre las especies. Sin embargo, el tiempo de exposición es crítico y debe cuantificarse para cada especie, ya que las semillas expuestas a un período prolongado pueden dañarse (**Schmidt, 2000**).

Figura 9. Porcentaje (%) promedio de germinación en las semillas tratadas con dos métodos de desinfección en 6 métodos pregerminativos.



3.1.4 Caracterización del desarrollo de la semilla de *Z. aculeata*

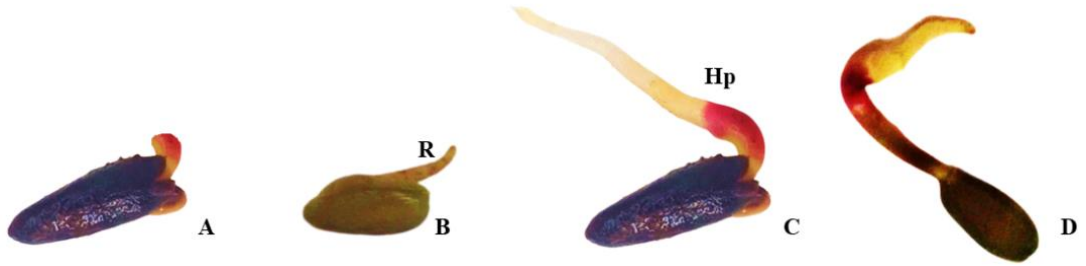
Después de la incubación en las cajas Petri, las semillas se hincharon rápidamente y la germinación ocurrió dentro de las primeras dos semanas de cultivo, evidenciado por un aumento notorio de su volumen original, correspondiendo este fenómeno a la etapa de imbibición (**Figura 9A**) (**Matilla, 2016b**). El proceso de emergencia de la radícula (**Figura 9 B**) se manifestó durante los 10 días de observación, ocurriendo solo en una cantidad muy baja de las semillas. Estos resultados fueron similares a los que exhibe **Koné et al., (2015b)** que después de la incubación en los medios de cultivo, las semillas de *Vigna subterranea* se hincharon rápidamente y la germinación ocurrió dentro de las primeras dos semanas de cultivo.

En la **Figura 9 C.** se observa que la raíz primaria comienza a diferenciarse del hipocótilo, volviéndose de color amarillo pálido y delgada en el extremo, mientras que el hipocótilo tiene un color violeta y un aspecto glabro. El eje hipocótilo-radícula emergieron a través del tegumento, durante unos tres días, así como lo mencionan **De Oliveira et al., (2014); Ribeiro et al., (2015) y Cunha et al., (2020)**

El desarrollo de la semilla no culminó la fase de plántula, dado que no se logró la liberación del tegumento y la formación del epicótilo (**Figura 9 D**).

Al finalizar el período de observación, las semillas que no lograron germinar permanecían con las características de su estado original.

Figura 10. Desarrollo del proceso de germinación de las semillas de *Z. aculeata*. **Fase germinativa:** **A.** Hinchazón de la semilla; **B.** Aparición de la radícula. **Fase de plántula:** **C.** Eje radícula-hipocótilo. **R**=radícula, **Hp**= hipocótilo.



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Se determinó un método eficiente con 5 etapas (recolección, cosecha, limpieza, desinfección, método pregerminativo) detallando cada tratamiento empleado para conseguir la germinación *in vitro* de semillas de *Z. aculeata*.

Se evaluó el porcentaje y tiempo de germinación de la semilla de *Z. aculeata* obteniendo los mejores resultados con la desinfección D1 alcanzando un porcentaje de germinación de 27.08%, esto se debe a la concentración y el tiempo de exposición de sumergimiento de las semillas en las soluciones desinfectantes que fue de 15 min en NaClO al 5,5 % y en etanol al 75% por 1 min, la cual fue eficiente para no promover la alta oxidación de semillas, aumentar la germinación *in vitro* y tener efecto positivo sobre el porcentaje de contaminación por bacterias. Con el método pregerminativo T2 se obtuvo un porcentaje de germinación de 46.25% y fueron las semillas más tempranas en germinar, tardando entre 17,4 días, influenciados por el contenido de GA₃ que promueve el crecimiento celular y es fundamental para romper la latencia y desencadenar la germinación.

