

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA**

“Evaluación del efecto de la temperatura, luz y ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* en semillas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce provenientes del Parque Nacional Cayambe - Coca en Ecuador.”

Elaborado por: Valencia Cepeda Zaskya Poleth

Directora: Segovia Salcedo, María Claudia PhD.

Sangolquí, 2022



Introducción

Objetivos

Metodología

Resultados y Discusión

Conclusiones

Recomendaciones





Ecuador-
Megadiverso, gran variedad de ecosistemas

El Páramo



Alto número de especies endémicas

Amenaza



Estudiar las características, estructuras, diversidad y propagación de semillas



Bibliografía
escasa



Investigación nacional en etapas tempranas, sobre la propagación, conservación y manejo de especies vegetales de páramo



Conservación y
recuperación de
ecosistemas

Manejo del páramo



Desde el páramo se distribuye el agua potable



Existe un plan de manejo y cuidado



No existe políticas regulatorias fuertes



Banco de germoplasma

Familia *Ericaceae*



17 géneros y 221 especies en el Ecuador

Se caracterizan por sus usos ornamentales y comestibles

Son un componente importante del proceso de sucesión ecológica en el bosque andino

Familia *Ericaceae*

Pernettya prostrata (Cav.) DC.



Disterigma empetrifolium (Kunth) Drude



Familia *Rubiaceae*



84 géneros y 557 especies de esta familia en el Ecuador

Poseen productos químicos útiles y fines ornamentales y varias especies poseen propiedades medicinales

Especies herbáceas, arbustos y árboles

Familia *Rubiaceae*

Nertera granadensis (Mutis ex L. f.) Druce



Galium hypocarpium (L.) Endl. ex Griseb.



Estrategias para la Conservación de Especies Vegetales

Dos tercios de los ecosistemas del mundo han sido degradados



Técnicas biotecnológicas para la preservación de recursos genéticos

Conservación de germoplasma



Bancos de semillas



Restauración y conservación mediante el cultivo de semillas

Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura, luz y ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* en semillas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce provenientes del Parque Nacional Cayambe – Coca en el Ecuador.



Objetivos específicos

Caracterizar morfológicamente mediante el peso y tamaño a semillas de cuatro especies nativas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.).

Calcular el porcentaje de viabilidad de semillas en cuatro especies nativas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) **para describir sus rasgos de historia de vida reproductiva previa a la germinación.**



Objetivos específicos

Establecer el tratamiento óptimo de desinfección por medio del porcentaje de contaminación de semillas de cuatro especies nativas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce para su aplicación como pretratamiento al estudio de germinación.

Determinar el efecto de la temperatura, luz y ácido giberélico sobre el porcentaje de germinación de las semillas de cuatro especies de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce.



Ubicación del de investigación y área de estudio Parque Nacional Cayambe - Coca



Puntos de estudio; en color rojo las cinco coordenadas pertenecientes al Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador.

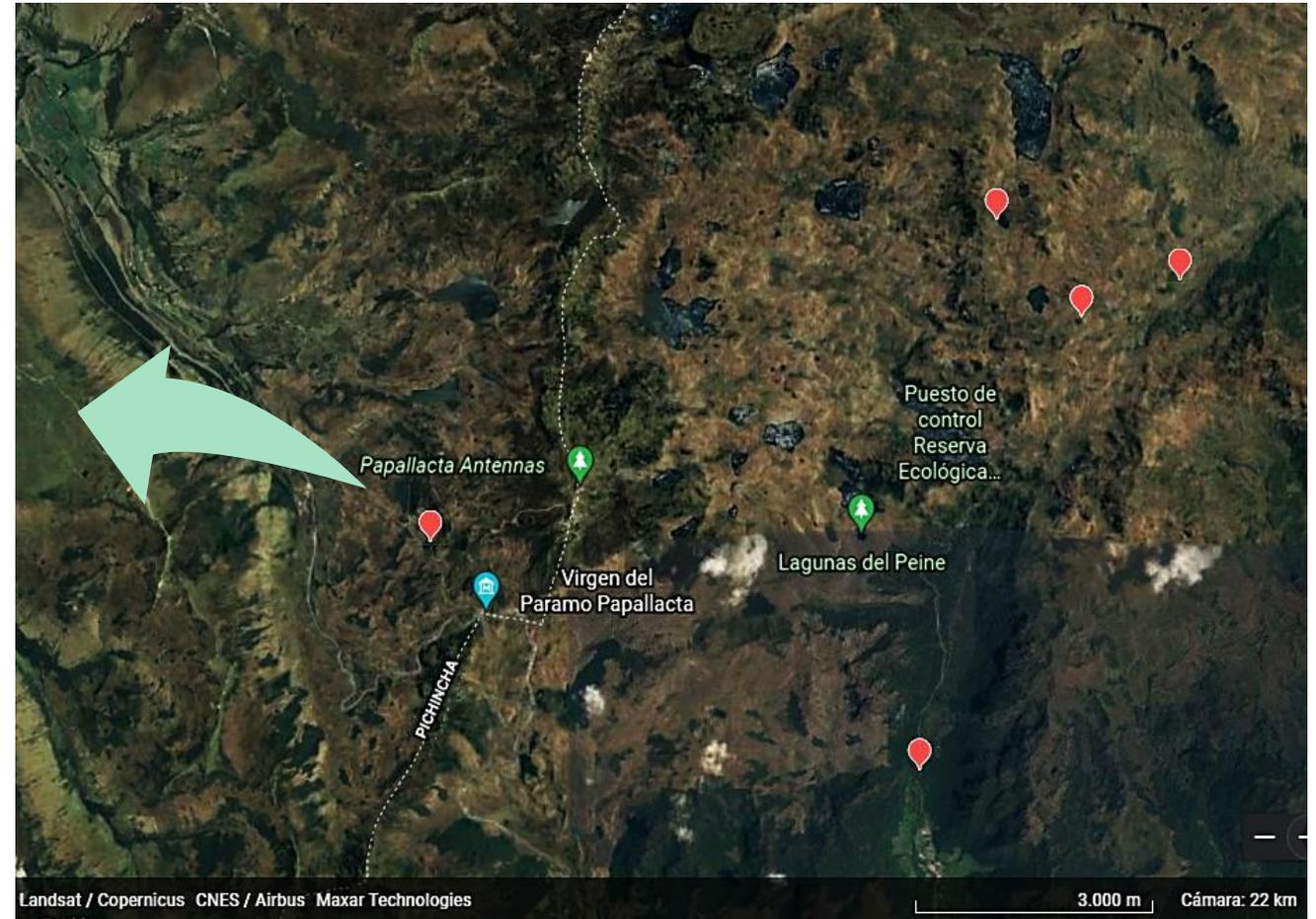
| Ingreso



Ubicación del de investigación y área de estudio

Parque Nacional Cayambe - Coca

La virgen



Puntos de estudio; en color rojo las cinco coordenadas pertenecientes al Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador.