Se caracterizó el proceso de germinación de la semilla de *Z. aculeata* que presentaron una germinación con protrusión de la radícula a partir de los 10 días después de la siembra, presentando una radícula corta, de color amarillo pálido y delgada en el extremo, correspondiente a la fase germinativa. En la fase de plántula las semillas no completaron su desarrollo, llegaron hasta la emergencia de eje hipocótilo-radícula a través del tegumento, este proceso duro tres días.

Se estableció el método óptimo para la obtención del mayor porcentaje de germinación de semillas *Z. aculeata*. Los resultados indicaron que el mejor método para obtener un

máximo porcentaje de germinación (62.5%) se observó en las semillas tratadas con el método T2D1, por lo que se recomienda usarlo en investigaciones futuras debido a que no existe información en la literatura científica con respecto a trabajos de investigación para la germinación de la semilla de *Z. aculeata*

4.2 Recomendaciones

- Es necesario buscar otros métodos de desinfección menos agresivos para evitar que las semillas se oxiden, además, se debe aplicar un fungicida que controle la contaminación por hongos.
- Estudios sobre nuevos métodos de germinación que ayuden aumentar el porcentaje de germinación del género *Zapoteca* y así encontrar debilidades y fortalezas para mejorar el método.
- Estudio sobre la lenta germinación que presenta las semillas de género *Zapoteca* a pesar de aplicar métodos que aceleren el tiempo de germinación.

REFERENCIAS BIBLIOGRFICAS

- Abd Aziz, N., Tan, B. C., Othman, R. Y., & Khalid, N. (2018). Efficient micropropagation protocol and genome size estimation of an important cover crop, *Mucuna bracteata* DC. ex Kurz. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 2018 132:2, 132(2), 267–278. <https://doi.org/10.1007/S11240-017-1376-3>
- Abusaief, H. M. A. A. R., & Boasoul, S. H. (2021). A taxonomic study of twelve wild forage species of Fabaceae. *Heliyon*, 7(2), e06077. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E06077>
- Agogbua, J. U., & Okoli, B. E. (2022). Procedure for in vitro seed sterilization, germination and aseptic seedling establishment of *Zehneria capillacea* (Schumach) C. jeffrey. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 19(01), 143–148. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2022.19.1.0135>
- Ahmadi, E., Nasr, S. M. H., Jalilvand, H., & Savadkoohi, S. K. (2012). Contamination control of microbe *Ziziphus spina* [christti] seed in vitro culture. *Trees - Structure and Function*, 26(4), 1299–1304. <https://doi.org/10.1007/S00468-012-0705-8/FIGURES/4>
- Alatar, A. A., Faisal, M., Abdel-Salam, E. M., Canto, T., Saquib, Q., Javed, S. B., El-Sheikh, M. A., & Al-Khedhairi, A. A. (2017). Efficient and reproducible in vitro regeneration of *Solanum lycopersicum* and assessment genetic uniformity using flow cytometry and SPAR methods. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1430–1436. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2017.03.008>
- Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
- Balaguera-López, H. E., Cárdenas-Hernández, J. F., & Álvarez-Herrera, J. G. (2009). Effect of gibberellic acid (GA3) on seed germination and growth of tomato (*solanum lycopersicum* L.). *Acta Horticulturae*, 821, 141–147. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2009.821.15>
- Barampuram, S., Allen, G., & Krasnyanski, S. (2014). Effect of various sterilization

- procedures on the in vitro germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(1), 179–185. <https://doi.org/10.1007/S11240-014-0472-X>
- Bareke, T. (2018). Biology of seed development and germination physiology. *Advances in Plants & Agriculture Research, Volume 8*(Issue 4). <https://doi.org/10.15406/APAR.2018.08.00335>
- Behroozian, M., Ejtehadi, H., Memariani, F., Pierce, S., & Mesdaghi, M. (2020). Are endemic species necessarily ecological specialists? Functional variability and niche differentiation of two threatened *Dianthus* species in the montane steppes of northeastern Iran. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68618-7>
- Bentsink, L., & Koornneef, M. (2008). Seed Dormancy and Germination. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 6, e0119. <https://doi.org/10.1199/TAB.0119>
- Boeri, P., Gazo, M. C., Failla, M., Barrio, D., Dalzotto, D., & Sharry, S. (2019). Optimum germinative conditions of a multipurpose shrub from patagonia: *Prosopis alpataco* (Fabaceae). *Darwiniana, Nueva Serie*, 7 (2), 199–207. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2019.72.817>
- Borges, L., Bruneau, A., Cardoso, D., Crisp, M., Delgado-Salinas, A., Doyle, J. J., Egan, A., Herendeen, P. S., Hughes, C., Kenicer, G., Klitgaard, B., Koenen, E., Lavin, M., Lewis, G., Luckow, M., Mackinder, B., Malécot, V., Miller, J. T., Pennington, R. T., ... Wink, M. (2013). Towards a new classification system for legumes: Progress report from the 6th International Legume Conference. *South African Journal of Botany*, 89, 3–9. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2013.07.022>
- Breman, E., Ballesteros, D., Castillo-Lorenzo, E., Cockel, C., Dickie, J., Faruk, A., O'donnell, K., Offord, C. A., Pironon, S., Sharrock, S., & Ulian, T. (2021). Plant Diversity Conservation Challenges and Prospects—The Perspective of Botanic Gardens and the Millennium Seed Bank. *Plants*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/PLANTS10112371>
- Burlakova, L. E., Karatayev, A. Y., Karatayev, V. A., May, M. E., Bennett, D. L., & Cook, M. J. (2011). Endemic species: Contribution to community uniqueness,

- effect of habitat alteration, and conservation priorities. *Biological Conservation*, 144(1), 155–165. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2010.08.010>
- Bustamante, T., & Zalles, J. I. (2020). De la parcela al paisaje: restauración forestal en los Andes ecuatorianos. In *FLACSO Ecuador*. <https://doi.org/10.46546/20203savia>
- Cavalcante, V. R., Borin, L., & Pedroso-de-Moraes, C. (2018). Germinação e crescimento in vitro de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em diferentes meios de cultivo e períodos de exposição a agentes desinfestantes seminais. *Iheringia - Serie Botanica*, 73(2), 196–207. <https://doi.org/10.21826/2446-8231201873212>
- Chen, J. Z., Huang, X. L., Xiao, X. F., Liu, J. M., Liao, X. F., Sun, Q. W., Peng, L., & Zhang, L. (2022). Seed Dormancy Release and Germination Requirements of *Cinnamomum migao*, an Endangered and Rare Woody Plant in Southwest China. *Frontiers in Plant Science*, 13, 11. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.770940/BIBTEX>
- Chen, S. Y., Chien, C. Te, Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2010). Storage behavior and changes in concentrations of abscisic acid and gibberellins during dormancy break and germination in seeds of *Phellodendron amurense* var. *wilsonii* (Rutaceae). *Tree Physiology*, 30(2), 275–284. <https://doi.org/10.1093/TREEPHYS/TPP111>
- Chokheli, V. A., Dmitriev, P. A., Rajput, V. D., Bakulin, S. D., Azarov, A. S., Varduni, T. V., Stepanenko, V. V., Tarigholizadeh, S., Singh, R. K., Verma, K. K., & Minkina, T. M. (2020). Recent Development in Micropropagation Techniques for Rare Plant Species. *Plants*, 9(12), 1–21. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9121733>
- Coelho, N., Gonçalves, S., & Romano, A. (2020). Endemic Plant Species Conservation: Biotechnological Approaches. *Plants*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/PLANTS9030345>
- Cunha, M. do C. L., Lima, T. L. de, Ferreira, T. C., & Santos, Y. M. dos. (2020). Seed, seedling, tirodendro morphology and germination of *Anadenanthera macrocarpa*