Recolección y manejo del material vegetal

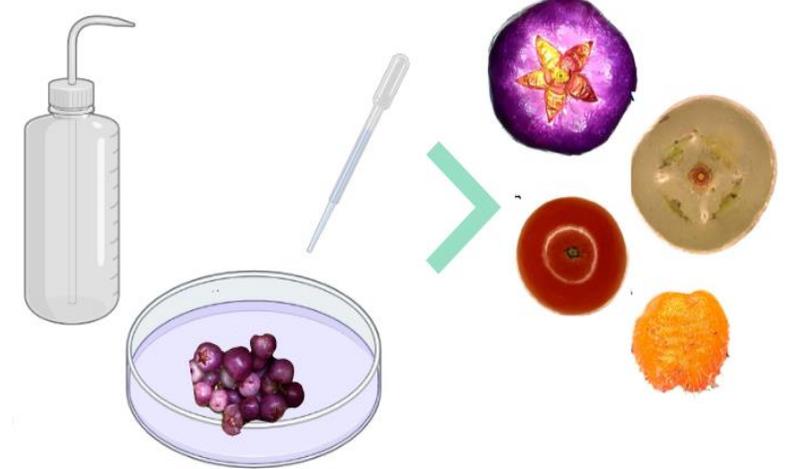
Recolección del Material Vegetal



Transporte y almacenamiento



Limpieza y secado del fruto

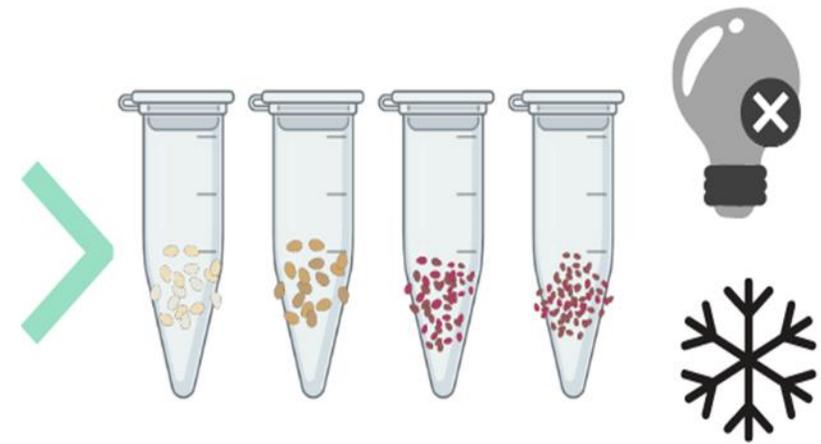


Recolección y manejo del material vegetal

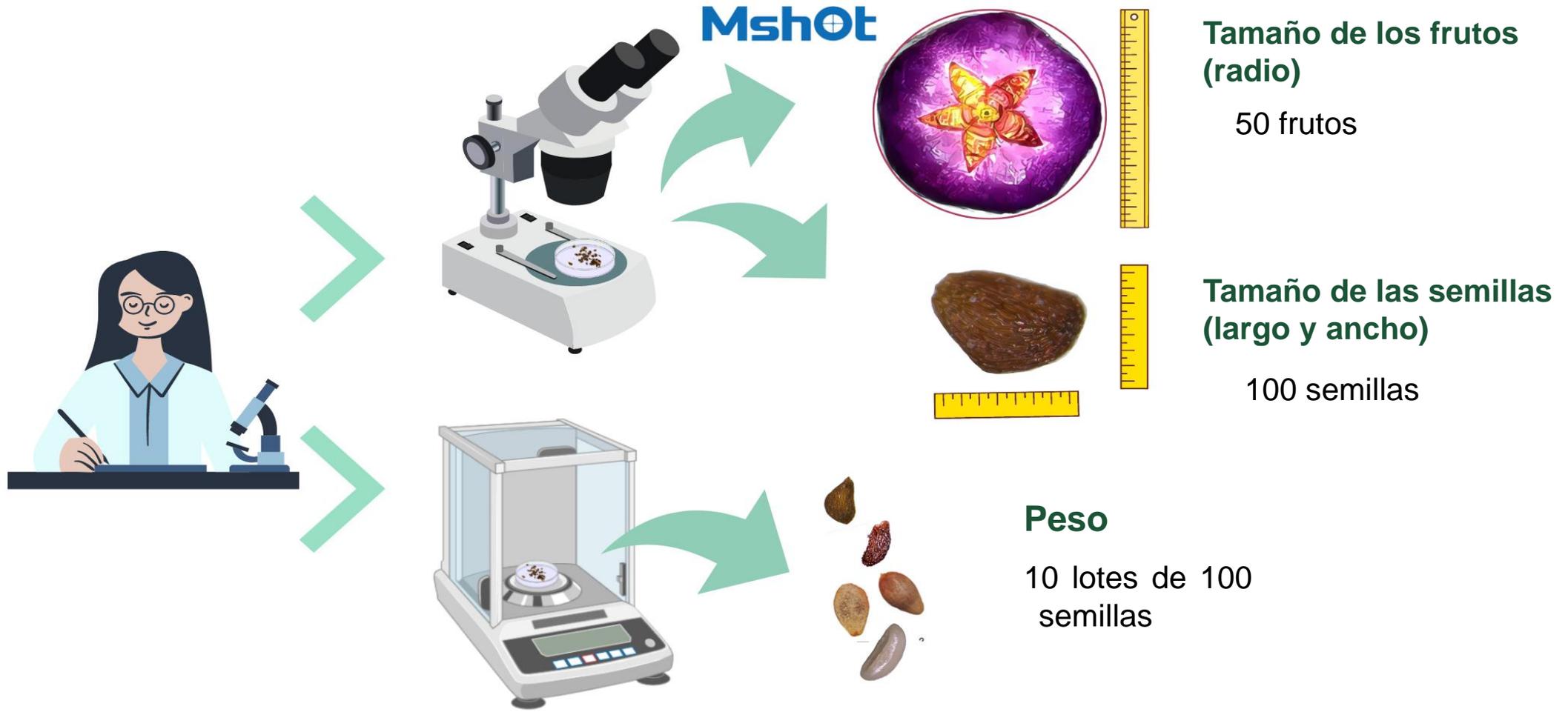
Limpieza y secado de las semillas



Almacenamiento



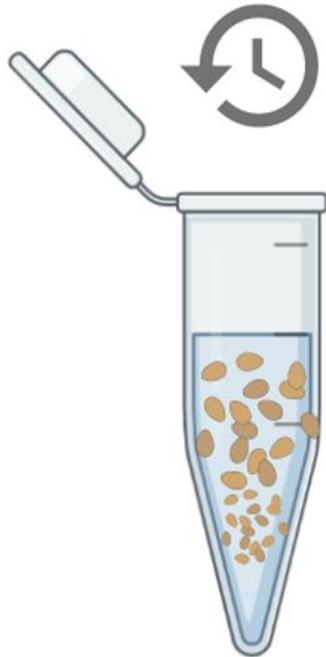
Análisis morfológico del fruto-semilla



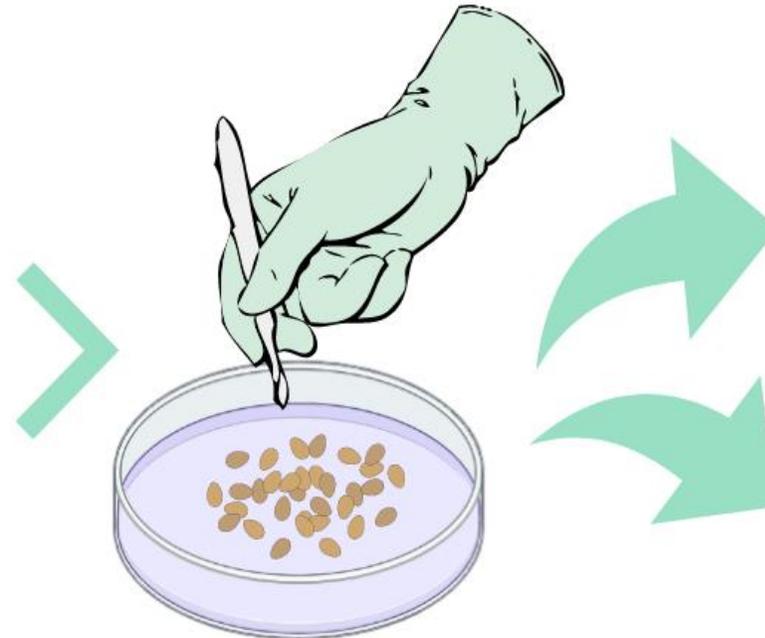
Viabilidad de semillas: Prueba de tetrazolio (TZ)

Imbibición

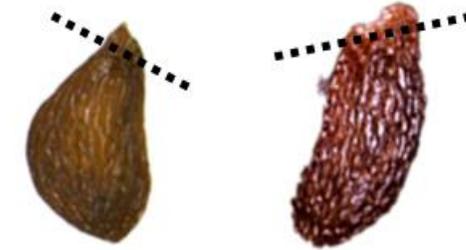
24 horas



Corte de las semillas



Ericaceae –
Corte basal

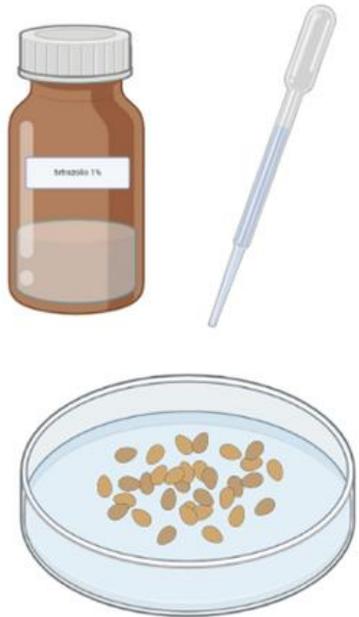


Rubiaceae –
Corte transversal

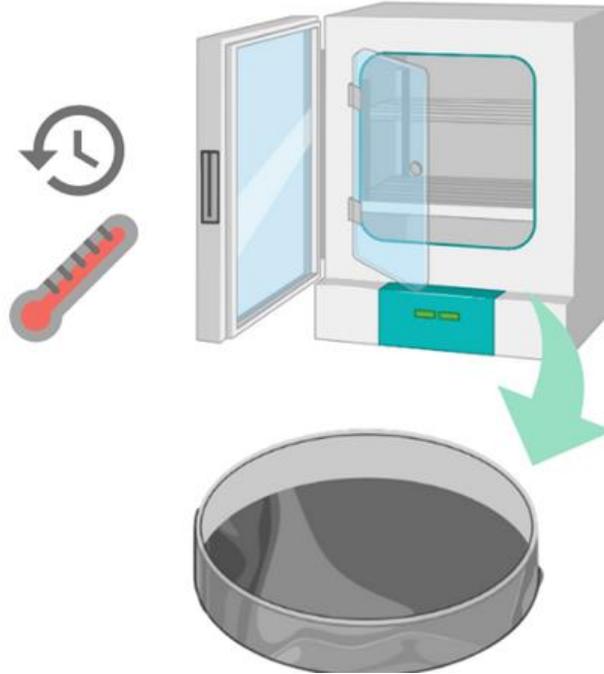


Viabilidad de semillas: Prueba de tetrazolio (TZ)