- (Benth.) Brenan (Fabaceae, Mimosoideae). *Hoehnea*, 47.
<https://doi.org/10.1590/2236-8906-59/2020>
- Darbyshire, I., Timberlake, J., Osborne, J., Rokni, S., Matimele, H., Langa, C., Datizua, C., de Sousa, C., Alves, T., Massingue, A., Hadj-Hammou, J., Dhanda, S., Shah, T., & Wursten, B. (2019). The endemic plants of Mozambique: diversity and conservation status. *PhytoKeys*, 136(2019), 45.
<https://doi.org/10.3897/PHYTOKEYS.136.39020>
- Davoudpour, Y., Schmidt, M., Calabrese, F., Richnow, H. H., & Musat, N. (2020). High resolution microscopy to evaluate the efficiency of surface sterilization of Zea Mays seeds. *PLOS ONE*, 15(11), e0242247.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0242247>
- De Oliveira, J. H. G., Iwazaki, M. C., & Oliveira, D. M. T. (2014). Seedling morphology, anatomy and venation of the cotyledons and eophylls of Mimosa (Fabaceae, Mimosoideae). *Rodriguesia*, 65(3), 777–789.
<https://doi.org/10.1590/2175-7860201465315>
- Del Amo Rodríguez, S., Del Carmen, M., Tenorio, V., María, J., Prado, R., & Campillo, C. S. (2002). *Germinación y manejo de especies forestales tropicales*.
- Doria, J. (2010). Revisión bibliográfica Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74–85.
- Duno, R. D. S., & Cetzal-Ix, W. (2017). La subfamilia Mimosoideae (Fabaceae) en la Península de Yucatán, México. *Desde El Herbario CICY*, 9, 1–8.
http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/
- Fang, X. W., Zhang, J. J., Xu, D. H., Pang, J., Gao, T. P., Zhang, C. H., Li, F. M., & Turner, N. C. (2017). Seed germination of Caragana species from different regions is strongly driven by environmental cues and not phylogenetic signals. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11294-x>
- FAO. (2020). *Evaluación de los recursos forestales mundiales 2020 Principales resultados- Principales resultados*. <https://doi.org/10.4060/ca8753es>

- Ferm, J. (1969). *On Ingeae Systematics of synandrous mimosoids* [Universitatis Upsaliensis]. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-420681>
- Ferm, J. (2019). A preliminary phylogeny of Zapoteca (Fabaceae: Caesalpinioideae: Mimosoid clade). *Plant Systematics and Evolution*, 305(5), 341–352. <https://doi.org/10.1007/S00606-019-01574-6/FIGURES/2>
- Fernández-Marín, B., Míguez, F., Méndez-Fernández, L., Agut, A., Becerril, J. M., García-Plazaola, J. I., Kranner, I., & Colville, L. (2017). Seed carotenoid and tocochromanol composition of wild fabaceae species is shaped by phylogeny and ecological factors. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.01428/FULL>
- García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. (2010). Cultivo de tejidos de plantas: estado actual, oportunidades y desafíos. *Ciencia e Investigación Agraria*, 37(3), 5–30. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202010000300001>
- Garduza-Acosta, B., Lagunes-Espinoza, L. C., Bautista-Muñoz, C. C., García-De-los-santos, G., Zaldívar-Cruz, J. M., & Hernández-Flores, A. (2019). Germination of *Crotalaria* and *Lupinus* (Fabaceae) seeds submitted to different pre-germination treatments and their effect on enzymatic activity during early germination. *Brazilian Journal of Biology*, 80(1), 23–29. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.185813>
- Guney, K., Cetin, M., Sevik, H., & Güney, K. B. (2016). Effects of Some Hormone Applications on Germination and Morphological Characters of Endangered Plant Species *Lilium artvinense* L. Seeds. *Bulgarian Chemical Communications*, 48(2), 256–260. <https://doi.org/10.5772/64466>
- Gutiérrez, M. I., Miranda, D., & CárdenasHernández, J. F. (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. <https://doi.org/10.17584/RCCH.2011V5I2.1268>
- Hernandez, H. M. (1989). Systematics of Zapoteca (Leguminosae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76(3), 781. <https://doi.org/10.2307/2399649>

- Hu, H., Liu, H., & Liu, F. (2018). Seed germination of hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars responds differently to the stress of salt type and concentration. *Industrial Crops and Products*, 123, 254–261. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.06.089>
- Hyvärinen, M. T. (2020). *Rubus humulifolius* rescued by narrowest possible margin, conserved ex situ, and reintroduced in the wild. *Journal for Nature Conservation*, 55, 125819. <https://doi.org/10.1016/J.JNC.2020.125819>
- Işık, K. (2011). Rare and endemic species: why are they prone to extinction? *. *Turk J Bot*, 35, 411–417. <https://doi.org/10.3906/bot-1012-90>
- Jaganathan, G. K., Li, J., Biddick, M., Han, K., Song, D., Yang, Y., Han, Y., & Liu, B. (2019). Mechanisms underpinning the onset of seed coat impermeability and dormancy-break in *Astragalus adsurgens*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-46158-Z>
- Jaganathan, G. K., Yule, K. J., & Biddick, M. (2018). Determination of the water gap and the germination ecology of *Adenanthera pavonina* (Fabaceae, Mimosoideae); the adaptive role of physical dormancy in mimetic seeds. *AoB Plants*, 10(5), ply048. <https://doi.org/10.1093/AOBPLA/PLY048>
- Kimura, E., & Islam, M. A. (2012). Seed scarification methods and their use in forage legumes. *Research Journal of Seed Science*, 5(2), 38–50. <https://doi.org/10.3923/RJSS.2012.38.50>
- Koné, M., Koné, T., Silué, N., Soumahoro, A. B., & Kouakou, T. H. (2015a). In Vitro Seeds Germination and Seedling Growth of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc. (Fabaceae)). *Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/595073>
- León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. U. U. y H. N. (Eds). (2019). Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. In *Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito*. [https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/FichaEspecie/Zapoteca aculeata](https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/FichaEspecie/Zapoteca%20aculeata)
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C. U., Navarrete, H., León-Yáñez, S., Valencia, R., Navarrete, H., & Pitman, N. (2011). *Libro rojo de*

las plantas endémicas del Ecuador 2011.
http://www.academia.edu/646220/Libro_rojo_de_las_plantas_endémicas_del_Ecuador_2000_Red_book_of_Ecuadors_endemic_plants_2000_

León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., & Ulloa Ulloa, Carmen Navarrete, H. (2012). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador.*
<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/home>

Lewis, G. P., & Klitgaard, B. B. (2002). Leguminosas del sur de Ecuador. *Botánica Austroecuatorialiana*, 185.

Lindsey, B. E., Rivero, L., Calhoun, C. S., Grotewold, E., & Brkljacic, J. (2017). Standardized Method for High-throughput Sterilization of Arabidopsis Seeds. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2017(128), 56587.
<https://doi.org/10.3791/56587>

Long, Y., Tan, D. Y., Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2012). Seed dormancy and germination characteristics of *Astragalus arpilobus* (Fabaceae, subfamily Papilionoideae), a central Asian desert annual ephemeral. *South African Journal of Botany*, 83, 68–77. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2012.06.010>

Luera, P., Wahl-Villarreal, K., Christoffersen, B. O., Treviño, A., Soti, P., & Gabler, C. A. (2021). Effects of Scarification, Phytohormones, Soil Type, and Warming on the Germination and/or Seedling Performance of Three Tamaulipan Thornscrub Forest Species. *Plants 2021, Vol. 10, Page 1489, 10(8)*, 1489.
<https://doi.org/10.3390/PLANTS10081489>

Martins, L. D., Costa, F. P., Lopes, J. C., & Rodrigues, W. N. (2012). Influence of pre-germination treatments and temperature on the germination of crambe seeds (*Crambe abyssinica* Hochst). *Idesia (Arica)*, 30(3), 23–28.
<https://doi.org/10.4067/S0718-34292012000300003>

Matilla, A. J. (2016a). *Desarrollo y germinación de las semillas.*
<https://www.researchgate.net/publication/271512205>