Tinción

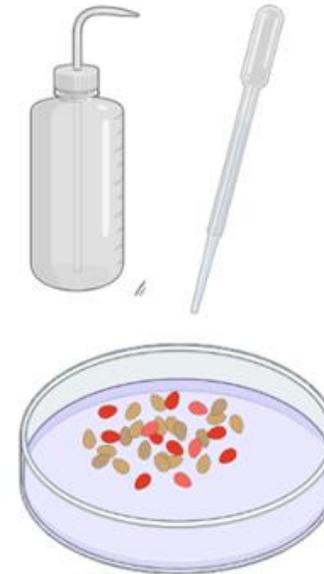


24 horas / 30°C/ oscuridad

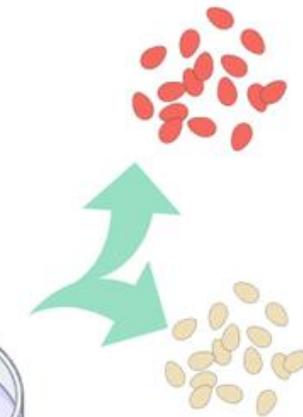


Evaluación

Tetrazolio al 1%



100 semillas
Lavado y extracción
de embriones

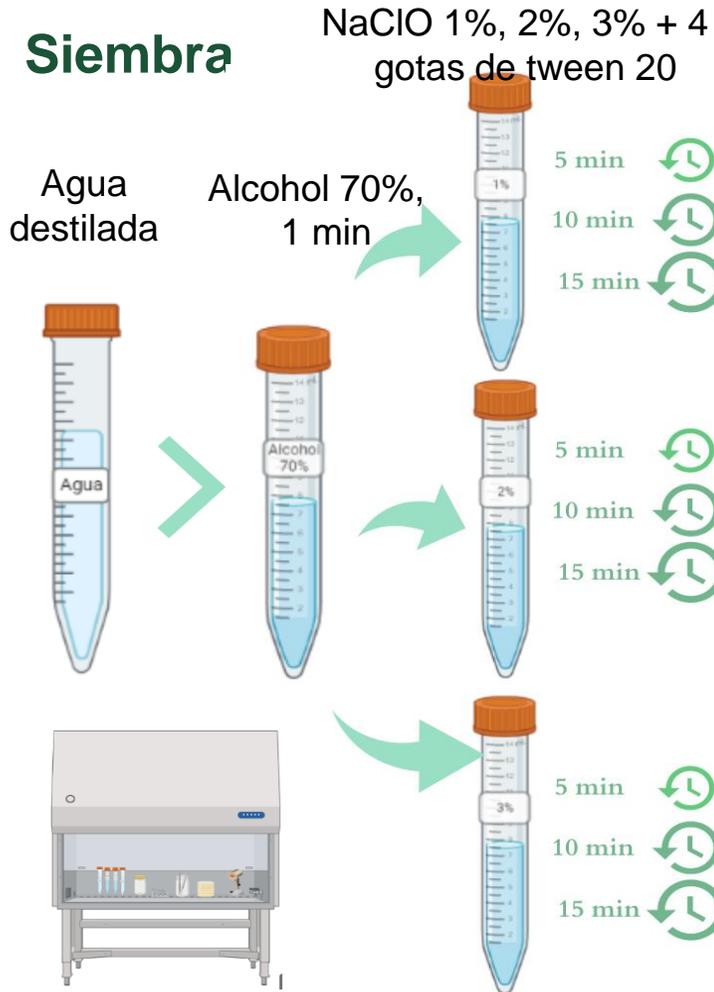


Embriones
viables

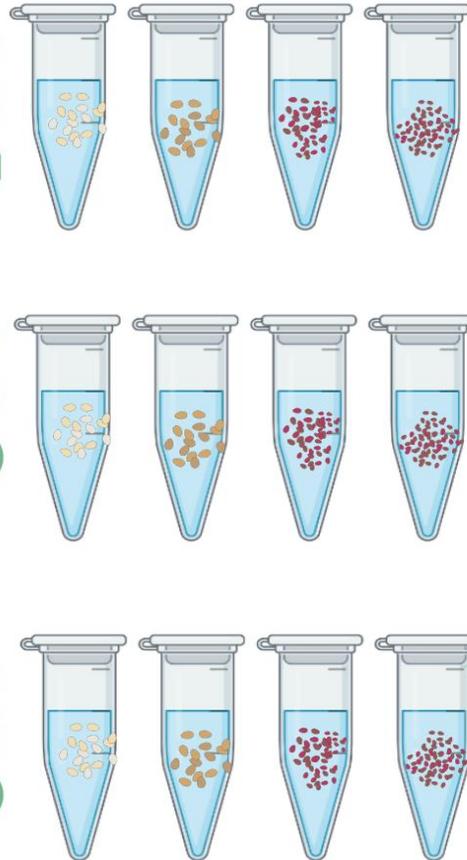
Embriones
no viables

Desinfección de semillas

Siembra



Tratamientos



Evaluación

Agua destilada estéril

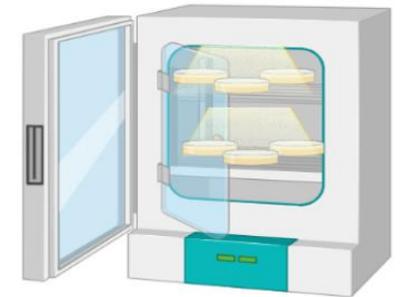
medio agar 1% - temperatura ambiente

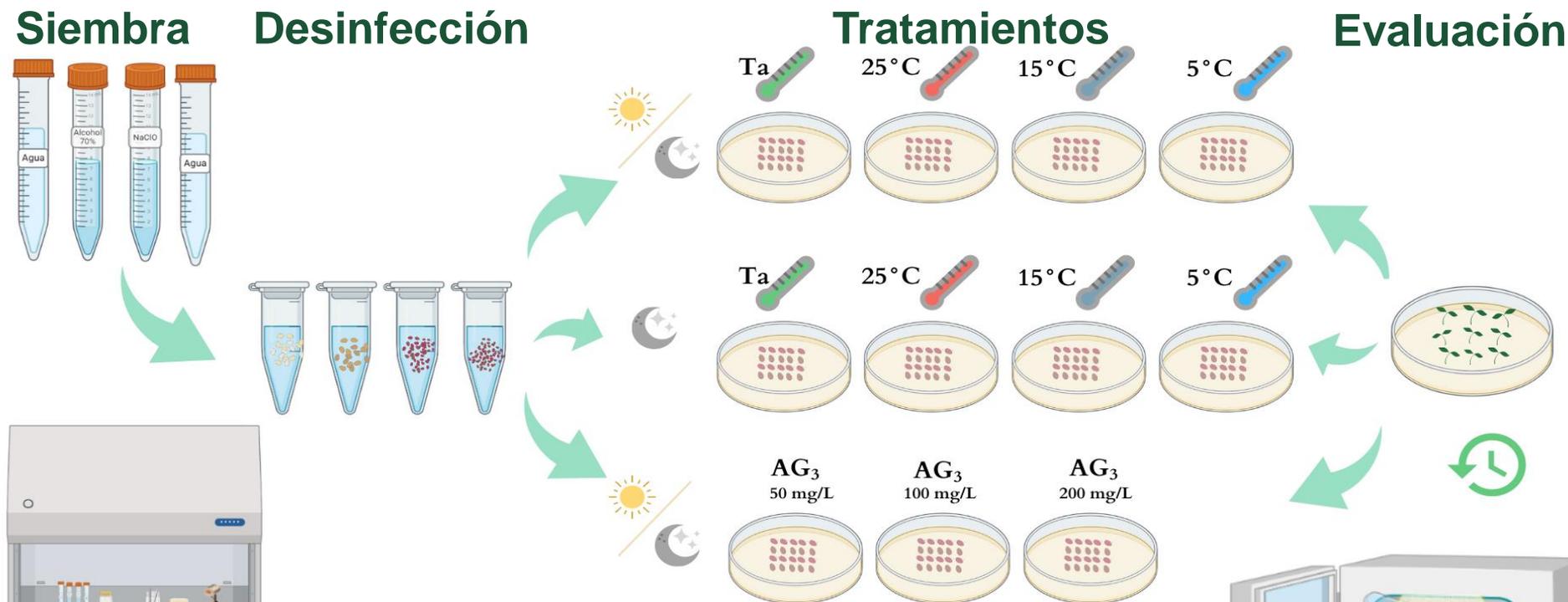
Ericaceae - 20 semillas

Rubiaceae - 15 semillas

3 repeticiones por tratamiento

Tratamiento	Condiciones
TD0	Control
TD1	1% NaClO - 5 min
TD2	1% NaClO - 10 min
TD3	1% NaClO - 15 min
TD4	2% NaClO - 5 min
TD5	2% NaClO - 10 min
TD6	2% NaClO - 15 min
TD7	3% NaClO - 5 min
TD8	3% NaClO - 10 min
TD9	3% NaClO - 15 min





Tratamiento	Condiciones
TG1	Temperatura ambiente; 12 horas luz / 12 oscuridad
TG2	Temperatura ambiente; oscuridad total
TG3	5 °C; 12 horas luz / 12 oscuridad
TG4	5 °C; oscuridad total
TG5	15 °C; 12 horas luz / 12 oscuridad
TG6	15 °C; oscuridad total
TG7	25 °C; 12 horas luz / 12 oscuridad
TG8	25 °C; oscuridad total
TG9	Temperatura ambiente; 12 horas luz / 12 oscuridad; 50 mg/L AG ₃
TG10	Temperatura ambiente; 12 horas luz / 12 oscuridad; 100 mg/L AG ₃
TG11	Temperatura ambiente; 12 horas luz / 12 oscuridad; 200 mg/L AG ₃

Índice de latencia (d)

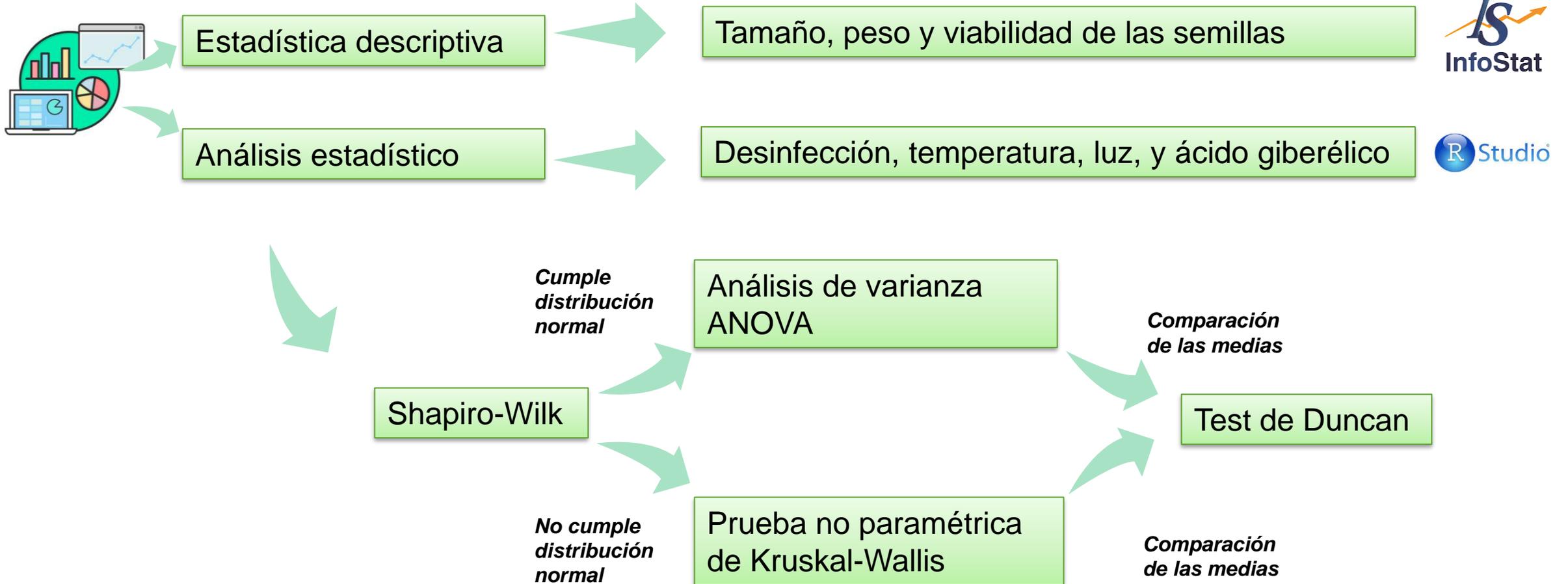
- Tiempo necesario para el inicio de la germinación

Porcentaje de germinación fisiológica (%)

- Las semillas germinadas con 1 mm de longitud de radícula

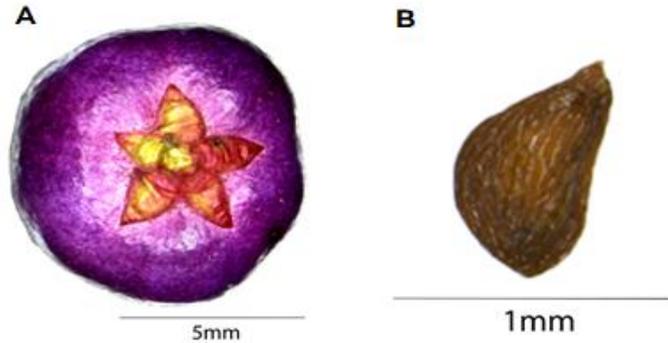


Estadística

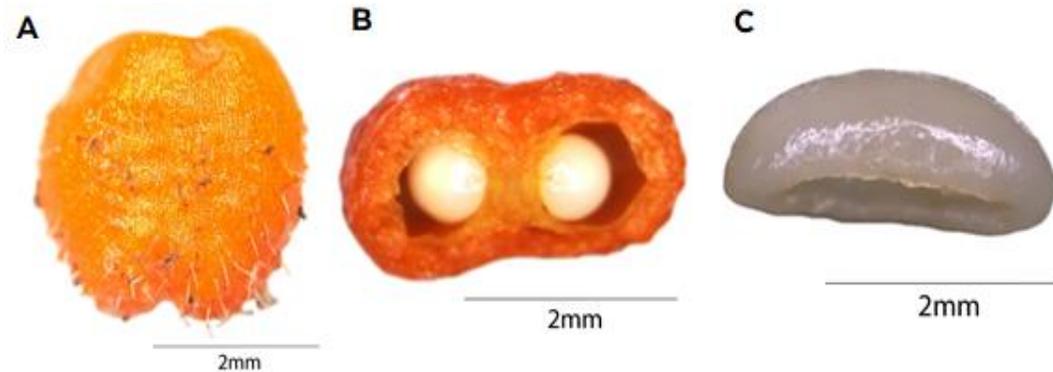


Análisis Morfológico del Fruto y Semilla

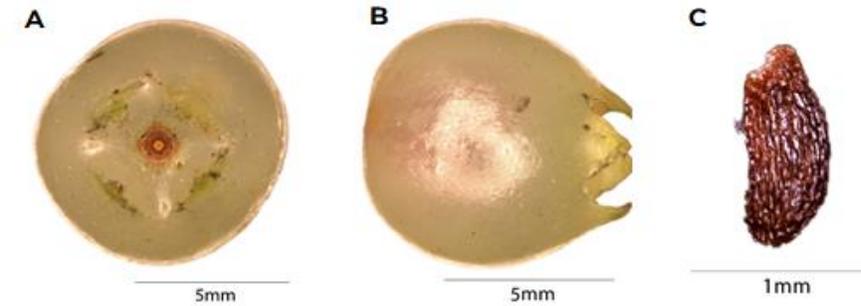
Pernettya prostrata. A) Vista frontal del fruto, B) Semilla



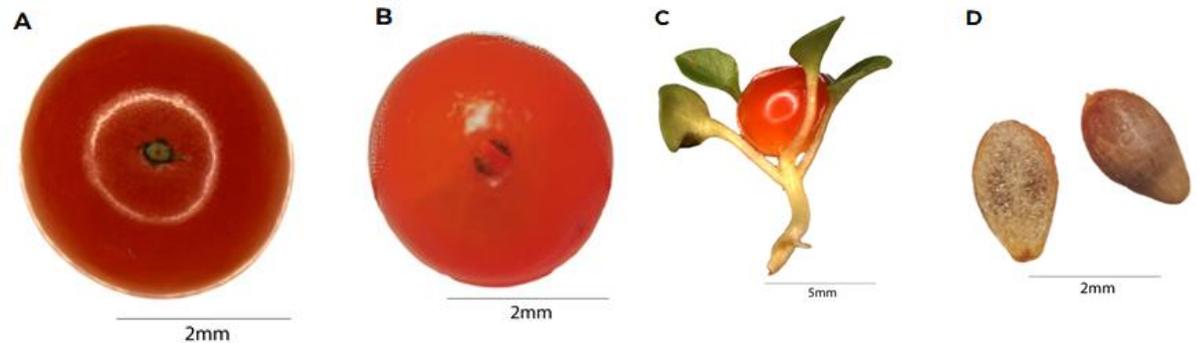
Galium hypocarpium. A) Vista lateral, B) Corte transversal, C) Semilla.



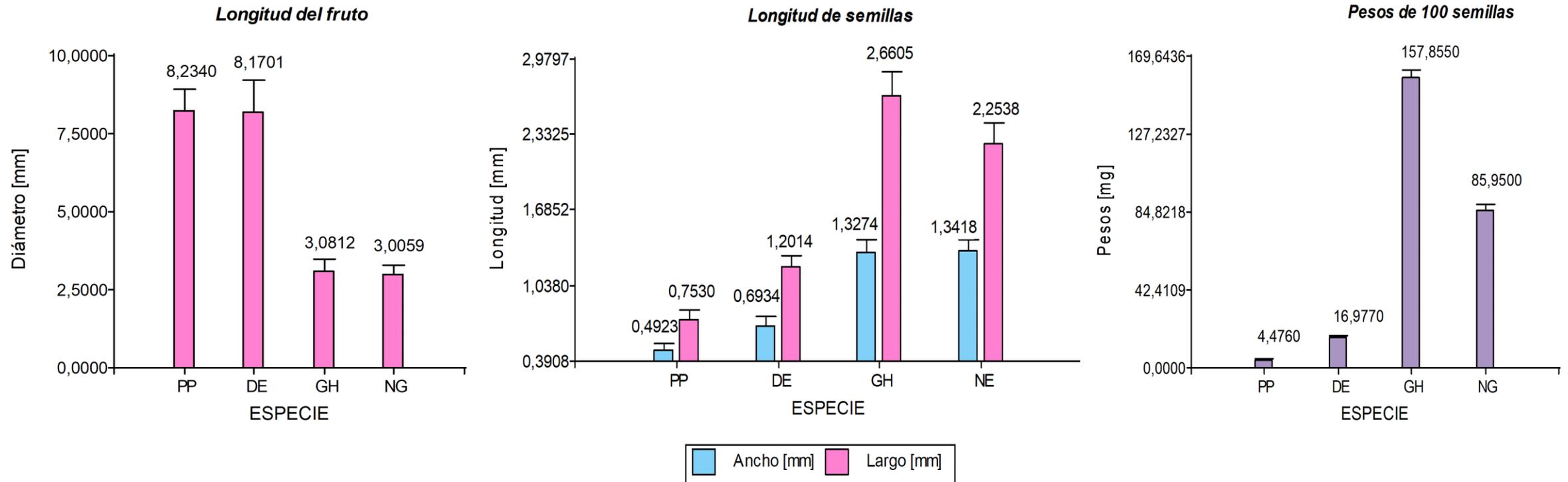
Disterigma empetrifolium. A) Vista frontal del fruto, B) Vista lateral del fruto, C) Semilla



Nertera granadensis. A) Vista Frontal, B) Vista trasera, C) Vista lateral con hojas, D) Semilla