Matilla, A. J. (2016b). *Desarrollo y germinación de las semillas.*
<https://www.researchgate.net/publication/271512205>

- Mekonnen, T., Diro, M., & Sharma, M. (2013). An alternative safer and cost effective surface sterilization method for sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) explants. *African Journal of Biotechnology*, 12(44), 6282–6286. <https://doi.org/10.5897/ajb2013.12481>
- Miche, L., & Balandreau, J. (2001). Effects of Rice Seed Surface Sterilization with Hypochlorite on Inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3046. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3046-3052.2001>
- Minchala-Patiño, J., Poma-Angamarca, R., Muñoz-Chamba, L., Yaguana-Arévalo, M., González-Zaruma, D., Eras-Guamán, V. H., Rojas-Idrogo, C., & Delgado-Paredes, G. E. (2014). Propagación in vitro de *Prosopis limensis* Benth. in Hook. (Fabaceae - Mimosoideae). *Quebracho (Santiago Del Estero)*, 22(2), 88–99. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30262014000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Miransari, M., & Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 110–121. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2013.11.005>
- Missanjo, E., Maya, C., Kapira, D., Banda, H., & Kamanga-Thole, G. (2013). Effect of Seed Size and Pretreatment Methods on Germination of *Albizia lebeck*. *ISRN Botany*, 2013, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2013/969026>
- Nonogaki, M., & Nonogaki, H. (2017). Germination. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 1, 509–512. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00201-X>
- Ochoa, M. J., González-Flores, L. M., Cruz-Rubio, J. M., Portillo, L., & Gómez-Leyva, J. F. (2015). (PDF) *Effect of substrate and gibberellic acid (GA3) on seed germination in ten cultivars of Opuntia sps.* *Revista de La Asociación Profesional Para El Desarrollo de Cactus*. <https://www.researchgate.net/publication/281628093>
- Penfield, S. (2017). Seed dormancy and germination. *Current Biology*, 27(17), R874–R878. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.05.050>
- Ribeiro, J. W. F., de Oliveira, A. K. M., Rodrigues, A. P. D. A. C., & Rondon, E. V.

- (2015). Germination and morphology of seeds and seedlings of *Parkia gigantocarpa* fabaceae: Mimosoidae. *Floresta*, 45(2), 303–314. <https://doi.org/10.5380/RF.V45I2.34504>
- Rodrigues-Junior, A. G., Baskin, C. C., Baskin, J. M., & De-Paula, O. C. (2021). The pleurogram, an under-investigated functional trait in seeds. *Annals of Botany*, 127(2), 167. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCAA161>
- Rodrigues Junior, A. G., Mello, A. C. M. P., Baskin, C. C., Baskin, J. M., Oliveira, D. M. T., & Garcia, Q. S. (2019). A function for the pleurogram in physically dormant seeds. *Annals of Botany*, 123(5), 867. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCY222>
- Rout, S., Khare, N., Patra, S. S., Beura, S., & Nayak, S. (2017). Effect of seed pre-treatment with different concentrations of gibberellic acid (GA3) on seed germination and seedling growth of *Cassia fistula* L. ~ 135 ~ *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5(6), 135–138.
- Sahu, P. K., Tilgam, J., Mishra, S., Hamid, S., Gupta, A., Jayalakshmi, K., Verma, S. K., & Kharwar, R. N. (2022). Surface sterilization for isolation of endophytes: Ensuring what (not) to grow. *Journal of Basic Microbiology*, 62(6), 647–668. <https://doi.org/10.1002/JOBM.202100462>
- Santos, M. M., Cezario, L. F. C., Simões, I. M., Baptista, J. O., Araujo, C. P. de, de Mello, T., Mayard, H., Gonçalves, E. de O., Fontes, M. M. P., Schmildt, E. R., Lopes, J. C., Caldeira, M. V. W., & Alexandre, R. S. (2020). DISINFECTION PROTOCOL AND IN VITRO GERMINATION OF SEEDS OF *Dalbergia nigra*. *CERNE*, 26(2), 238–246. <https://doi.org/10.1590/01047760202026022714>
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M. M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., & Rowntree, J. K. (2006). Conservation In vitro of threatened plants—Progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2006 42:3, 42(3), 206–214. <https://doi.org/10.1079/IVP2006769>
- Seng, M., & Cheong, E. J. (2020a). Comparative study of various pretreatment on seed germination of *Dalbergia cochinchinensis* Comparative study of various pretreatment on seed germination of *Dalbergia cochinchinensis*. *Forest Science*

- and Technology*, 16(2), 68–74. <https://doi.org/10.1080/21580103.2020.1758801>
- Seng, M., & Cheong, E. J. (2020b). Comparative study of various pretreatment on seed germination of *Dalbergia cochinchinensis*. *Forest Science and Technology*, 16(2), 68–74. <https://doi.org/10.1080/21580103.2020.1758801>
- Si, Y., Haxim, Y., & Wang, L. (2022). Optimum Sterilization Method for In Vitro Cultivation of Dimorphic Seeds of the Succulent Halophyte *Suaeda aralocaspica*. *Horticulturae*, 8(4), 289. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE8040289/S1>
- Silva, E. R., Simões, I. M., Baptista, J. O., Bighi, K. N., Fontes, M. M. P., Schmildt, E. R., Lopes, J. C., Caldeira, M. V. W., & Alexandre, R. S. (2019). In vitro germination of *melanoxylon brauna schott*. And evaluation of the toxicity of disinfecting agents in the *lactuca sativa L.* model plant. *Cerne*, 25(4), 375–385. <https://doi.org/10.1590/01047760201925042688>
- Sorokin, A., Yadav, N. S., Gaudet, D., & Kovalchuk, I. (2021). Development and standardization of rapid and efficient seed germination protocol for *cannabis sativa*. *Bio-Protocol*, 11(1). <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.3875>
- Soumare, A., Diédhiou, A. G., Arora, N. K., Tawfeeq Al-Ani, L. K., Ngom, M., Fall, S., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Kouisni, L., & Sy, M. O. (2021). Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture. *Frontiers in Microbiology*, 12, 615. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.649878/BIBTEX>
- Szekely-Varga, Z., Kentelky, E., & Cantor, M. (2017). *Effect of gibberellic acid (AG3) on the germination of seeds of Thymus satureioides L and Lavandula dentata*. Mill. RJH. <https://www.researchgate.net/publication/316544180>
- Tapia-Armijos, M. F., Homeier, J., Espinosa, C. I., Leuschner, C., & De La Cruz, M. (2015). Deforestation and Forest Fragmentation in South Ecuador since the 1970s – Losing a Hotspot of Biodiversity. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0133701>
- Tropicos.org. (2018). *Tropicos: sistema de información botánica. Jardín Botánico de Missouri, San Luis.*

- Tuan, P. A., Sun, M., Nguyen, T. N., Park, S., & Ayele, B. T. (2019). Molecular mechanisms of seed germination. *Sprouted Grains: Nutritional Value, Production, and Applications*, 1–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811525-1.00001-4>
- Utami, E. S. W., & Hariyanto, S. (2019). In vitro seed germination and seedling development of a rare Indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm. *Scientifica*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8105138>
- Varela, S. A., & Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Unidad de Genética Ecológica y Mejoramiento Forestal, INTA EEA Bariloche*.
- Vargas, H., Neill, D., Asanza, M., Freire-Fierro, A., & Narváez, E. (2000). Vegetación y flora del Parque Nacional Llanganates. In *Biodiversidad en el Parque Nacional Llanganates: un reporte de las evaluaciones ecológicas y socioeconómicas rápidas*. EcoCiencia, Herbario Nacional del Ecuador, Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales e Instituto Internacional de Reconstrucción Rural.
- Velasco, A. M. (2001). Propuesta de Ecuador para la formulación de la estrategia nacional de biodiversidad: Vida silvestre. *Secretaría General de La Comunidad Andina*.
- Villavicencio, D. D. S. (2013). *Diseño del centro de interpretación turístico ambiental en el jardín botánico Atocha-la Liria [Tesis de grado]*. Universidad Regional Autónoma de los Andes, Facultad de Dirección de Empresas.
- Wang, L., Du, Y., Rahman, M. M., Tang, B., Fan, L. J., & Kilaru, A. (2018). Establishment of an efficient in vitro propagation system for *Iris sanguinea*. *Scientific Reports*, 8(1), 17100. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-35281-Y>
- Yoo, J. H. (2018). Review of Disinfection and Sterilization – Back to the Basics. *Infection & Chemotherapy*, 50(2), 101. <https://doi.org/10.3947/IC.2018.50.2.101>
- Zapata, R. M., Azagra Malo, C., & Karlin, M. S. (2017). Pre-germinative treatments for seed dormancy breaking of three populations of *Ramorinoa girolae*, an endemic woody species from arid zones in Argentina. *Bosque (Valdivia)*, 38(2), 237–245. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002017000200002>