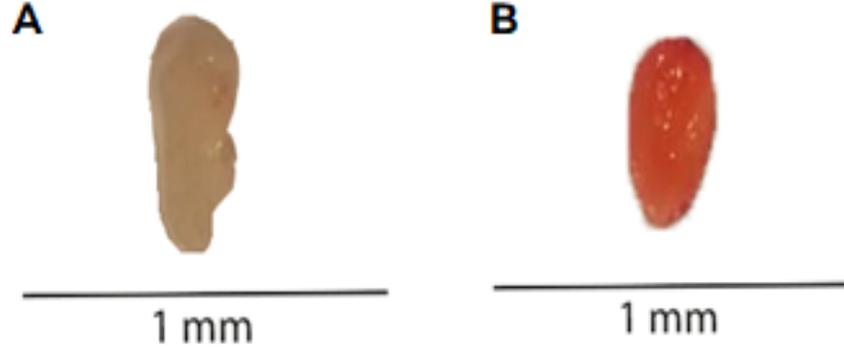


Análisis Morfológico del Fruto y Semilla

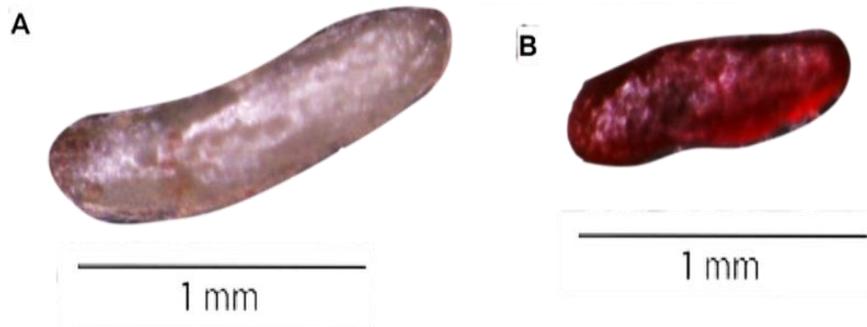


Viabilidad de Semillas: Prueba de Tetrazolio

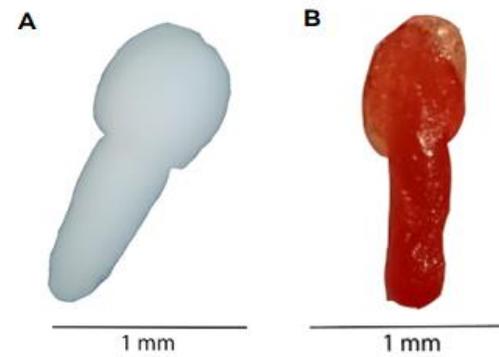
Pernettya prostrata



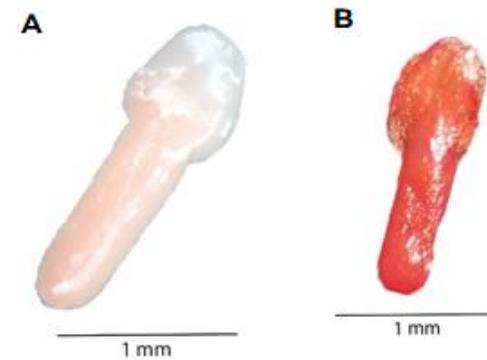
Disterigma empetrifolium



Galium hypocarpium



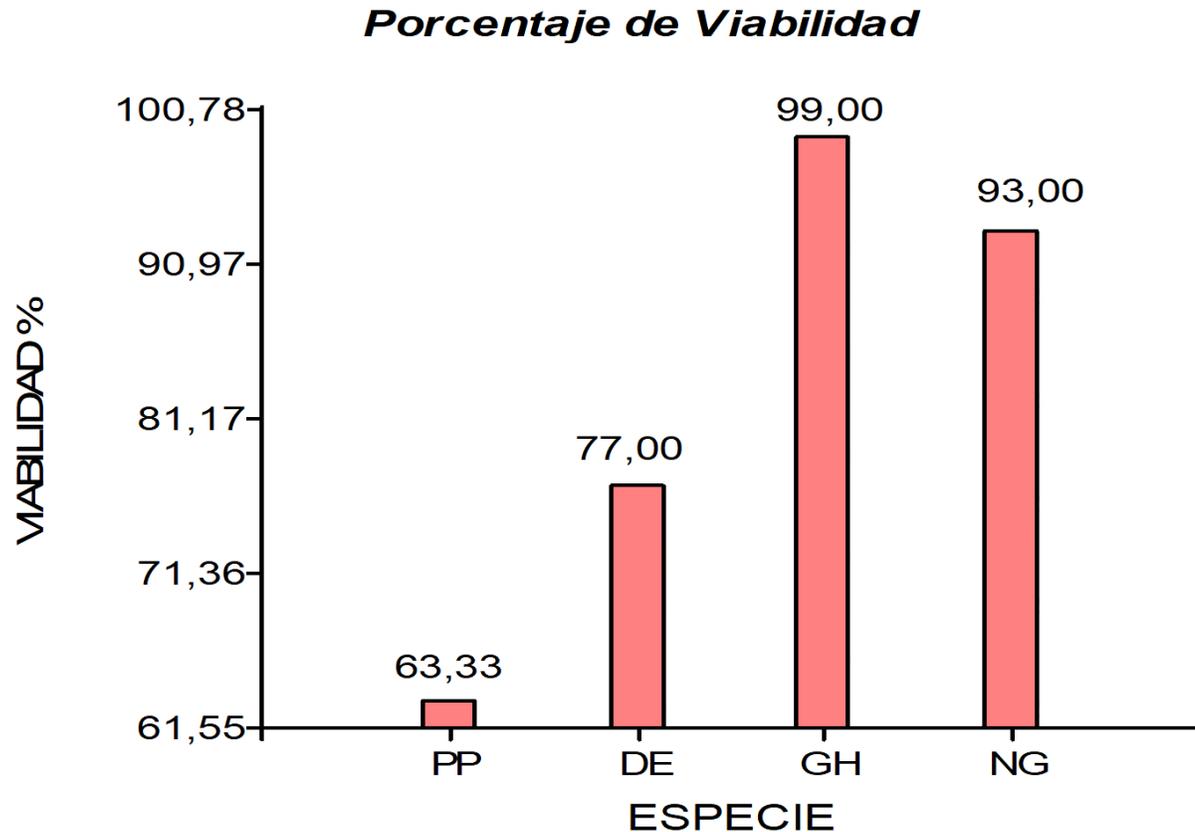
Nertera granadensis



A) Embrión no viable sin coloración

B) Embrión viable con coloración roja.

Viabilidad de Semillas: Prueba de Tetrazolio



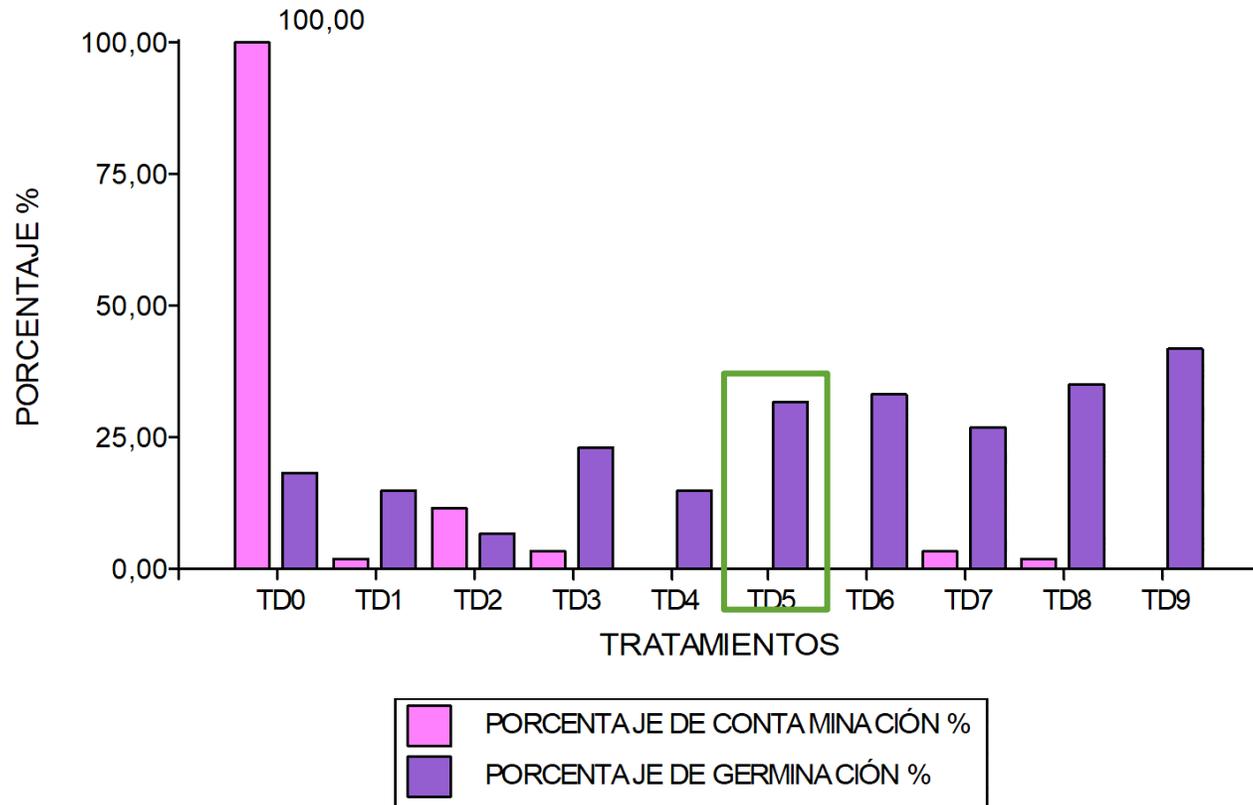
Las muestras estuvieron todas completas y con embrión

Los porcentajes altos muestran un gran potencial para su preservación en bancos de semillas

Desinfección de Semillas

Disterigma empetrifolium

Desinfección



Shapiro-Wilk, ($p=5.51e-10$) no siguen una distribución normal Kruskal-Wallis $p=0.0006663$ las medias de los tratamientos son diferentes

No existe una diferencia significativa entre los tratamientos

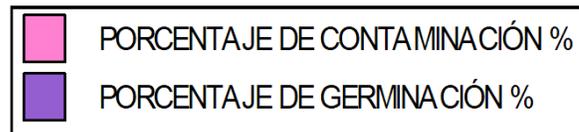
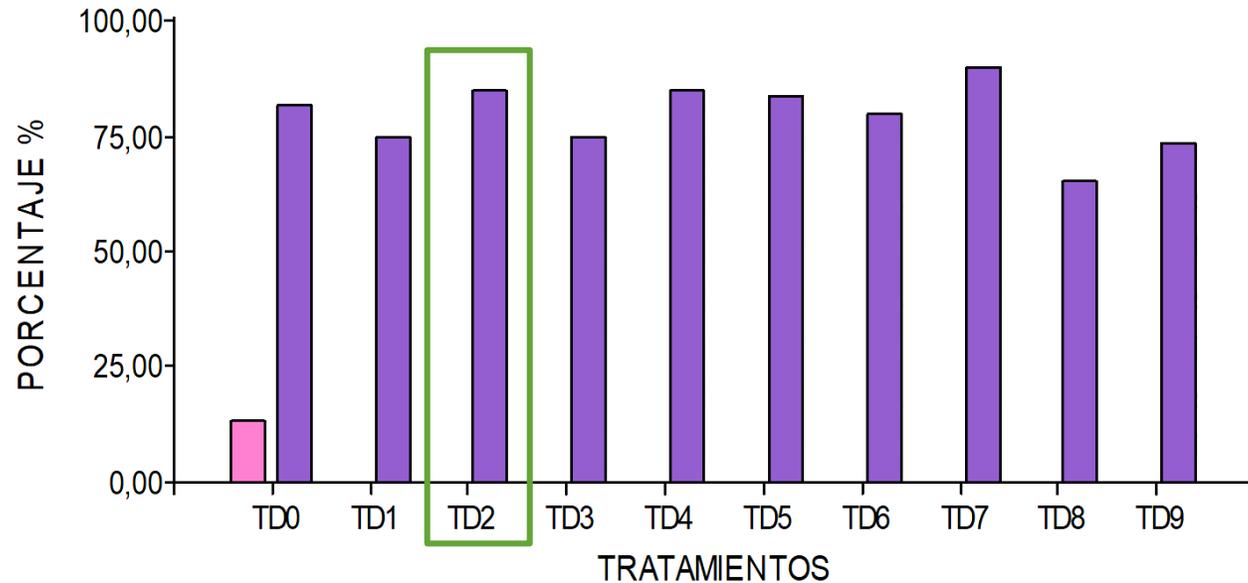
TD5 es considerada la mejor alternativa

Se elige un porcentaje bajo de hipoclorito en el menor tiempo posible, cuyo porcentaje de germinación no se ve afectado

Desinfección de Semillas

Pernettya prostrata

Desinfección



Shapiro-Wilk, ($p=5.51e-10$) no siguen una distribución normal Kruskal-Wallis $p=0.0006663$ las medias de los tratamientos son diferentes

No existe una diferencia significativa entre los tratamientos

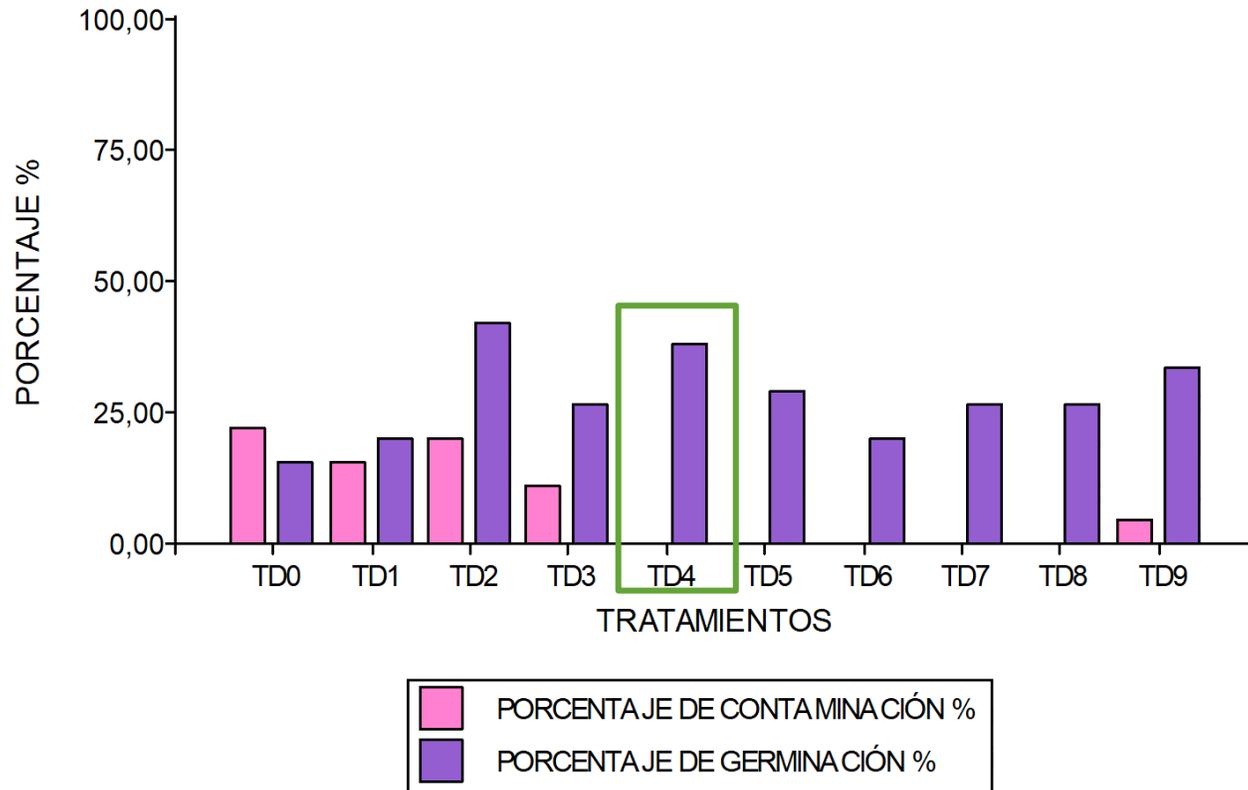
El tratamiento TD2 como el mejor

Se elige un porcentaje bajo de hipoclorito en el menor tiempo posible, cuyo porcentaje de germinación no se ve afectado

Desinfección de Semillas

Nertera granadensis

Desinfección



Sigue distribución no normal según la prueba de Shapiro-Wilk, con $p=0.01489$. Kruskal-Wallis $p=0.008091$ apunta a que los tratamientos no muestran diferencias

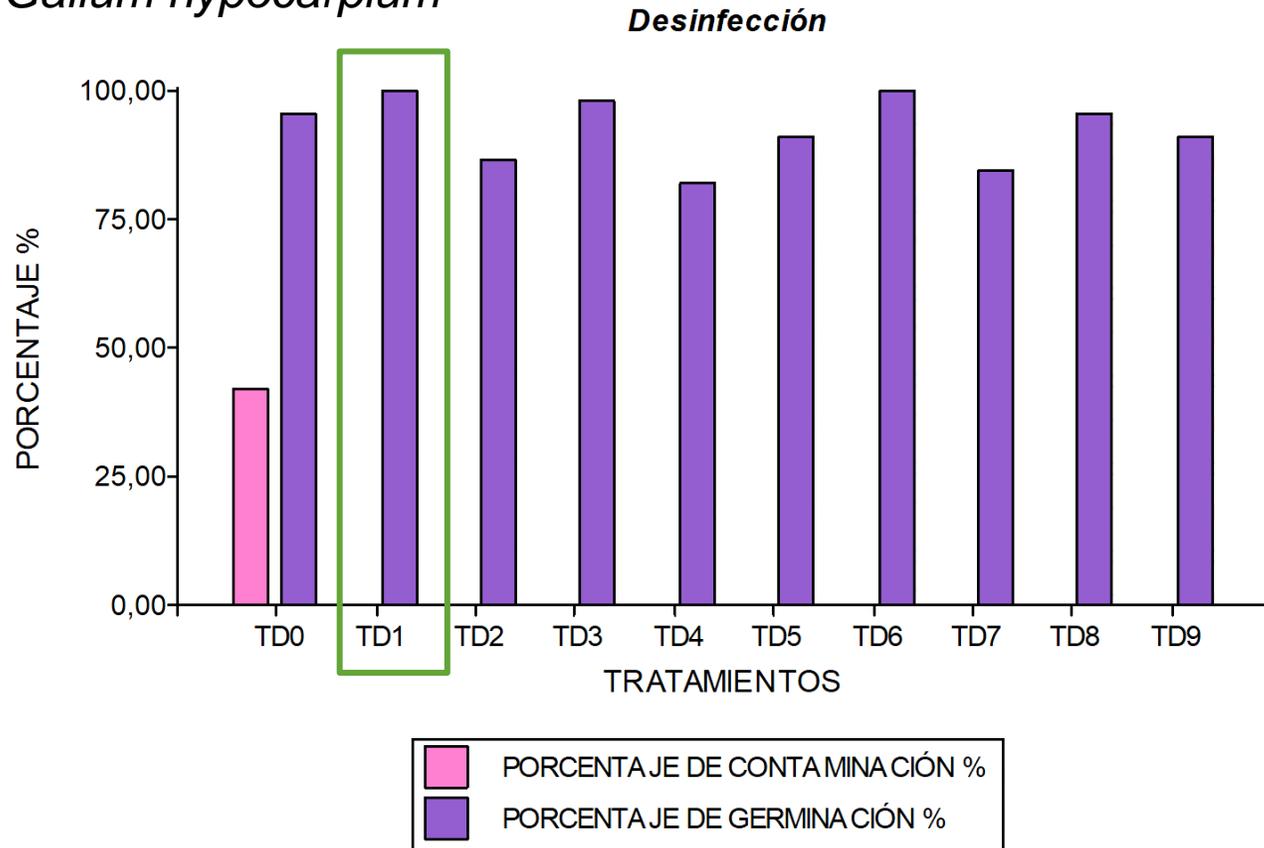
El análisis estadístico no determina diferencias significativas