Zurita-Valencia, W., Gómez-Cruz, J. E., Atrián-Mendoza, E., Hernández-García, A., Granados-García, M. E., García-Magaña, J. J., Salgado-Garciglia, R., & Sánchez-Vargas, N. M. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación in vitro y micropropagación del cirimo (*tilia mexicana schlecht.*) (*tiliaceae*). *Polibotánica*, 38, 129–144.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682014000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es

ANEXOS

ANEXO A. Análisis estadística ANOVA y prueba de Tukey para a variable porcentaje de germinación

Tabla 10. Análisis de varianza para la variable días de germinación

FV	SC	gl	CM	F ₀	Valor- p
Métodos pregerminativos	6380.94	5	1276.19	43.52	0.000
Métodos de desinfección	22.69	1	22.69	0.77	0.385
Métodos pregerminativos*Métodos de desinfección	127.94	5	25.59	0.87	0.509
Error	1055.75	36	29.33		
Total	7587.31	47			

Tabla 11. Prueba de significación de tukey al 5% para métodos pregerminativos en la variable días de germinación

Métodos pregerminativos	N	Media	Agrupación
T3	8	51.500	A
T4	8	46.875	A B
T0	8	40.375	B
T5	8	39.375	B
T1	8	27.625	C
T2	8	17.375	D

Nota: las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

ANEXO B. Análisis estadística ANOVA y prueba de Tukey para a variable porcentaje de germinación

Tabla 12. Análisis de varianza para la variable porcentaje de germinación

FV	SC	gl	CM	F₀	Valor- p
Métodos pregerminativos	10085.4	5	2017.1	15.37	0.000
Métodos de desinfección	918.7	1	918.7	7.00	0.012
Métodos pregerminativos*Métodos de desinfección	2618.8	5	523.8	3.99	0.006
Error	4725.0	36	131.2		
Total	18347.9	47			

Tabla 13. Prueba de significación de tukey al 5% para métodos de desinfección en la variable porcentaje de germinación

Métodos de desinfección	N	Media (%)	Agrupación
D1	24	27.08	A
D2	24	18.33	B

Tabla 14. Prueba de significación de tukey al 5% para métodos pregerminativos en la variable porcentaje de germinación

Métodos pregerminativos	N	Media (%)	Agrupación
T2	8	46.25	A
T1	8	32.50	A B
T5	8	25.00	B
T4	8	21.25	B C
T0	8	8.75	C D
T3	8	2.50	D

Tabla 15. Prueba de significación de tukey al 5% para métodos pregerminativos*métodos de desinfección en la variable porcentaje de germinación

Métodos pregerminativos*Métodos de desinfección	N	Media	Agrupación			
T2 D1	4	62.5	A			
T1 D1	4	42.5	A	B		
T5 D2	4	32.5	B		C	
T2 D2	4	30.0	B		C	
T4 D1	4	25.0	B	C	D	
T1 D2	4	22.5	B		C	D
T4 D2	4	17.5	B		C	D
T5 D1	4	17.5	B		C	D
T0 D1	4	10.0	C			D
T0 D2	4	7.5	C			D
T3 D1	4	5.0	C			D
T3 D2	4	-0.0	D			