Se considera al tratamiento TD4 como el mejor

Se elige un porcentaje bajo de hipoclorito en el menor tiempo posible, cuyo porcentaje de germinación no se ve afectado

Desinfección de Semillas

Galium hypocarpium



Shapiro-Wilk, ($p=4.45e-10$) no siguen una distribución normal Kruskal-Wallis $p=0.0006724$ las medias de los tratamientos no son diferentes

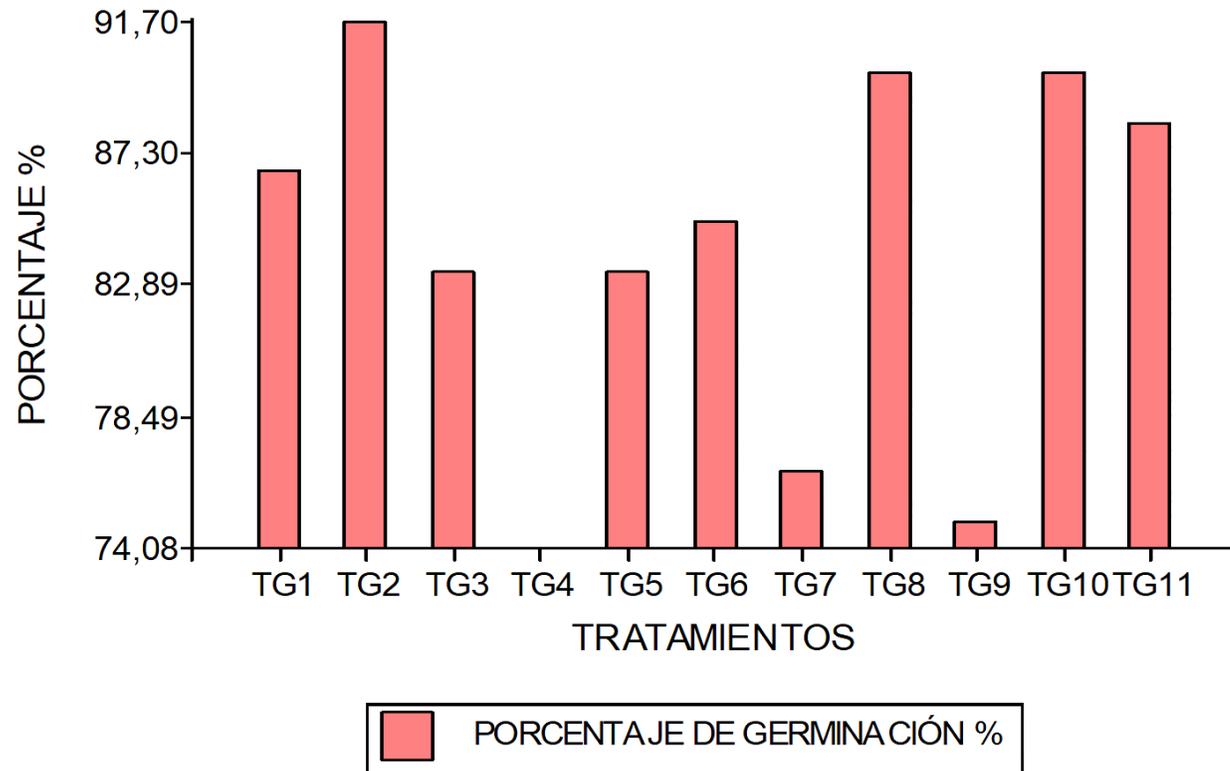
Se obtuvo un 0% de porcentaje de contaminación en todos los casos

Se eligió al TD1 como el mejor tratamiento

Se elige un porcentaje bajo de hipoclorito en el menor tiempo posible, cuyo porcentaje de germinación no se ve afectado

Germinación in vitro

Germinación en *P. prostrata*

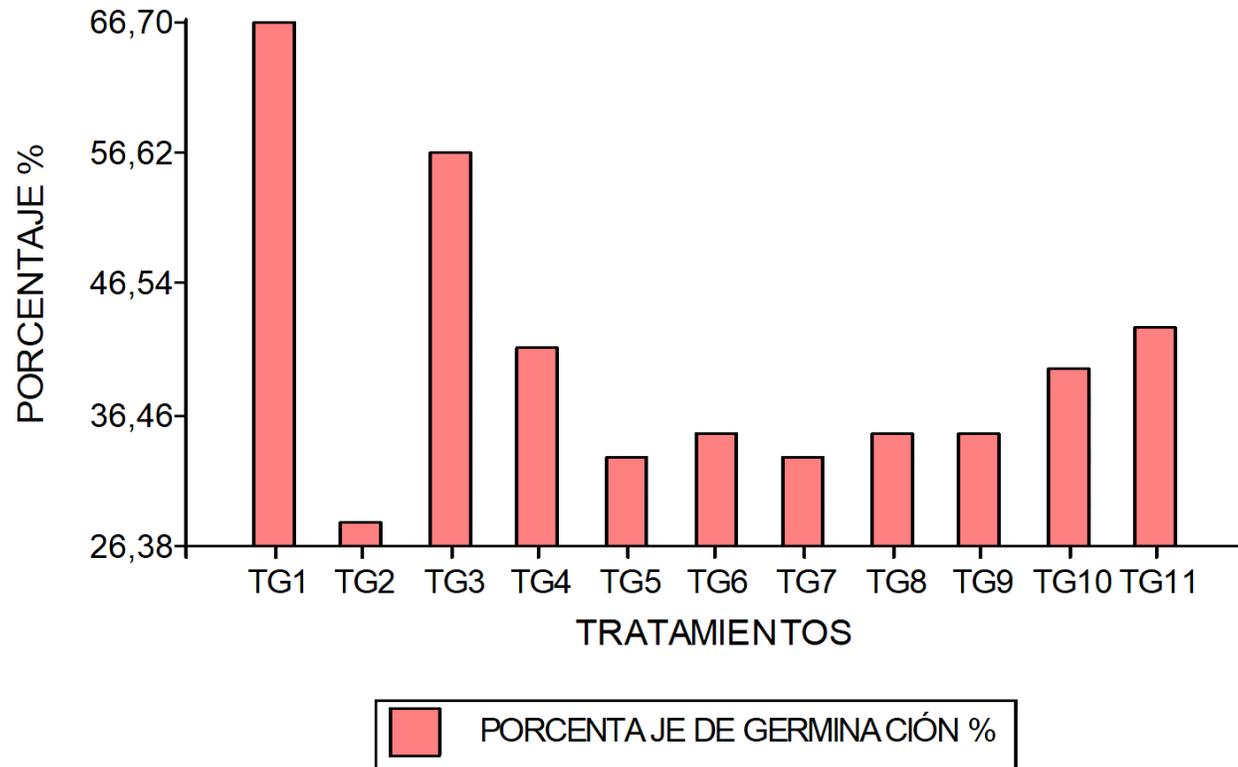


Fotoblástica neutra

El mayor porcentaje de germinación en menor tiempo es el TG2.

Germinación in vitro

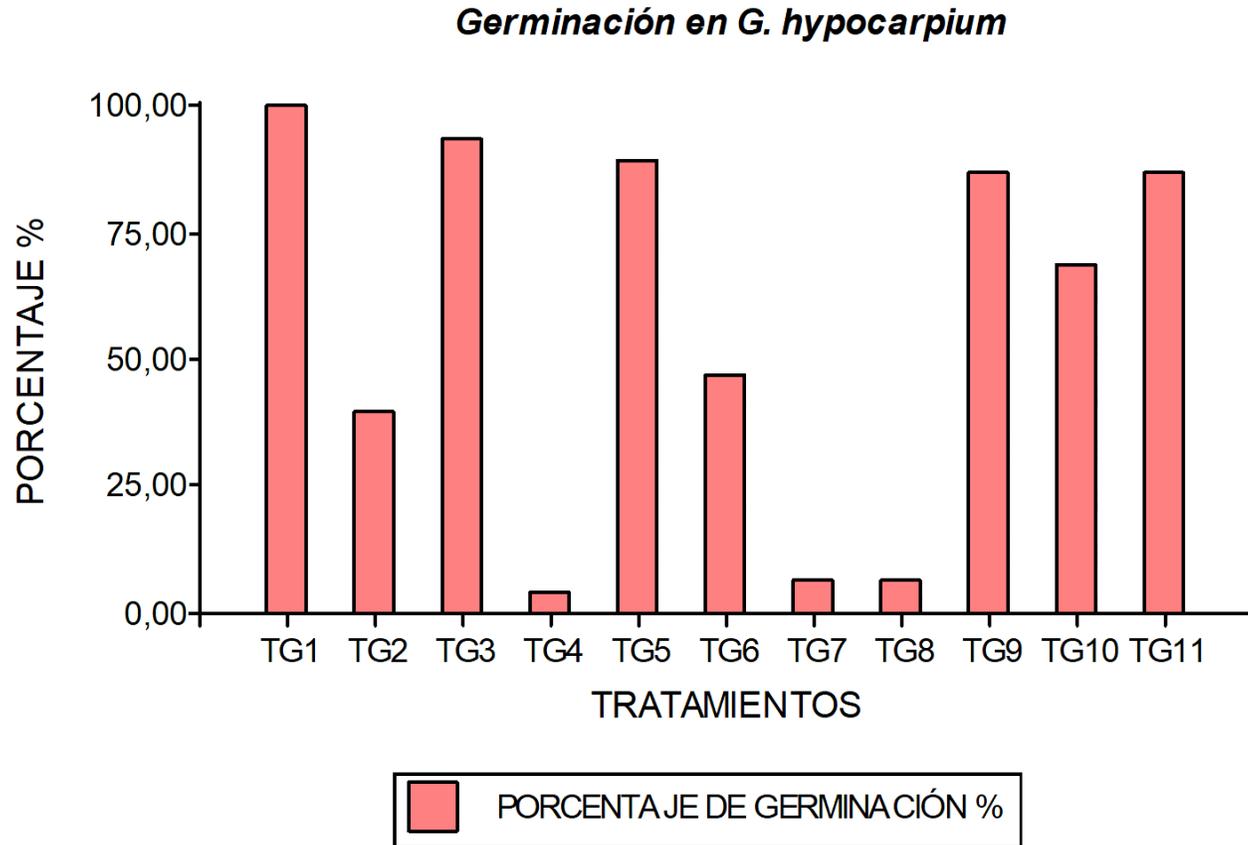
Germinación en *D. empetrifolium*



La luz parece favorecer a baja temperatura

El mayor porcentaje de germinación en menor tiempo es el TG1.

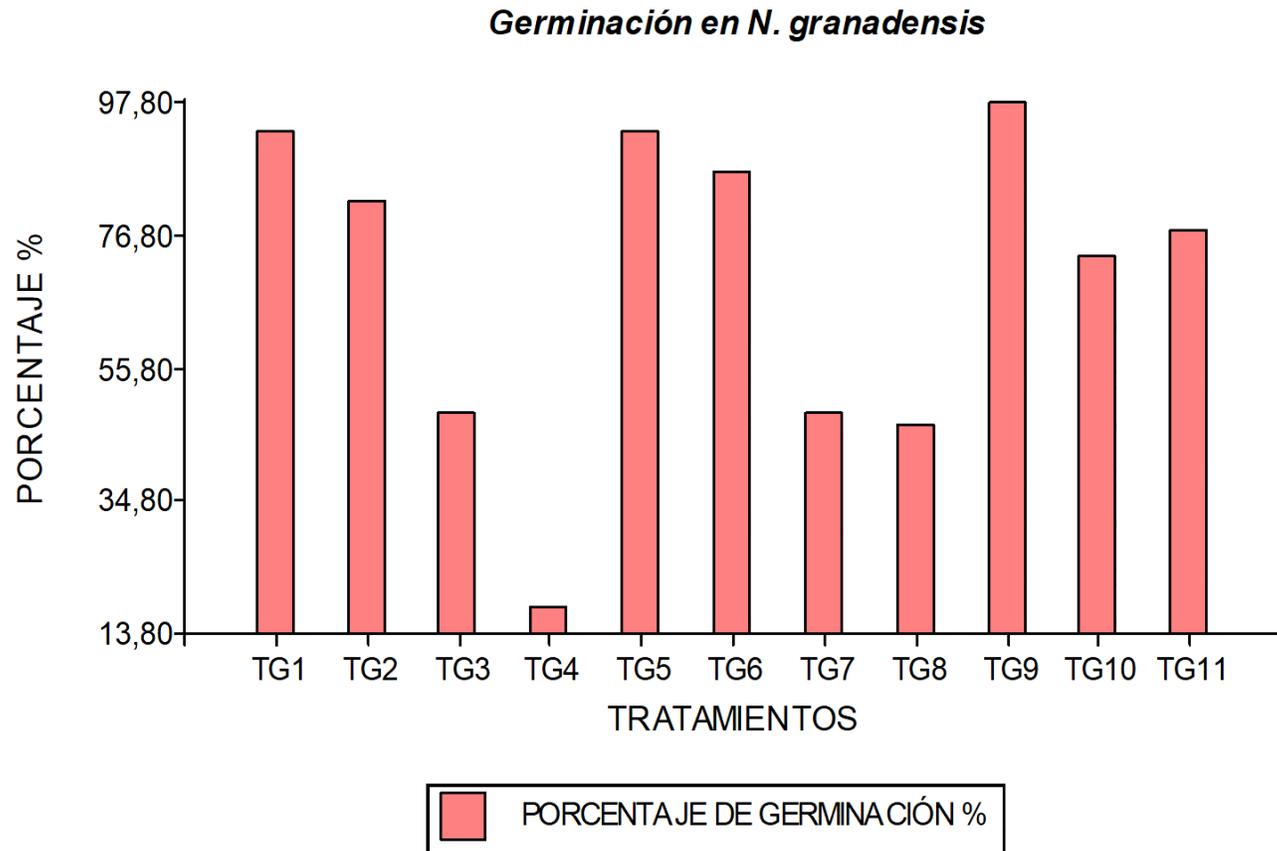
Germinación in vitro



Fotoblastia positiva se con excepción a 25°C

El mejor tratamiento es TG1

Germinación in vitro



Fotoblastia positiva

El mayor porcentaje de germinación en menor tiempo es el TG1.

Las características morfológicas del peso de 100 semillas y tamaño (ancho y largo) de semillas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. son **4.47 mg, 0.49 y 0.75 mm**, *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude son **16.97 mg, 0.69 y 1.20 mm**, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. son **157.85 mg, 1.32 y 2.66 mm** y finalmente en *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) son **85.95 mg, 1.34 y 2.25 mm** respectivamente.

El porcentaje de viabilidad de semillas fueron en *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. es de **63%**, *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude es **77%**, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. es **99%** y del **93%** en *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce lo cual describe sus rasgos de historia de vida reproductiva previa a la germinación.



El tratamiento con el menor porcentaje de contaminación de semillas correspondiente a cada una de las especies fue **TD2 (1% NaOCl, 10 min)** en *Pernettya prostrata* (Cav.) DC, el **TD5 (2% NaOCl, 10 min)** en *Disterigma empetrifolium* (Kunth) Drude, el **TD1 (1% NaOCl, 5 min)** *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. y **TD4 (2% NaOCl, 5 min)** *Nertera granadensis* (Mutis ex L. f.) Druce para su aplicación como pretratamiento al estudio de germinación.



Se determinó que la temperatura ambiental de entre **15,6 a 21,7°C** tiene un efecto positivo sobre el porcentaje de germinación de las semillas de cuatro especies de estudio. En las especies de la familia *Ericaceae*, *P. prostrata* presenta **fotoblastia neutra**, mientras que, en *D. empetrifolium* no se obtuvieron resultados claros. Por otro lado, las dos especies de **la familia Rubiaceae tienen fotoblastia positiva**. **El ácido giberélico a pesar de que sugiere un efecto positivo** en la germinación de las especies de la familia *Ericaceae*, se requieren estudios posteriores. En las especies de la familia *Rubiaceae*, en *G. hypocarpium* **no parece ser necesario el uso de AG3** y de manera contraria en *N. granadensis* **si se presenta una mejora en la germinación a 50mg/l.**



En las especies estudiadas en este trabajo, se consideran las muestras de semillas pequeñas por ende se recomienda utilizar pinzas entomológicas para una mejor manipulación.

En la desinfección de semillas es importante etiquetar adecuadamente, y cuidar los tiempos determinados. Su manipulación es compleja, utilizar tubos eppendorf de 2 mL ayuda a una desinfección más amigable. En las especies de la familia Ericaceae procurar tener muestra extra en cada tratamiento.

Usar tubos falcón y mantener en refrigeración las muestras de frutos, ayuda a la conservación de estas estructuras, previamente realizar un lavado con agua destilada. Así el material vegetal será procesado en el laboratorio, preserva su estructura sin ser afectada en su morfología.



Realizar ensayos con diferentes termoperiodos y fotoperiodos, tratando de utilizar rangos (altos, medios y bajos), tratando de simular las condiciones normales de temperatura (diferenciar día y noche), si se cuenta con cámaras de germinación. Estos estudios permiten establecer el rango de temperatura óptimo para la germinación *in vitro* de las semillas.

Al emplear ácido giberélico en los medios de cultivo, se recomienda aumentar los rangos de concentraciones evaluados para que se pueda determinar con mayor veracidad si se produce un efecto positivo, negativo, o neutro en la germinación.

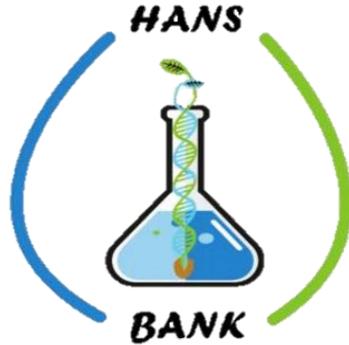


AGRADECIMIENTOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

María Claudia, Segovia Salcedo, PhD
Directora del proyecto



INABIO
Instituto Nacional de Biodiversidad

ESPE-Innovativa
EMPRESA PÚBLICA



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA