

Comportamiento germinativo de semillas de agraz *Vaccinium meridionale* Swartz con ácido giberélico (AG₃) y el nitrato de potasio (KNO₃).



Gelen Yesenia Camayo Rosero

Fundación Universitaria de Popayán
Facultad de Ciencias Administrativas, Económicas y Contables
Administración de Empresas Agropecuarias
Popayán
2019

Comportamiento germinativo de semillas de agraz *Vaccinium meridionale* Swartz con ácido giberélico (AG₃) y nitrato de potasio (KNO₃).

Gelen Yesenia Camayo Rosero

Proyecto de trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Administradora de Empresas Agropecuarias

**Ing. Msc. Carlos Augusto Martínez Mamán
Admra. Katherin Johana Cuchumbe Avirama
Directores**

**Fundación Universitaria de Popayán
Facultad de Ciencias Administrativas, Económicas y Contables
Administración de Empresas Agropecuarias
Popayán
2019**

Dedicatoria

A mis padres.

Ángel David Camayo y Gloria Cecilia Rosero, los pilares fundamentales en mi vida, por haberme forjado como la persona íntegra y con valores que soy hoy en día; muchos de mis logros se los debo a ustedes, gracias por su amor, esfuerzo, sacrificio y dedicación como padres y sobre todo por ser ejemplos de vida para mí y mis hermanos.

A mis hermanos.

Larry, Jonatan y Ángel, por apoyarme incondicionalmente en el transcurso de mi vida y sobre todo en mi carrera universitaria.

A mis docentes.

Por desarrollar con excelencia su labor como docentes y haberme compartido los conocimientos necesarios para ser una profesional íntegra.

Agradecimientos

A mis compañeros y colegas de carrera los cuales han aportado experiencias gratificantes en esta etapa, especialmente a mi compañera y amiga Katerine Ciclos por brindarme su apoyo incondicional.

A mi Universidad la Fundación Universitaria de Popayán y en especial al programa de Administración de Empresas Agropecuarias por permitir ser parte del grupo de personas que buscan ayudar y contribuir al progreso del sector más importante del país como lo es el sector agropecuario.

A mi director del proyecto Ing. Carlos Augusto Martínez, a la codirectora Admra. Katherin Johana Cuchumbe Avirama y a la Ing. Sandra Lorena López Quintero por compartir todos sus conocimientos durante en este proceso, gracias por confiar en mí, por motivarme y apoyarme en cada una de las etapas del proyecto investigativo y sobre todo por brindarme su amistad. Gracias por haber decidido ser maestros.

Contenido

Resumen.....	8
Introducción	10
1. Objetivos	11
1.1. Objetivo general.....	11
1.2. Objetivos específicos	11
2. Marco teórico	12
2.1. Generalidades del agraz	12
2.1.1. Beneficios del agraz.....	13
2.1.2. Taxonomía.....	13
2.1.3 Morfología	13
2.2. Reproducción en plantas.....	16
2.2.1. Reproducción asexual.....	16
2.3. Reproducción sexual.....	17
2.4. Fitohormonas.....	18
2.4.1. Giberelinas.....	19
2.5.Sustancias estimulantes.....	19
2.5.1. Nitrato de potasio.....	19
2.8. Dormancia en semillas.....	21
2.8.1. Dormancia Primaria.....	21
2.8.2. Dormancia endógena.....	22
2.8.3. Dormancia secundaria.....	22
2.10.Antecedentes.....	23
3. Metodología	25
3.1. Localización.....	25
3.2. Material biológico.....	25
3.3. Diseño experimental	26
3.3.1. Procedencia	26
3.3.2. Hormonas	27
3.4. Montaje	28
3.4.1.Esterilización de materiales de laboratorio.....	29
3.4.2. Desinfección de semillas.....	29

3.4.3. Extracción de semillas.....	29
3.4.4. Prueba de viabilidad	29
3.4.5. Preparación de hormonas	30
3.5. Variables a evaluar	30
3.6. Análisis de la información	31
4. Resultados	32
4.1. Viabilidad de semillas de agraz según su procedencia	32
4.2. Análisis de varianza de las variables de estudio	33
4.3. Rompimiento de testa según concentración de hormona estimulante	34
4.4. Porcentaje de semillas con emergencia de hojas y desarrollo de radícula	36
4.5. Emergencia por origen.....	37
5. Conclusiones	40
6. Recomendaciones.....	41
Bibliografía	42

Figuras

Figura 1. Flores de agraz	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Frutos de agraz	15
Figura 3. Mapa Municipio de Timbio.....	25
Figura 4 .Clasificación de Frutos de agraz.....	25
Figura 5. Mapa Municipio de San Sebastián	26
Figura 6. Mapa Municipio de Quintana.....	27
Figura 7. Concentración de hormonas	¡Error! Marcador no definido.

Resumen

Con el propósito de aportar a la domesticación de agraz *Vaccinium meridionale Sw.*, el presente proyecto de investigación evaluó el efecto que tiene diferentes concentraciones de una fitohormona, Acido Giberélico, y una sustancia estimulante, Nitrato de potasio, en semillas de agraz provenientes de dos zonas alto andinas del departamento del Cauca, en condiciones controladas en el laboratorio de Biología de la Fundación Universitaria de Popayán, sede Los Robles. Se observó el comportamiento en el rompimiento de testa de las semillas bajo un diseño experimental completamente al azar con 5 repeticiones, en un arreglo factorial 5x2; el primer factor está dado por 5 concentraciones de hormonas (0 ppm, 500 y 1000 ppm de AG₃, 500 y 1000 ppm de KNO₃), y el segundo factor se debe a la procedencia de las semillas, vereda Quintana del municipio de Popayán y vereda Valencia del municipio de San Sebastián. El seguimiento se realizó cada 8 días durante un periodo de 8 semanas.

La investigación mostró, a partir del análisis de varianza, que existe diferencia significativa en la viabilidad de las semillas de acuerdo a su procedencia, siendo las semillas de Valencia viables (61%) que las de Quintana (51%). Para la semana dos y cuatro de la investigación, las semillas imbibidas en 500 ppm de KNO₃ evidenciaron un porcentaje mayor (11% y 21,2%) para el rompimiento de testa, frente al tratamiento testigo (1,6% y 9,6%) respectivamente. Los mejores tratamientos para las variables emergencia de semillas y desarrollo de radícula, fueron las semillas embebidas en nitrato de potasio en concentración de 500ppm (9,4% y 20,4%) mientras que las semillas testigo mantuvieron un porcentaje menor de 2% y 13,2%, respectivamente.

Palabras claves: estimulantes germinativos, fitohormonas, viabilidad, emergencia.

Abstract

With the purpose of contributing to the domestication of agraz *Vaccinium meridionale* Sw., The present research project evaluated the effect of different concentrations of a phytohormone, Gibberellic Acid, and a stimulating substance, Potassium Nitrate, on agrarian seeds from two High Andean areas of the department of Cauca, under controlled conditions in the Biology laboratory of the University Foundation of Popayán, Los Robles headquarters. Behavior of the seed testa was observed under a completely randomized experimental design with 5 repetitions, in a 5x2 factorial arrangement; the first factor is given by 5 concentrations of hormones (0 ppm, 500 and 1000 ppm of AG3, 500 and 1000 ppm of KNO₃), and the second factor is due to the origin of the seeds, Quintana village in the municipality of Popayán and vereda Valencia of the municipality of San Sebastián. The follow-up was done every 8 days over a period of 8 weeks.

The investigation showed, based on the analysis of variance, that there is a significant difference in the viability of the seeds according to their origin, the seeds of Valencia being viable (61%) than those of Quintana (51%). For week two and four of the investigation, the seeds imbibed in 500 ppm of KNO₃ showed a higher percentage (11% and 21.2%) for the breaking of the testa, compared to the control treatment (1.6% and 9.6 %) respectively. The best treatments for the variables of seed emergence and radicle development were the seeds embedded in potassium nitrate in a concentration of 500ppm (9.4% and 20.4%) while the control seeds maintained a percentage lower than 2% and 13.2%, respectively.

Keywords: germinative stimulants, phytohormones, viability, emergency.

Introducción

El agraz *Vaccinium meridionale* Swartz es una planta silvestre nativa de las regiones andinas de Suramérica, con alto potencial como fruta comestible para el mercado nacional e internacional, perteneciente a la familia Ericaceae y que crece en Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela y Jamaica donde se considera una planta promisoriosa debido a su composición de antocianinas y fenoles totales que se les atribuye actividad antioxidante Castrillon, Carvajal, Ligarreto, y Magnistkiy (2008). Las bayas se obtienen principalmente a partir de procesos extractivistas de los bosques, esto genera destrucción de algunas poblaciones naturales, desequilibrio ambiental y erosión genética (Medina, Lobo, Cataño y Cardona, 2015).

En su hábitat natural, las plantas de agraz se propagan sexual y asexualmente, ésta última se realiza principalmente mediante tallos plagiotrópicos, tal como rizomas o estolones, mientras que la importancia para la propagación sexual es desconocida ya que la germinación y el desarrollo de las plántulas se ven obstaculizados por factores como la fluctuación de la humedad, la temperatura y la luz, las semillas de *Vaccinium meridionale* son fotoblásticas positivas, presentan latencia fisiológica poco profunda (Surez, Hernandez, y Mancipe, 2018) también presentan dificultades de manejo, incluyendo su reducido tamaño, número y forma de las semillas y bajos porcentajes de germinación (Castrillon et al, 2008).

Sobre este aspecto, Ligarreto y Stanislav (2007) aseguran que las fitohormonas juegan un papel importante en el crecimiento, floración, y especialmente en la latencia de las semillas, siendo cinco los grupos de hormonas vegetales, citoquininas, giberelinas, auxinas, etileno y el ácido abscisico, las giberelinas una de las hormonas más utilizadas para activar parcialmente la latencia en semillas e inducir el crecimiento en altura de las plantas, del mismo modo, el nitrato de potasio como estimulante puede romper la latencia en semillas (Jordán y Casaretto, 2006).

En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo el análisis del comportamiento de semillas de agraz bajo el estímulo de una fitohormona, ácido giberelico (GA_3), y una sustancia estimulante, nitrato de potasio (KNO_3), con el fin contribuir al desarrollo de un protocolo de germinación y brindar nuevas alternativas para el establecimiento de futuros cultivos, fomentando la siembra y conservación de especies nativas que pueden llegar a tener posibilidades en el comercio nacional e internacional.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Evaluar el comportamiento germinativo de semilla sexual de agraz *Vaccinium meriodanale* Swartz bajo condiciones de laboratorio

1.2. Objetivos específicos

- Analizar el comportamiento germinativo de las semillas de agraz de acuerdo a su zona de origen
- Estudiar el comportamiento germinativo de las semillas de agraz a partir del estímulo de dos concentraciones de ácido giberelico (GA_3) y nitrato de potasio (KNO_3)

2. Marco teórico

2.1. Generalidades del agraz

Vaccinium meridionale Swartz (agraz) ha sido mencionado por Gaviria, et al, (2009) como una de las especies productoras de frutos comestibles de zonas frías y templadas del país, sin embargo, hasta ahora comienza a observarse con buena aceptación, despertando el interés por este fruto, incluso en distintas presentaciones; fresco, en dulces, conservas y yogurt.

El agraz se encuentra en estado silvestre, en las tres cordilleras colombianas, entre los 1800 hasta los 3000 m.s.n.m.; se desarrolla mejor en suelos ácidos, bosques secundarios, y en rastrojos bajos, pero también se encuentra, frecuentemente, en el sotobosque en plantaciones de pino y ciprés. (Calderon y Socha, 2009).

En Colombia, el agraz se encuentra en poblaciones silvestres de los bosques alto andinos (Rincon et al., 2012) intercalado frecuentemente con plantaciones de coníferas; esto favorece las asociaciones micorrizógenas de la planta, y su adaptación a suelos ácidos. Las especies de *Vaccinium* contribuyen a la diversidad biológica, por estar correlacionadas con la abundancia de mamíferos y aves presentes en los hábitats, siendo una fuente importante de alimento para la fauna silvestre, la cual, a su vez, actúa como dispersora natural de la especie ya que, al consumir su baya, transportan semillas a otros lugares. Debido a la mala extracción del fruto las poblaciones silvestres han sufrido procesos de pérdida por deforestación, reconversión productiva, fragmentación, perturbación por la extracción de la llamada "tierra de capote", lo que provoca daños en el sistema radical, deterioro y muerte de individuos por prácticas inadecuadas de cosecha y el corte de ramas para su utilización en floristería (Hernandez, et al, 2009).

Según Viteri (2018) ciertos componentes orgánicos son responsables de su sabor como la fructuosa, la glucosa y el ácido málico; la industria alimenticia le potencia al agraz como un ingrediente alimenticio funcional por sus propiedades beneficiosas para la salud asociadas con la presencia de sus compuestos activos, especialmente antocianinas y otros componentes como vitaminas, potasio, hierro y calcio.

2.1.1. Beneficios del agraz. La importancia de los *Vaccinium* deriva de la presencia de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes, lo cual se ha reconocido en las taxa con bayas azules (“blueberries”), al cual pertenece el agraz o mortiño. Al respecto, se ha reportado en los *Vaccinium* azules tipo arándano, un contenido elevado de antioxidantes polifenólicos, los que incluyen antocianinas y flavonoides. Lo anterior ha sido comprobado en estudios realizados en diversas partes del mundo (Gaviria et al., 2009).

La presencia de antocianinas y fenoles en los *Vaccinium* azules, a los cuales pertenece el mortiño y otros taxa del género, ha sido asociada con la reducción en los riesgos de adquirir cáncer por la inhibición en el crecimiento de las células malignas y también con una disminución en el proceso de evolución del mal de Alzheimer y del envejecimiento prematuro. Adicionalmente, a través de animales de laboratorio se ha encontrado que las bayas de este claro tienen efecto sobre la presión sanguínea, la disminución de niveles de colesterol, las enfermedades de tracto urinario y la reducción en el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Gaviria et al., 2009).

2.1.2. Taxonomía. La familia de las Ericáceas, está formada principalmente por plantas leñosas (arbustos), aunque también herbáceas que pertenece al orden de los Ericales de la clase Magnoliopsida, (Tabla 1) comprende un total de 125 géneros y más de 4000 especies. De la familia de las Ericáceas, el género *Vaccinium* es uno de los más abundantes con 450 especies distribuidas desde Asia hasta los Andes (Zuñiga, 2017).

3. *Tabla 1: Taxonomía del agraz*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida.
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae.
Género	<i>Vaccinium.</i>
Especie	<i>meridionale Sw</i>

Fuente. Calderon y Socha (2009)

2.1.3 Morfología. Las especies de este género son arbustos siempre verdes que varían de tamaño, desde porte muy bajo de 0,3 m hasta 5,0 m de altura; el sistema radicular se compone

de una red de raíces superficiales que al envejecer se cubren de una fina corteza gris, las hojas son alternas, dentadas o aserradas, con pecíolos cortos; pueden ser caducas o perennes, ovales a lanceoladas y poseen estomas solo en el envés. Las flores son pequeñas, de color blanco, cáliz con los sépalos unidos, son pedunculadas, pueden ser terminales o axilares y presentarse solitarias o en racimos, con diferentes tonos como blanco, rosado poco intenso y rojo, el ovario es ínfero porque está unido al cáliz que tiene de cuatro a cinco dientes. La corola es acampanada y se compone de cuatro a cinco lóbulos, mientras que el androceo presenta de ocho a diez estambres (Figura 1). El mecanismo de polinización de las flores de agraz es entomófilo, siendo la abeja *Apis mellifera* la que participa de manera directa en este proceso (Dueñas, 2017).



Figura 1: Flores de agraz *Vaccinium meridionale* Sw.
Fuente: Chamorro y Parra, 2015

El fruto desarrollado a partir de un ovario ínfero se clasifica como una falsa baya, tiene un diámetro de 5 mm a 16 mm (Ligarreto, 2009), sus frutos son bayas globosas de color verde en estado inmaduro y morado oscuro, casi negro, en su madurez (Figura 2) (Ligarreto y Stanislav, 2007); el diámetro ecuatorial de los frutos oscila entre 7-15 mm, el peso fresco varía de 1,6 a 6,8 g y el número de semillas entre 15 y 37, dependiendo el tamaño del fruto (Soledad, et al., 2012).



Figura 2: Frutos de agraz *Vaccinium merionale* Sw.
Fuente: (Allina, 2015)

2.1.1.1. Fruto y semillas. Los frutos del *Vaccinium meridionale* Swartz en estado de madurez presentan un alto contenido de sólidos totales medidos en grados brix entre 12,6 y 15,2 pH bajo entre 2,2 y 2,7 y un contenido de humedad del 77-83%. Las antocianinas, compuestos fenólicos pertenecientes a la familia de los flavonoides, son las responsables de su coloración; éstas se encuentran principalmente en su piel (Castrillon et al., 2008)

El fruto es una baya globosa y carnosa de 8 - 14 mm de diámetro, de color morado oscuro a negro al madurar. Las semillas, tienen forma aplanada y contorno oblongo elíptico, el color sobresaliente es pardo-dorado, aunque se presentan de color pardo-rojizo; la cubierta seminal es relativamente dura de consistencia leñosa (Medina et al., 2009).

La fructificación en Colombia se presenta en dos épocas al año, la primera entre Abril y Mayo y la segunda entre Septiembre y Diciembre. Debido a que sus bayas son multicarpeladas, el agraz tiene múltiples semillas en el fruto y el número de semillas por fruto varía entre 8 y 48, con un promedio de 26 semillas. A su vez, se reporta que en los frutos pequeños con diámetro de 8 mm el número promedio de semillas es 15, mientras que los frutos grandes con diámetro de 10-12 mm pueden contener 37 semillas en promedio. (Dueñas, 2017).

Las semillas de agraz son muy pequeñas, entre 0,8 y 2,0 mm de largo y, al igual que las semillas de otras Ericaceae, poseen un endospermo carnoso y un embrión recto. El embrión de las semillas de agraz es de tipo axial, localizado en el eje central de la semilla, además lineal, oblongo y recto, pero si se observan las semillas en tres dimensiones, el embrión está levemente curvado. Los cotiledones son de igual tamaño, de ápice redondeado, sin ángulo de separación entre sí y su longitud es de un tercio con relación a la longitud total del embrión; el

epicótilo no forma plúmula y no hay demarcación entre el hipocótilo y la radícula (Magnitskiy y Ligarreto, 2009).

La cantidad de semillas de *Vaccinium*. Varía por kilogramo, dependiendo de la especie: entre $1,09 \times 10^6$ en *V. macrocarpon* Ait. y $3,90 \times 10^6$ en *V. angustifolium* Ait. El peso de 1 000 semillas de agraz tiene un promedio de 0,435 g, constituyendo $2,30 \times 10^6$ de semillas en un kilogramo (Magnitskiy y Ligarreto, 2009).

2.2. Reproducción en plantas

Los mecanismos de reproducción sexual y asexual en las plantas y su repercusión en la variabilidad genética es necesario señalar, aunque en forma somera, los procesos celulares de la mitosis y la meiosis. por lo que sólo diremos que la mitosis consiste en una división celular que genera dos células con idéntica información genética, es decir, con el mismo número de cromosomas (células diploides) que la célula predecesora; por otro lado, en la meiosis la información genética se reduce a la mitad (células haploides), lo que da lugar a las células conocidas como gametos (masculinos o femeninos), que son las que participan en la reproducción sexual. Durante la fecundación estos gametos se unen y generan un nuevo organismo, el cual contiene la información genética de ambas células (célula diploide), La reproducción sexual se inicia con la formación de los órganos masculinos y femeninos en los conos de las gimnospermas y en las flores de las angiospermas. Las plantas presentan una diversidad muy amplia en cuanto a la distribución de los sexos entre los individuos y a lo largo del tiempo. (Yanes, Orozco, Rojas, Sanchez, & Cervantes, 2016)

2.2.1. Reproducción asexual. La propagación Asexual o clonación se define como la reproducción de una planta a partir de una célula un tejido, un órgano (raíces, tallos, ramas, hojas). En teoría, cualquier parte de una planta puede dar origen a otra de iguales características según sean las condiciones de crecimiento (luz, temperatura, nutrientes, sanidad, etc.). Esto se debe a que muchas de las células de los tejidos vegetales ya maduros conservan la potencialidad de multiplicarse, de diferenciarse y dar origen a diversas estructuras como tallos y raíces; estos grupos celulares forman parte de meristemos primarios y secundarios que pueden encontrarse en todos los órganos de las plantas. Las células no diferenciadas que los conforman tienen la información genética y las propiedades fisiológicas de producir una nueva planta con iguales características de la planta madre (Rojas, Garcia, y Alarcon, 2004)

2.3. Reproducción sexual. El proceso de germinación de las semillas es una etapa importante en donde, al brindar unas condiciones controladas comienza la formación de una nueva planta. Este proceso consta de tres fases indispensables.

- fase de hidratación: en la cual inicia un proceso de hidratación de los diferentes tejidos de la semilla y aumenta su actividad respiratoria.
- fase de germinación: donde empieza una serie de acontecimientos metabólicos de forma escalonada, estabilizándose el consumo de oxígeno.
- fase de crecimiento: en esta fase la semilla presenta unos cambios morfológicos visibles, que de manera concreta se habla de la elongación de la radícula, fragmentación de los cotiledones y luego la aparición de hojas nuevas (Vargas, 2011).

A partir de la fase de germinación se inicia una etapa fisiología irreversible; es decir que, la semilla solo tiene dos opciones: la primera pasar a la fase de crecimiento y dar una plántula y la segunda perder su viabilidad y morir. En agraz es importante el empleo de este método de propagación sexual ya que permite introducir genes nuevos, mejorar las características controladas por efectos aditivos de genes y prevenir los efectos de la endogamia (Vargas, 2011)

La reproducción sexual de las plantas angiospermas o plantas con flores, sucede cuando un grano de polen llega al pistilo de la flor, se produce la polinización, al entrar en su interior, se produce la generación de las células germinales o gametos masculinos que fecundan los óvulos que hay en el gineceo mediante el tubo polinizador. (Ballesteros et al.,2018).

Una vez los óvulos están fecundados, proceso conocido como fertilización, se forman las semillas, y una vez formadas éstas, el gineceo se convierte en el fruto que habitualmente se conoce como resultado de la reproducción de las plantas.

En la fecundación se produce la unión dos células haploides con distinto material genético, que se unen formando un individuo de genotipo diferente del de los padres y por este motivo se llama reproducción sexual. (Ballesteros et al.,2018).

La propagación sexual del agraz inicia con el proceso de la polinización llevado a cabo a través de agentes polinizadores como la abeja *Apis melífera* (Calderón, et al., 2009) continua con la fecundación de las flores, luego viene la formación de los frutos, la dispersión de las semillas y su germinación para el establecimiento de las plantas. (Ballesteros et al.,2018).

Existen además una serie de dispersores naturales de las semillas de agraz como son, roedores, aves y reptiles que juegan un papel importante ya que aceleran los procesos de germinación de las semillas al pasar por su tracto digestivo (Ballesteros, et al.,2018).

2.3.1.1. *In vitro*. La expresión cultivo in vitro de plantas, significa cultivar plantas dentro de un laboratorio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes), y el control de los factores que afectan el crecimiento, el avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Dueñas, 2017).

El crecimiento in vitro de las especies de *Vaccinium* se ve limitado, especialmente si el material vegetal proviene de campos de cultivo o rodales naturales. Lo anterior es debido a la fuerte contaminación que presenta el material vegetal, y a la oxidación y posterior muerte de los explantes debido a los fuertes tratamientos de desinfección, necesarios para controlar la contaminación. Los procesos de micropropagación del género *Vaccinium* es realizada a través de la inducción de dos procesos distintos, los cuales son: 1) Proliferación de yemas axilares y brotación axilar y 2) Generación de brotes adventicios. Los explantes iniciales comúnmente utilizados son: Tallos de reciente brotación o segmentos nodales con yemas activas con el fin de generar brotación axilar y proliferación de yemas axilares, y hojas jóvenes e hipocotilos para la generación de brotes adventicios (Castillo, 2018)

2.4. Fitohormonas

Las fitohormonas se caracterizan por participar en variadas respuestas morfogénicas y de crecimiento de manera pleotrópica, esto quiere decir; que una misma hormona participa en diferentes procesos y además, que dependiendo de su concentración, la misma hormona puede ser estimuladora o inhibitoria de una misma respuesta. Por otra parte, varias hormonas pueden afectar una misma respuesta, lo cual indica que hay una aparente redundancia en el control de un mismo efecto. Cada respuesta ocurre en un tiempo determinado en el desarrollo de la planta y se presenta solamente en un tejido específico u órgano. (Aguilar, Melgarejo, y Romero, 2010) Las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, llamadas fitohormonas, como el ácido indol-3-acético y otros indoles de origen microbiano también pueden influir benéficamente en muchas plantas. Por esta razón, es más apropiado considerar a estos microorganismos como

rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, categoría en la cual se incluyen los microorganismos que presentan la capacidad de producir fitohormonas, sideróforos y bacteriocinas (Carcaño, Ferrera, Perez, Molina, y Bashan, 2006)

De acuerdo con su estructura y función fisiológica, las hormonas han sido clasificadas en varios grupos que comprenden a las auxinas, citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), etileno, jasmonatos (JA), ácido salicílico (SA), brasinosteroides, poliaminas. En el 2008, dos grupos independientemente identificaron las strigolactonas como un nuevo tipo de hormonas que inhibe la ramificación vegetal (Aguilar, Melgarejo, y Romero, 2010).

2.4.1. Giberelinas. Las giberelinas son un grupo de diterpenoides que se definen más por su estructura que por su actividad biológica, contrario a lo que ocurre con las auxinas y las citoquininas. Las giberelinas biológicamente activas, actúan como reguladores esenciales del desarrollo de las plantas y cubren todos los aspectos de la historia de vida de las plantas, modulando varias respuestas del crecimiento como la germinación de semillas, el crecimiento del tallo, la partenocarpia, la expansión foliar, la elongación de la raíz, la floración y la liberación de enzimas hidrolíticas en algunos tejidos. Únicamente las giberelinas biológicamente activas pueden cumplir con estas funciones, las giberelinas no bioactivas existen en el tejido vegetal como precursores de las formas bioactivas o como metabolitos desactivados. Se ha dilucidado que existe una necesidad estructural como requerimiento para la afinidad con el recientemente descubierto receptor de giberelinas en arroz (GID1) y sus homólogos en otras especies. En general, se encuentran mayores niveles de giberelinas en las partes reproductivas en comparación con las vegetativas, y en partes jóvenes en comparación con las maduras. Se encuentra con facilidad en ápices de tallos y raíces, en hojas jóvenes, partes florales, semillas inmaduras y embriones en germinación. (Aguilar, Melgarejo, y Romero, 2010).

2.5. Sustancias estimulantes

Un gran número de especies forestales no germinan debido a que la testa o cubierta seminal es dura e impide la entrada de agua (latencia física), y la semilla no germina al menos que esta sea escarificada. Así, la escarificación es cualquier proceso que rompa, raye, altere mecánicamente o ablande las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases.

2.5.1. Nitrato de potasio. Aun no se tiene una explicación unificada sobre el efecto que el nitrato de potasio pueda tener sobre la germinación en semillas que presentan latencia, se

considera que el efecto del nitrato de potasio sobre la latencia está relacionado con su comportamiento como aceptor electrónico, lo cual disminuye el consumo de oxígeno y estimula de esta manera la vía pentosa fosfato, la relación entre aplicación exógena de nitrato de potasio y germinación es explicada por la acción de los nitratos sobre la ruta metabólica relacionada con el fitocromo, el nitrato logra que estos actúen como moléculas de señal en las vías metabólicas del ácido abscísico o del ácido giberélico (Andrade y Laurentin, 2015).

2.6. Viabilidad de semillas

Según Ruiz (2009) la viabilidad de las semillas, es indicar la capacidad potencial de germinación, es en este aspecto el método ideal es una prueba bioquímica con TZ (tetrazolio) posiblemente haya sido uno de los más grandes descubrimientos en análisis de semillas en la última centuria, y aún es poco aprovechado. Al ser hidratadas las semillas, con el TZ la actividad de las deshidrogenasas (diferencia entre tejidos muertos y vivos) incrementa, resultando en la liberación de iones hidrógeno. La solución tiñe a las células vivas de color rojo, en tanto que las muertas permanecen sin colorear. La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración. Que una semilla sea viable, nos indica que es capaz de germinar y producir una plántula normal, sin embargo, podría estar dormida, y en ese caso no germinaría inmediatamente. La evaluación de la viabilidad de las semillas permite conocer el nivel de calidad de diferentes lotes de semillas. En este punto conviene definir la facultad germinativa de la semilla, que es la proporción o tanto por ciento de semillas que dan lugar a un germen normal, que se obtiene tras realizar un ensayo de germinación. La potencia germinativa o viabilidad sustituye al ensayo de germinación, y consiste en determinar potencialmente la máxima germinación de un lote es variable, es decir que habrá unas semillas que perduren más tiempo que otras; esto depende de la especie con la cual se esté trabajando y también de las condiciones de almacenamiento, ya que si se almacenan a bajas temperaturas el metabolismo se reducirá, razón por la cual la semilla permanece viva por mucho más tiempo (Benito, Herrero, Jiménez y Peñuelas, 2004).

2.7. Latencia de las semillas

La latencia en semillas es un factor importante dentro del proceso de germinación la definen como un bloqueo al proceso para completar la germinación de semillas intactas y viables bajo condiciones favorables. Los impedimentos para que no haya germinación aun en unas condiciones favorables esta provocado por unos mecanismos de latencia innata o latencia inducida por factores ambientales (Figuroa y Jaksic, 2004).

2.8. Dormancia en semillas

Es el tipo de dormancia más común en el que se puede encontrar las semillas, está dado por factores exógenos y endógenos (Suarez y Melgarejo, 2010).

2.8.1. Dormancia Primaria. Es el tipo de dormancia más común en el que se puede encontrar las semillas, está dado por factores exógenos y endógenos.

2.8.1.1. Dormancia exógena. Hace referencia a las condiciones ambientales básicas que determinan el proceso de germinación como disponibilidad de agua, luz y temperatura. La absorción de agua por parte de la semilla está directamente influenciada por la presencia de la testa y la permeabilidad que ésta tenga al intercambio gaseoso, algunas familias como Fabaceae, Malváceas, Chenopodiaceae y Liliaceae presentan problemas de permeabilidad del agua y son conocidas como semillas duras. El efecto de la testa puede ser mecánico, o químico debido a la presencia de inhibidores fenólicos, impidiendo el flujo necesario de agua y oxígeno para la germinación. La temperatura está frecuentemente asociada con el proceso de germinación por afectar el porcentaje de germinación, la tasa diaria de germinación, la tasa de absorción de agua, la velocidad de las reacciones enzimáticas y el transporte de las sustancias de reserva. En referencia a los requerimientos de luz necesarios para el proceso de germinación, las semillas se clasifican en tres grupos. El primer grupo corresponde o involucra a las semillas fotoblásticas positivas, ellas germinan como respuesta a la luz, En el segundo grupo están las fotoblásticas negativas, en él las semillas sólo germinan en oscuridad. En el tercer grupo están las semillas insensibles a la luz, germinan indistintamente bajo condiciones de luz u oscuridad (Suarez y Melgarejo, 2010).

2.8.2. Dormancia endógena. Es el tipo de dormancia que es inherente a las características internas de la semilla, entre estos se encuentran: dormancia por embriones rudimentarios, dormancia por inhibición metabólica, dormancia por inhibición osmótica y dormancia por embriones rudimentarios. En algunas especies el proceso de maduración morfológica del embrión ocurre después del proceso de dispersión, lo cual se convierte en un tipo de dormancia porque el embrión inmaduro es incapaz de germinar, algunas especies como *Ranunculus*, *Plantago*, *Fraxinus*, *Viburnum*, *Ilex* y *Pinus* presentan este tipo de dormancia que se caracteriza por la maduración del embrión días o semanas después del proceso de dispersión Inhibición metabólica (Suarez y Melgarejo, 2010).

2.8.3. Dormancia secundaria. Algunas semillas no dormantes encuentran condiciones que generan posteriormente la inducción de la dormancia. Este tipo de situaciones puede ser causado por la exposición de las semillas a condiciones que favorecen la germinación junto con la exposición a un factor que bloquea y restringe el proceso de germinación. Ejemplos de este tipo de dormancia es reportado en semillas de variedades de trigo de primavera y cebada de invierno en la que la dormancia secundaria puede ser inducida luego de una exposición de las semillas deshidratadas a temperaturas entre 50°C a 90°C, o el almacenamiento durante siete días de semillas de trigo de primavera en condiciones de alta humedad. Aunque los mecanismos de dormancia secundaria pueden estar dados por el efecto de factores térmicos (temperatura), por presencia o ausencia de luz; este tipo de dormancia puede también ser inducida por exceso o ausencia de agua, compuestos químicos y gases. Algunos investigadores sugieren dos hipótesis para explicar el modo de acción de la dormancia secundaria: la primera es la imposición o bloqueo de puntos control en los procesos metabólicos que hacen parte del proceso de germinación, y la segunda hace referencia a la inducción por algún factor (exceso o déficit de agua, luz, temperatura y gases) de sustancias que inhiben la germinación contra sustancias que promueven el proceso (Suarez y Melgarejo, 2010).

2.9. Protocolos de propagación

Cada tipo de planta requiere un tipo de propagación adecuado, este depende de sus condiciones ambientales (suelo, humedad y luz solar) los métodos más comunes son el natural o por medio de semillas y por división de raíces. Por lo general se suelen propagar por

esquejes; mediante división de raíces y por semillas (Ecured, 2012). La propagación de las semillas de agraz se hace de forma natural a través de los diferentes dispersores como aves, roedores y mamíferos de las zonas de alta montaña donde se encuentran las plantas de *Vaccinium* (Magnitskiy y Ligarreto, 2009).

2.10. . Antecedentes

En Colombia, el agraz o mortiño *V. meridionale* Swartz, presenta alto potencial para el consumo nacional y ha sido incluido en la lista de especies con mercado hacia Estados Unidos. La demanda y producción del agraz han subido sostenidamente en los últimos años despertando el interés en esta fruta, esto se debe principalmente por su alto contenido de antocianinas y antioxidantes, a los cuales se le atribuyen numerosas propiedades terapéuticas. A pesar de esto, en Colombia no existen cultivos de agraz, sino poblaciones silvestres que son explotadas por las comunidades locales en pequeñas parcelas y matorrales, principalmente en los departamentos de Boyacá, Antioquia y Cundinamarca (Pinilla y Nates, 2015).

Según El Informe del Estado de los Recursos Filogenéticos para la Alimentación y la Agricultura indicó que las pérdidas de diversidad genética del agraz eran grandes y continuas debido a la extracción inadecuada del fruto. Por ello se reportó que la preservación de los acervos genéticos relacionados con los cultivos de agraz era importante, los conjuntos genéticos de las plantas silvestres han sido escasamente observados, colectados o descritos, estas especies son las más amenazadas por su rareza, endemismo y falta general de conocimiento sobre ellas. Tomando como referente reportes de latencia fisiológica en especies de *Vaccinium* se evalúa un efecto promotor de la germinación del ácido giberélico (GA3) y el nitrato de potasio (KNO₃) en semillas de agraz. (Hernandez, Lobo, Medina, Cartagena, y Delgado, 2009).

Según Castrillon et al., (2008) en el estudio realizado en la imbibición de semillas de agraz en soluciones con 100-500 mg/L de ácido giberélico (GA3) durante 35 días (cajas de Petri sobre papel filtro en el germinador a una temperatura constante de 25°C y 8 horas de luz), las semillas extraídas de frutos y almacenadas por 30 días a 5°C cuentan con un porcentaje de germinación del 44-50% mientras que semillas almacenadas en frutos por 30 días a 5°C presentan una germinación menor, del 32-40%.

El efecto estimulante del nitrato de potasio y del ácido giberélico sobre la germinación de las semillas de agraz es muy conocido en otras especies y puede ser explicado por disminuir los

requerimientos de luz y estratificación caliente o fría de las semillas, debido a que el (GA₃) puede sustituir el efecto de la luz ya que suple los requerimientos del sistema de fitocromo en semillas fotoblásticas. De esta manera, Ligarreto y Stanislav (2007), refieren que las semillas de agraz al germinar en cajas de Petri con ácido giberélico a 300 mg/L durante 60 días, expresan un 50,3% de germinación bajo condiciones de luz, mientras que con tratamientos similares de 100 y 600 mg/L de ácido giberélico se logran porcentajes de germinación del 42,7 y 39,0%, respectivamente.

El estudio del comportamiento de la germinación y categorización de la latencia de semillas de mortiño *Vaccinium meridionale* Swartz realizado por Hernandez, Lobo, Medina, Cartagena, y Delgado (2009), arrojó que las semillas a una temperatura de 20°C en condiciones de luz (12 horas por 30 días) y a una concentración de 1000 mg L⁻¹ (AG₃) presentan un porcentaje de germinación del 98%, seguido de la concentración de 500 mg L⁻¹ (AG₃) con una germinación del 97%; lo anterior indica que las semillas responden mejor a la germinación en condiciones de luz y concentraciones no muy altas de ácido giberélico.

Según Ordoñez (2017) indica que una característica a tener en cuenta en la selección de bayas de agraz es el tamaño debido a que las bayas medianas (6.6- 7.9 mm) obtienen mayor porcentaje de germinación con relación a los demás tamaños.

3. Metodología

3.1. Localización

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biología de la Fundación Universitaria de Popayán, sede Los Robles, Municipio de Timbío (Figura 3), Departamento del Cauca; cuenta con una temperatura promedio entre 16 y 23°C, a una altura sobre el nivel del mar de 1851 (Ordoñez, 2017).



Figura 3: Mapa Municipio de Timbío

Fuente: (Academic, 2017)

3.2. Material biológico

La investigación se realizó con semillas sexuales provenientes de frutos maduros de tamaño mediano con diámetro entre 6,5 mm y 7,9 mm, (Figura 4) de acuerdo a la clasificación establecida por Ordoñez (2017).



Figura 4 : Clasificación de Frutos

3.3. Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente al azar, en un arreglo factorial 5x2; donde el primer factor está dado por 5 concentraciones de hormonas (0 ppm, 500 y 1000ppm de AG₃, 500 y 1000 ppm de KNO₃), y el segundo factor se debe a la procedencia de las semillas, vereda Quintana del municipio de Popayán y corregimiento de Valencia en el municipio de San Sebastián. Por cada tratamiento se realizó 5 repeticiones utilizando 50 semillas como unidad experimental. Los parámetros que se tuvieron en cuenta en cada factor de evaluación son los siguientes:

3.3.1. Procedencia. Las semillas de agraz fueron colectadas en dos zonas del departamento del Cauca: al sur del departamento, en el corregimiento de Valencia (Figura 5), Municipio de San Sebastián, situado aproximadamente a los 1°40' y 2°30' de latitud norte, 76°10' y 76°55' de longitud al oeste de Greenwich con una temperatura que oscila entre los 8° y 22°C y a una altura de 2949 Metros sobre el nivel del mar. (Alcaldía de San Sebastián, 2017).

San Sebastián limita por el norte con el Municipio de la Vega, al sur con el Municipio de Santa Rosa, al occidente con los municipios de Almaguer y Bolívar y al oriente con el Municipio de San Agustín, Departamento del Huila (Alcaldía de San Sebastián, 2017).



Figura 5: Mapa municipio de San Sebastián

Fuente: Alcandía de San Sebastian, 2017)

El segundo lugar de procedencia fue la vereda Quintana (Figura 6) del municipio de Popayán, localizada a una altura de 2.762 msnm y temperatura promedio de 17°C (Acueducto y alcantarillado de Popayan S.A-E.S.P, 2018).

En la vereda Quintana está localizado a 24 km al oriente de la Ciudad de Popayán, sus límites son al Norte con el Municipio de Totoró, al Oriente con los Municipios de Totoró y Puracé, al Sur con el Municipio de Puracé y al Occidente con el corregimiento de las Piedras. (Acueducto y alcantarillado de Popayan S.A-E.S.P, 2018).



Figura 6: Mapa Municipio de Quintana

Fuente: (Chala, 2009).

3.3.2. Hormonas. Se usaron dos concentraciones distintas de fitohormona ácido giberelico (AG_3) y sustancia estimulante , nitrato de potasio (KNO_3) como se describe en la siguiente tabla

Factor	Variable
Concentración de AG_3	500 ppm
	1000 ppm
Concentración de KNO_3	500ppm
	1000ppm
Origen	Quintana
	Valencia

Para el desarrollo de experimento se empleó la metodología expresada en la siguiente imagen



3.4. Montaje

Se clasificaron las semillas de acuerdo a su tamaño y zona de origen, se esterilizaron y seleccionaron 50 unidades para cada tratamiento de hormonas estimulantes. Se depositaron las semillas en cajas Petri con papel filtro en la base, con el propósito de contribuir en la absorción de agua y así, estimular la germinación; se realizó el seguimiento durante 8 semanas (2 meses) en una cámara de flujo laminar, la cual brindó luz durante 12 horas debido a que las semillas de agraz son fotoblásticas positivas. (Ligarreto y Stanislav, 2007). Los parámetros que se tuvieron en cuenta para el montaje es la esterilización de material de laboratorio fueron; desinfección y extracción de semilla, prueba de viabilidad y preparación de hormonas.

3.4.1. Esterilización de materiales de laboratorio. Se esterilizó el material de laboratorio que se necesita para el ensayo: cajas Petri, papel filtro, Beaker de 50 y 100 mililitros, Espátulas, pipetas esto se hizo en autoclave durante 2 horas y a una temperatura de 60°C Hernandez et al. (2009). Además, se realizará la limpieza de los balones aforados con glutaraldehído al 1% para preparar la solución de ácido Giberélico, y se realizará la limpieza a la cámara de flujo laminar con cloro al 5.25% en donde se llevó a cabo el experimento,

3.4.2. Desinfección de semillas. Las semillas seleccionadas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto. En caso de ser necesario el almacenamiento, las semillas se conservaron en bolsas transparentes selladas a una temperatura promedio de 1°C. Esto se hizo con el fin de conservar el estado natural del embrión y sus características de germinación de acuerdo a Hernandez et al. (2009).

3.4.3. Extracción de semillas. Para la extracción de semillas se seleccionaron frutos en estado maduro, es decir, cuando su epidermis tenga un color morado oscuro (Hernandez et al, 2009). La extracción se realizó de acuerdo a la metodología establecida por Magnitskiy y Ligarreto (2009), en la cual indica que los frutos frescos seleccionados se cubrirán con agua tibia, para luego ser macerados por unos segundos permitiendo que la pulpa flote mientras las semillas se precipitan; se eliminaron las semillas vanas, aquellas que flotan. Este proceso se repitió varias veces para conseguir la separación apropiada de semillas y pulpa. El despulpado puede ser seguido por el zarandeo, el lavado y el secado de semillas a temperatura ambiente en el día.

3.4.4. Prueba de viabilidad. Con el propósito de establecer la viabilidad de las semillas se seleccionaron 50 unidades para realizar este proceso, las cuales fueron sometidas a una evaluación mediante la prueba de Tetrazolio al 1%. La cantidad de solución utilizada fue de 50 mililitros, con 0,5 gramos de Tetrazolio; luego se adiciono 1 mililitro de alcohol para agilizar la dilución y se aforo a un litro con adición de agua destilada (Hernandez et al.,2009).

Las semillas de agraz se dejaron sumergidas en agua durante 24 horas, posteriormente se hizo un corte lateral a cada semilla con el fin de que el Tetrazolio haga efecto sobre las partes vivas del embrión. En cajas Petri se colocaron las semillas y se adicionó la solución de Tetrazolio, dejándolas 3 horas en un horno a una temperatura de 45°C y así poder realizar la

identificación de las semillas vanas, viables y no viables, mediante un estereoscopio. (Ballesteros, et al, 2018).

3.4.5. Preparación de hormonas. El ácido Giberélico (GA₃) es una solución sólida para lo cual se utilizó un Beaker de 50 mililitros para cada concentración, una cuchara y la balanza analítica; se pesaron 0,1 miligramos de GA₃ para concentrar 1000 ppm, y 0,05 miligramos de GA₃ para concentrar 500 ppm.

El nitrato de potasio al igual que el ácido giberelico se encuentra en estado sólido granular, por lo tanto se realizó el mismo proceso de preparación del ácido giberelico, teniendo en cuenta que en este caso se diluyó en agua.

Al beaker se le adicionó agua destilada para disolver el componente, se agitó constantemente hasta que el soluto se disuelva en el solvente, luego se afora a un litro; este procedimiento se realizó para cada una de las concentraciones.

3.4.6. Siembra se realizó sumergiendo las semillas en la solución de la hormona por 24 horas luego se contaron 2300 semillas de agraz; 50 semillas para los 46 tratamientos respectivamente por último se colocaron en las cajas Petri cada una con su respectivo papel filtro, al finalizar se rotularon, taparon y ubicaron en la cámara de flujo laminar de acuerdo al diseño experimental; del laboratorio de biología, de la Fundación Universitaria de Popayán sede Los Robles, a esta cámara se le hizo limpieza y desinfección para evitar la contaminación de las semillas. Luego de establecer el experimento, todos los días se realizó control en la iluminación y la temperatura a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ mediante termo higrómetro digital.

3.5. Variables a evaluar

Las variables que se evaluaron en las semillas que se encontraban en condiciones de laboratorio fueron:

- Porcentaje de germinación en las semillas; se recolectó datos cada 8 días después de la estimulación con las hormonas y se estableció el porcentaje de acuerdo al número total de semillas germinadas aplicando la fórmula (1).

$$\% \text{ Germinación} = \frac{\text{semillas germinadas}}{\text{semillas totales por tratamiento}}$$

- Porcentaje de rompimiento de testa en las semillas; se hizo un conteo por cada tratamiento en donde se vea el rompimiento de testa el cual consistió en una abertura en la semilla.

$$\%semillas = \frac{\text{semillas con rompimiento de testa}}{\text{total semillas}}$$

El conteo de las semillas germinadas se hizo cada 8 días a través de un estereoscopio en donde se visualizó las semillas que tienen rompimiento de testa y desarrollo de la radícula e epicótilo.

3.6. Análisis de la información

Se usó planillas para la recolección de datos, tales como temperatura, control de agua y latencia, esto se hizo en horas de la mañana durante 120 días, y se evaluó el comportamiento de las semillas de agraz embebidas en las diferentes concentraciones de la fitohormonas ácido giberelico y la sustancia estimulante nitrato de potasio, usadas para la investigación.

La información obtenida en el comportamiento de las semillas inducidas en los dos tratamientos se tabuló, procesó, y analizó. Con los datos obtenidos se organizó una matriz de Excel, llevada al software estadístico SPSS versión 25, con el cual se hizo un análisis de varianza (ANOVA) al encontrar diferencias estadísticamente significativas se procedió a realizar la prueba de promedios según Duncan, con el objeto de identificar el mejor tratamiento.

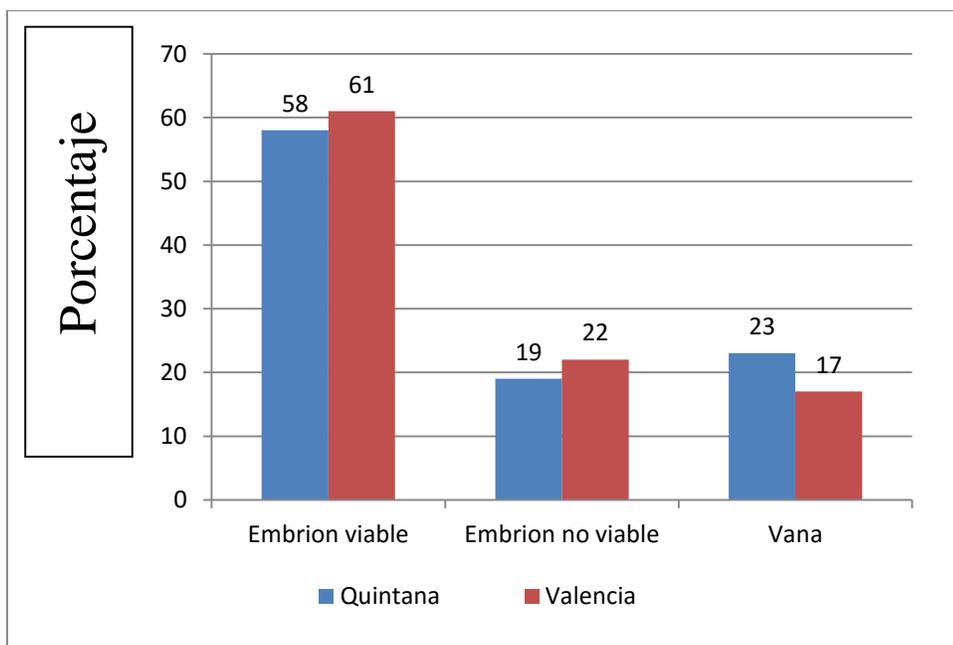
4. Resultados

El estudio sobre el género *Vaccinium* en Colombia es relativamente escaso siendo el *V. meridionale* Sw una planta promisorio, original de la zona alto andina, con un alto potencial de mercado, y gran capacidad nutritiva (Medina, et al, 2015). Es por esto, que el presente ensayo plasma un precedente apoyando al desarrollo de la especie con los siguientes resultados en: viabilidad en semillas acorde a los lugares de procedencia, germinación en semillas según la concentración de hormonas estimulante.

4.1. Viabilidad de semillas de agraz según su procedencia

La viabilidad de las semillas no fue significativa estadísticamente para los dos lugares de procedencia (Quintana y Valencia), siendolas semillas de Valencia más viables (61%) que las semillas de Quintana (58%). (Gráfico 1)

Gráfico 1: Prueba de viabilidad según su procedencia



Los resultados indican que se presentó el 61% y 58 % de viabilidad en semillas, porcentaje menor al establecido por Hernandez et al., (2009) ya que los resultados de la tinción exhibieron 84,2% de viabilidad, con 63% de semillas germinadas y 21,2% de semillas viables no germinables (latentes), posiblemente se debe a la diferencia en la metodología debido a que

Hernandez et al., (2009), embebió las semillas durante 3 horas en la solución con tetrazolio a 30°C y adicionalmente 24 horas más a una temperatura ambiente, además de que estas pruebas se realizaron con el embrión extraído de la semilla, esto quiere que el mayor contacto del reactivo con las semillas puede generar mayor tinción en el embrión.

4.2. Análisis de varianza de las variables de estudio

Análisis de varianza realizado en los tratamientos empleados en la investigación, se encontró significancia en 8 variables las cuales son; rompimiento de testa (R.T), semana 1, 2, 3, Hongo 1, emergencia de hojas 2, emergencia de raíz 3.

Tabla 2:

Análisis de varianza

Numero de Evaluación	Variables	Hormona	Origen
1	R.T 1	0,009	0,707
	E. Raíz 1	0,135	0,102
	P. Hongo 1	0,054	0,451
	Emergencia H. 1	0,478	0,326
2	R.T 2	0,007	0,211
	Raíz 2	0,1	0,322
	Hongo 2	0,098	0,642
	Emergencia 2	0,002	0,018
3	R.T 3	0,002	0,652
	Raíz 3	0,025	0,302
	Hongo 3	0,098	0,642
	Emergencia 3	0,397	0,204
4	R.T 4	0,375	0,844
	Raíz 4	0,132	0,332

Hongo 4	0,098	0,642
Emergencia 4	0,518	0,056

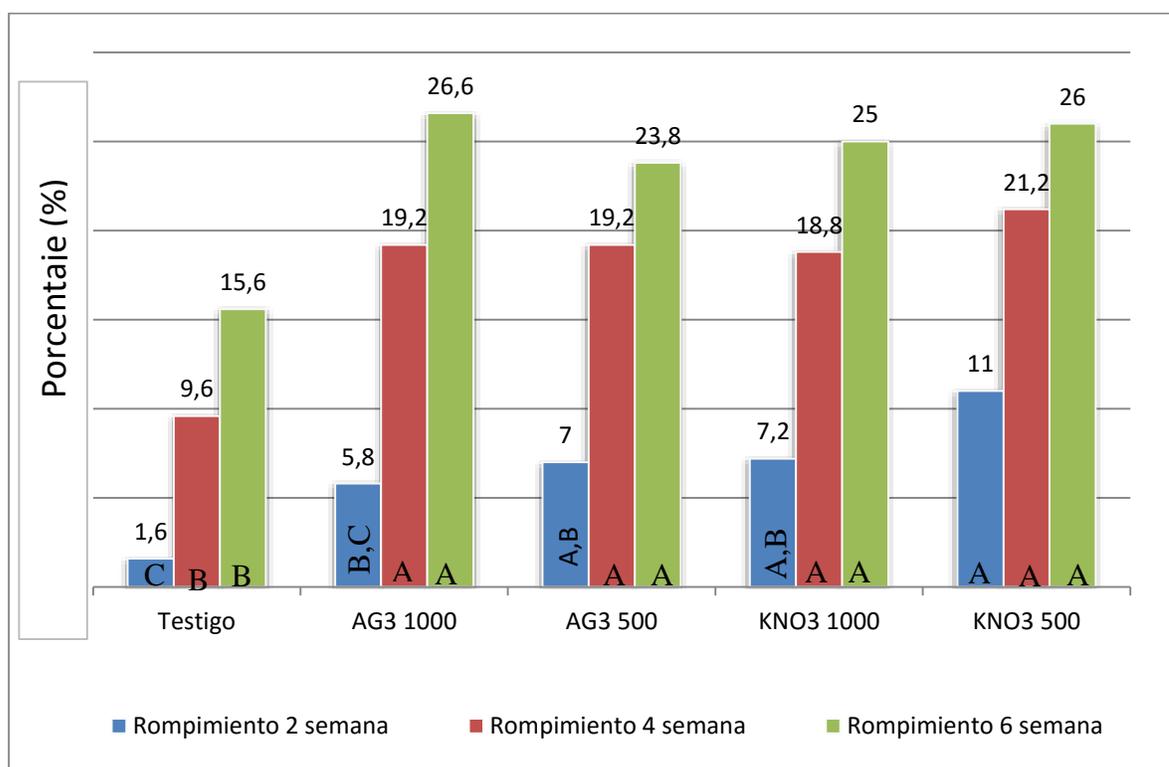
Nota: R.T (rompimiento de testa), E. Raíz (emergencia de Raíz), P. Hongo (presencia de hongo), Emergencia H (emergencia de hojas).

Las características de los resultados se describen por medio de graficas en los siguientes capítulos.

4.3. Rompimiento de testa según concentración de hormona estimulante

Al realizar la prueba de promedios según Duncan se evidencia el comportamiento del rompimiento de testa según el tiempo del ensayo y las diferentes concentraciones de hormonas aplicadas en las semillas de agraz.

Los resultados observados en el análisis de varianza, evidencia que para la semana dos de ser plantadas las semillas, estas reaccionaron favorablemente para el nitrato de potasio en sus dos concentraciones de 500 y 1000ppm (11% y 7,2%), seguidos por los tratamientos del ácido giberelico en concentraciones de 500 y 1000ppm (7% y 5%) respectivamente. Para las siguientes semanas; 4 y 6 los mejores tratamientos fueron el nitrato de potasio en 500 ppm y el ácido giberelico en 1000ppm (21,2 % y 26, 6%) respectivamente, frente a los tratamientos testigo los cuales mantuvieron porcentajes menores desde el inicio del ensayo como se puede observar en la gráfica 2, esto quiere decir que posiblemente las semillas de agraz responden positivamente al estímulo de las hormonas para el rompimiento de testa.

Grafico 2: *Rompimiento de testa por Hormona.*

Según Ligarreto y Stanislav (2007), la existencia de latencia en semillas de agraz se justifica con mas claridad observando el efecto de los tratamientos con nitrato de potasio y acido giberelico los cuales aumentaron el porcentaje de germinacion en las semillas de agraz como se pudo obrsevar (grafica 2) los tratamientos embebidos en las hormonas estimulantes dieron los mejores resultados iniciando desde la semana dos frente al los tramientos testigo del ensayo esto quiere decir que dichas hormonas promueven la germinacion y el rompimiento de latencia en las semillas de agraz

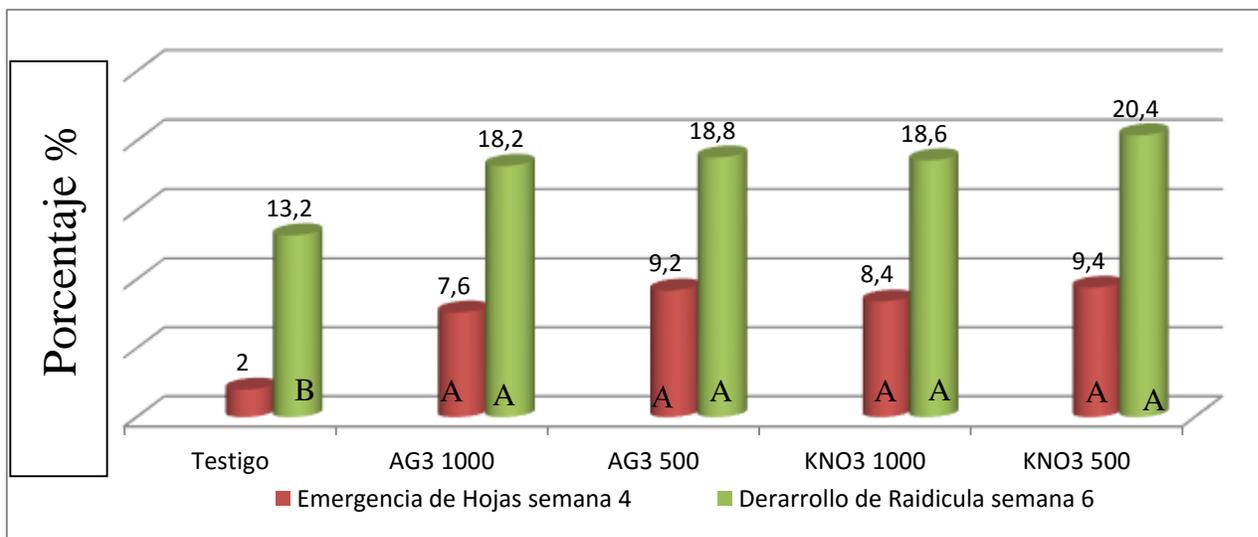
Según Gonzalez, Pita, Pinzon, Celi, y Serrano (2017). Afirman que agentes inorgánicos como KNO₃ son osmóticamente activos, reduciendo el potencial hídrico de la solución. Esto permite un control del nivel de embebición de las semillas, contribuyendo a la mejora de la germinación y al vigor de la semilla. El potasio es un nutrimento esencial para las plantas, involucrado en la estabilización del pH celular, la osmoregulación, la activación de enzimas, la tasa de asimilación de CO₂, la translocación de fotosintatos y el transporte en las membranas.

Por otro lado, el efecto promotor del Ácido giberelico (GA3) mejora en la velocidad de germinación corresponde a la acción complementaria de la luz y la hormona. Se ha señalado que ambos están relacionados con un patrón que involucra el fitocromo, en las semillas fotoblásticas positivas como lo es el agraz, la aplicación de giberelinas a las simientes de *Vaccinium*, más que un incremento en la germinación, producen mayor velocidad del proceso ya que la remoción de la latencia es regulada por una combinación de señales ambientales y endógenas, lo cual coincide con afirmaciones de que al aplicar GA a las semillas del género *Vaccinium*, no se incrementa el porcentaje total de germinación, sino que aumenta su velocidad y la uniformidad del proceso. (Hernandez, et al, 2009)

4.4. Porcentaje de semillas con emergencia de hojas y desarrollo de radícula

Según los resultados obtenidos por la prueba de Duncan, para las variables, emergencia de hojas y desarrollo de radícula; se pudo observar que a partir de la 4 semana del ensayo Los tratamientos de 500ppm de ácido giberelico y nitrato de potasio presentaron porcentajes mayores (9,2 % y 9,4 %) en emergencia de hojas, superando al tratamiento testigo (2%), posiblemente las semillas de agraz responden a los estímulos hormonales permitiendo romper su estado de dormancia en periodos cortos. Para la semana seis del ensayo el desarrollo radicular obtuvo porcentajes similares en todos los tratamientos empleados, el nitrato de potasio en concentración de 500ppm, (20,4%) obtuvo el mejor resultado frente al tratamiento testigo (13,2%). En la gráfica 2 se evidencia que solo el nitrato de potasio y el ácido giberelico en concentraciones de 500ppm, mantuvieron los mejores resultados en las variables evaluadas desde semana 2 hasta la semana 6, mientras que las semillas testigo presentaron porcentajes menores frente a las hormonas estimulantes. Estos resultados se pueden observar en la siguiente gráfica.

Grafico 3: Porcentaje de semillas con, emergencia de hojas y desarrollo de radícula



Monsalve, Escobar, Acevedo, Sanchez, y Coopman (2009), señalaron que el crecimiento radical aumentó en respuesta a medida que aumentó la concentración de nitrógeno, siendo el efecto de los tratamientos de 200 y 150 mg L⁻¹ de nitrógeno iguales entre sí, pero estadísticamente superiores a las respuestas obtenidas con las concentraciones de 100 y 50 mg L⁻¹. El efecto de los nitratos aumenta según la cantidad suministrada es por esto que los mejores resultados obtenidos en el presente estudio fueron para el nitrato potasio en concentración de 500ppm (20,4%).

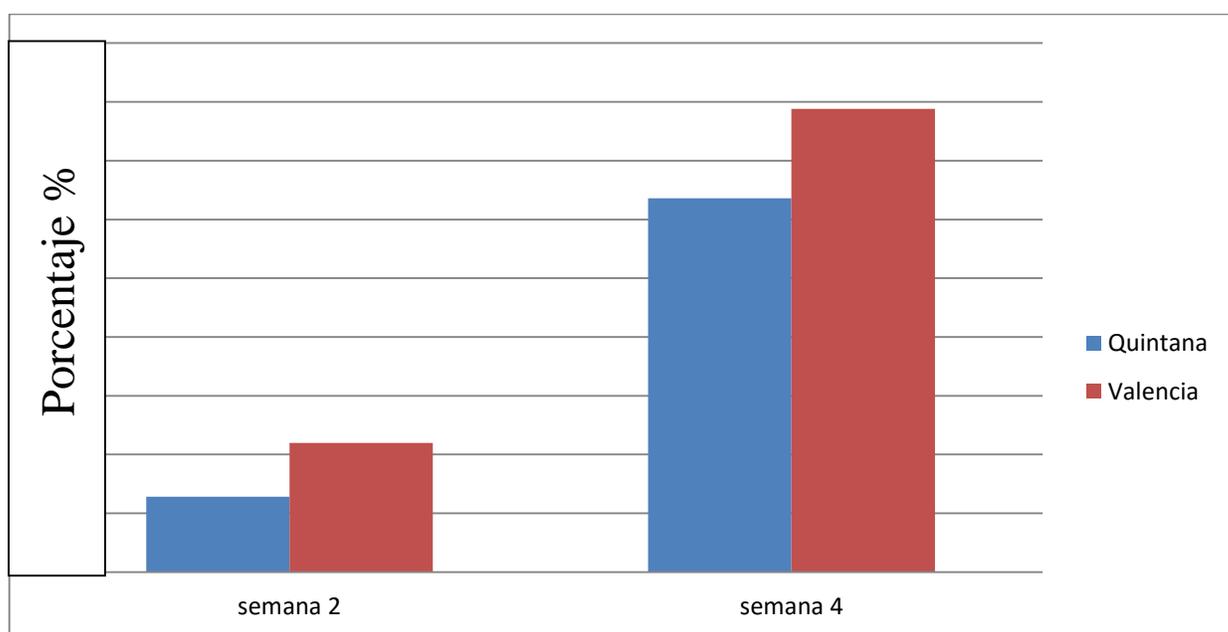
Según Ortiz, (2003) Los mecanismos de acción del AG3, puede provocar cambios a nivel genético que estimula a su vez la síntesis enzimática e (Figuroa & Jaksic, 2004) las células, así también provoca la estimulación de la síntesis de ARN en las capas de aleurona. Una de las teorías sostiene que el ácido giberélico tiene relación con la síntesis del ARN mensajero dirigido por ADN en el núcleo. En la actualidad se cree que el ácido giberélico modifica el ARN producido en los núcleos y así puede este ejercer su control sobre la expansión celular, así como sobre otras actividades de crecimiento y desarrollo vegetal.

4.5. Emergencia por origen

Las semillas provenientes del Corregimiento de Valencia presentan el mejor comportamiento al estímulo hormonal desde la semana 2 y 4 (11% y 39,4%) frente a las

semillas de Quintana (6,4% y 31,8%) esto se debe a que el corregimiento de Valencia presenta características ambientales distintas a la vereda Quintana, probablemente las características taxonómicas de ambas especies también sean distintas, debido a las condiciones de suelo, temperatura aire, humedad relativa y agua. En la prueba de viabilidad (Gráfico 1) se evidencio que las semillas provenientes del Corregimiento de Valencia presentaron el mejor porcentaje (61%) de embriones viables frente las semillas provenientes de la Vereda Quintana (58%) debido a que las condiciones edafoclimáticos para ambas especies son distintas. esto también se ve reflejado en los resultados obtenidos en la gráfica 4.

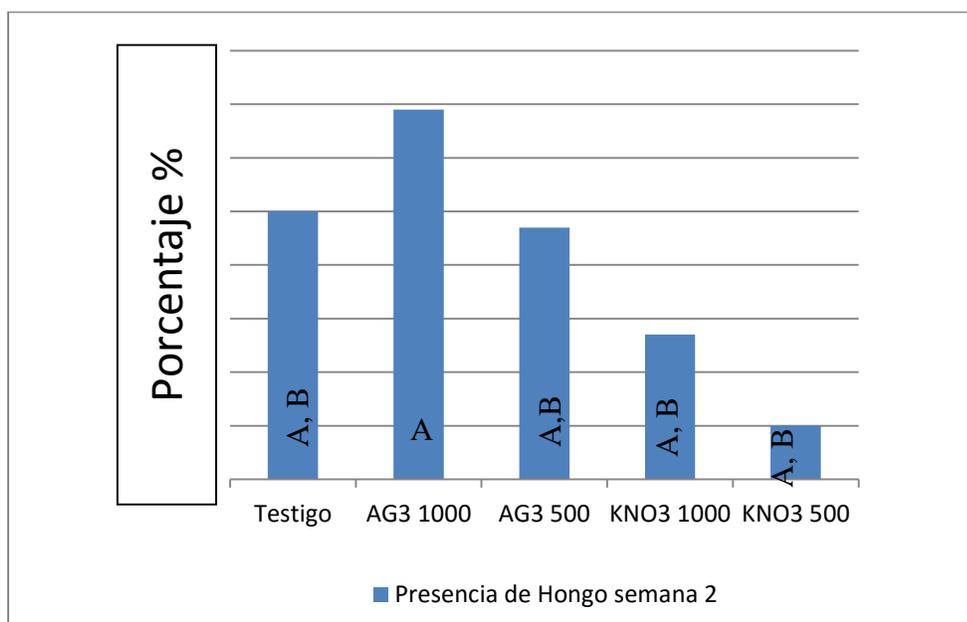
Gráfico 4: Emergencia por origen.



4.6. Presencia de Hongo

se observa que a partir de la segunda semana del ensayo la presencia de hongos se hizo notable en todos los tratamientos empleados, siendo el ácido giberelico y el tratamiento testigo los más afectados con porcentajes de 13, 8% y 10% respectivamente, las semillas presentaron malformaciones y pudrición en raíz, tallo y hojas.

Gráfico 5: Presencia de hongo.



Los resultados observados en el presente estudio se relacionan con lo reportado por Calderon y Socha (2009), quienes observaron el daño causado en plántulas de agraz por estos dos hongos, *Curvularia* sp. y *Ulocladium* sp., al hacer observaciones microscópicas de raíz, hojas y semillas se encontraron hifas y conidias de ambas especies por lo que fue imposible determinar si uno de los dos producen la lesión, estas lesiones coinciden con las observadas en el proyecto investigativo. Probablemente la imbibición de las semillas en las hormonas estimulantes (KNO₃ y AG3), no fue causante de la presencia del hongo, debido a que en la investigación realizada por Calderon y Socha (2009) no fue empleada ningún tipo de fitohormona en las semillas, esto explicaría el resultado obtenido en el tratamiento testigo ya que fue el segundo tratamiento con mayor presencia de hongo. El efecto del nitrato de potasio en la incidencia de hongos puede estar relacionado con el cambio en la susceptibilidad de las plantas, ya que la aplicación de nitrógeno en menor cantidad no afecta la lignina, la cual es una sustancia formadora de paredes celulares (corteza) utilizadas por las plantas como defensa física contra el ataque de plagas y enfermedades. (Rubio, Grunwald, y Cardena, 2005).

5. Conclusiones

A partir del análisis de viabilidad en semillas se determinó que el origen influye en la germinación de semillas de agraz como se evidenció con las semillas provenientes de Valencia las cuales presentaron los mejores porcentajes para el desarrollo óptimo en germinación

Las semillas provenientes de Valencia Presentaron el mejor comportamiento Germinativo

Las dos concentraciones de nitrato de potasio rompen la latencia en semillas de agraz a partir de la segunda semana de la siembra mostrando diferencias estadísticas significativas en el rompimiento de testa. Mientras que el ácido giberélico tardó 4 semanas para superar los porcentajes del nitrato de potasio

El ácido giberélico en concentración de 1000 ppm obtuvo el mayor porcentaje en infección de las semillas por hongo.

Las semillas de agraz responden exitosamente a la aplicación de giberelinas y estimulantes como el nitrato de potasio

6. Recomendaciones

Investigar nuevas técnicas y concentraciones diferentes para la tinción de tetrazolio en las semillas.

Manejar 24 horas más en la imbibición de las semillas en el reactivo, para la prueba de viabilidad en embrión

Se recomienda evaluar el comportamiento germinativo de las semillas considerando la el tipo de procedencia

Continuar el estudio en las diferentes etapas de las plántulas

Evaluar el efecto de las concentraciones de nitrato de potasio y ácido giberélico en semillas sembradas en sustratos

Evaluar el efecto del nitrato de potasio para el rompimiento de testa en semillas en concentraciones de 200 a 500 ppm

Bibliografía

- Academic. (20 de marzo de 2017). *Academic*. Obtenido de <http://www.esacademic.com/>
- Aguilar, M., Melgarejo, L., & Romero, M. (2010). fitohormonas. *Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia*, 24.
- Allina, T. (30 de abril de 2015). *El Agraz, La Huerta Y El Patrimonio Cultural*. Obtenido de <http://www.trixiallina.com/blog/2015/5/14/el-agraz-la-huerta-y-el-patrimonio-cultural>
- Andrade, S., & Laurentin, H. (2015). Efecto del nitrato de potasio sobre la germinación de semillas entre cultivares de aji dulce (*Capsicum chinense* Jacq). *Unell. Ciencia*, 25-29.
- Ballesteros, I., Calderon, M., & Mancipe, C. (2018). *Propagación sexual y tolerancia a la desecación del agraz (Vaccinium meridionale Sw) de tres fuentes semilleras localizadas en Ráquira, San Miguel de Sema (Boyacá) y Gachetá (Cundinamarca)*. Bogotá: Ciencias Naturales .
- Benítez, P., Lobo, M., Delgado, O., & Medina, I. (2013). *Estudios de germinación y remoción de latencia en semillas de papayuelas Vasconcellea cundinamarcensis y Vasconcellea goudotiana*. Laboratorio de Semillas del Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación Colombiana para la Alimentación y la agricultura, Antioquia. Rionegro: Ciencia Y Tecnología Agropecuaria,.
- Benito, M., Herrero, N., Jiménez I, & Peñuelas, R. (2004). *Aplicación De Métodos Colorimétricos para la determinación de la viabilidad en semillas de pinus pinea: test de tetrazolio e indigo carmin*. Barcelona: Sociedad Española de Ciencias forestales .
- Calderón, L. C., & Socha, C. (2009). *Evaluación del estado fitopatológico del agraz (Vaccinium meridionale sw) en localidades del altiplano cundiboyacense (dos de*

- Boyacá y una de Cundinamarca*). Universidad Militar Nueva Granada, Cundinamarca. Bogota: Universidad Militar Nueva Granada.
- Calderon, L., & Socha, A. (2009). *Evaluación del estado fitopatológico del agraz (Vaccinium meridionale sw) en localidades del altiplano Cundiboyacense (dos de Boyacá y una de Cundinamarca)*. Bogota: Universidad Militar Nueva Granada.
- Carcaño, M., Ferrera, R., Perez, J., Molina, J., & Bashan, Y. (4 de Octubre de 2006). Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Tierra Latinoamericana*, 24(4), 493-502.
- Carolina, C. M., & Carolina, S. V. (2009). *Evaluación del estado fitopatológico del agraz (Vaccinium meridionale sw) en localidades del antiplano cundiboyansense (dos en Boyaca y una en Cundinamarca)*. Bogota: Universidad Militar Nueva Granada.
- Castillo, C. (2018). Avances en la propagación in vitro de agraz(*Vaccinium meriodanale Swartz*). *Universidad Nacional de Colombia*, 31-106.
- Castrillon, J. C., Carvajal, E., Gustavo, L., & Stanislav, M. (2008). El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*) en diferentes sustratos. *Agronomia Colombiana*, 16-22.
- Castrillon, j., Carvajal, E., Ligarreto, G., & Magnistskiy. (2008). El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz(*Vaccinium meridionale Swartz*) en diferentes sustratos. *Agronomia Colombiana*, 16-22.
- Chala, E. (7 de Febrero de 2009). *Control Ambiental*. Obtenido de http://ambientechala.blogspot.com/2009/02/popayan_05.html
- Chamorro, F., & Parra, G. (2015). Biología floral y reproductiva de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *portal de revistas academicas*, 1197-1212.

- Dueñas, F. P. (2017). Establecimiento in vitro del frutal andino mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) para la aplicación de agrotecnologías de multiplicación acelerada. *Quito: Universidad de las Américas*, 68.
- E.E.S.P, A. y.-S. (31 de Agosto de 2018). *cuenca piedras* . Obtenido de <http://www.acueductopopayan.com.co/gestion-ambiental/fundacion-procuenca-rio-las-piedras/fuentes-de-abastecimiento/cuenca-piedras/>
- Ecured. (2012). *Ecured*. Obtenido de https://www.ecured.cu/Propagaci%C3%B3n_de_las_plantas
- Figuerola, J., & Jaksic, F. (2004). *Latencia y banco de semillas en plantas de la región* . Santiago de Chile: Universidad Católica de Chile.
- Franco, N., Benjamin, A., Alzate, A., Morales, D., & Maldonado, M. (Medellin de 2016). Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las características físicoquímicas, antioxidantes y antiproliferativa de nectar de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *archivos latinoamericanos de nutrición*, 66 (4), 1-11.
- Gaviria, A., Ochoa, I., Sanchez, N., Medin, I., Lobo, M., Galeano, P., . . . Rojano, B. (2009). Propiedades antioxidantes de los frutos de agrazo o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Universidad Nacional de Colombia*, 20.
- Gonzalez, I., Pita, E., Pinzon, E., Celi, G., & Serrano, P. (6 de Septiembre de 2017). Efecto de tratamientos pregerminativos en semillas de *Dianthus barbatus* L. cv. "Purple" bajo condiciones controladas. *Revistas de ciencias agrícolas*, 35(1), 58- 68.
- Hernandez, M. I., Lobo, M., Medina, C. I., Cartagena, J., & Delgado, O. A. (2009). Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana*, 15-23.

- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. Chile: Ediciones Universidad de La Serena.
- Ligarreto, G. (2009). Descripción del género *Vaccinium*, estudio de caso: agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*). *Universidad Nacional de Colombia*, 13-28.
- Ligarreto, G., & Stanislav, M. (2007). El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y del ácido indolacético sobre la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 137-141.
- Magnitskiy, S., & Ligarreto, G. (2009). Plantas de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*): potencial de propagación sexual. *Universidad Nacional de Colombia*, 75-91.
- Mandujó, M., Golubov, J., & Rojas, M. (2007). *efecto del acido giberelico en la germinacion de tres especies del genero Opuntia (Cactaceae) del Desierto Chihuahuense*. Mexico.
- Medina, C., Lobo, M., Cataño, A., & Cardona, L. (enero- junio de 2015). Analisis del desarrollo de plantas de mortiño (*Vaccinium meriodonale Swartz.*) bajo dos sistemas de propagacion: clonal y sexual. *Corpoica. Ciencia y Tecnologia Agropecuaria.*, 16(1), 65-77.
- Medina, C., Lobo, M., Patiño, M., Ligarreto, G., Delgado, O., Lopera, A., & Toro, j. (2009). Variabilidad morfológica en agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*) en la zona altoandina de Colombia. *Universidad Nacional de Colombia*, 57-74.
- Monsalve, J., Escobar, R., Acevedo, M., Sanchez, M., & Coopman, R. (2009). Efecto de la concentracion de nitrogeno sobre atributos morfologicos, potencial de crecimiento radical y estatus nutricional en plantas de *Eucalyptus globus* producidas a raiz cubierta. *sciELO*, 88-94.
- Ordoñez, S. (2017). *Comportamiento germinativo del agraz (vaccinium meridionale Swartz)*. Popayan: Fundacion Universitaria de Popayan.

- Ortiz, P. C. (2003). efecto del acido giberelico, el acido clorhidrico y la estratificacion, sobre germinacion de semillas de pinabete (*abies guatemalensis* Rehder). *Universidad De San Carlos De Guatemala*, 1-67.
- Pinilla, M., & Nates, G. (Junio de 2015). Visitantes florares y polinizadores en poblaciones silvestres de agraz (*Vaccinium meriodanale*) del bosque andino Colombiano. *Revista Colombiana de Entomologia*, 41(1), 112-119.
- Rache, L., & Jose, P. (2009). Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Universidad de Antioquia*, 1- 10.
- Rincón, M., Buitrago, C., Ligarreto, G., Smith, w., & López, y. H. (s.f.).
- Rincon, M., Buitrago, M., Ligarreto, G., Smith, W., & Balaguera, H. (2012). Comportamiento Del Fruto De Agraz (*Vaccinium Meridionale* Swartz) Cosechado En Diferentes Estados De Madurez Y Almacenado En Refrigeración. *Facultad Nacional de Agronomia*, 26-85.
- Rojas, S., Garcia, J., & Alarcon, M. (marzo de 2004). Propagación asexual de plantas. *Ecojardines*, 56.
- Rubio, O., Grunwald, N., & Cardena, M. (4 de Diciembre de 2005). Influencia del nitrogeno sobra la infeccion de tizon tardio en el cultivo de papa en Toluca, Mexic. *TERRA Latinoamerica*, 23(4), 487-493.
- Ruiz, M. d. (Marzo de 2009). Analisis del tetrazolio en el control de calidad de semillas. *EEAINTA Anguil* , 77, 1-19.
- S, A. d. (16 de Enero de 2017). *San Sebastian-Cauca*. Obtenido de <http://www.sansebastian-cauca.gov.co/presentacion.shtml>
- Sanchez, J., Garcia, L., & Leon, F. (2011). *Reproduccion sexual e influencia de sustratos en el desarrollo de Malpighia Glabra*. Xochimilco: Polibotanica.

- Soledad, M. c., Buitrago, C. M., Ligarreto, G., Torres, S. W., & Balaguera, H. (2012). Comportamiento Del Fruto De Agraz (*Vaccinium Meridionale Swartz*) Cosechado En Diferentes Estados De Madurez Y Almacenado En Refrigeración. *Facultad Nacional de Agrnomia Medellin*, 10.
- Suarez, D., & Melgarejo, L. M. (Diciembre de 2010). Biología y Germinación de Semillas. *Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia*, 13-24.
- Surez, C., Hernandez, M., & Mancipe, C. (Junio de 2018). propagación sexual y tolerancia a la desecación del agraz (*Vaccinium meriodanale Sw*) de tres fuentes semilleras localizadas en Raquir, San Miguel de Seman (Boyaca y Gacheta (Cundinamarca). *Revista de la Academia colombiana de Ciencias Exactas, Fisicas y Naturales*, 42(163).
- Torres, S. W., Montolla, I. A., & Ligarreto, G. (2009). Aspectos sociales y económicos de la producción de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*) . *Perspectivas de cultivo de agraz o mortiño* , 113-134.
- Vargas, J. (2011). *Restauración ecología: biodiversidad y conservación*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Viteri, D. (2018). *Evaluación del efecto tres cepas de levadura en la elaboración de vino de mortiño (vaccinium meriodanale sw)*. Quito: Quito: Universidad de las Américas.
- web, C. t. (3 de Mayo de 2015). *Colombia turismo Web*. Obtenido de <http://www.colombiaturismoweb.com/DEPARTAMENTOS/CAUCA/MUNICIPIOS/TIMBIO/TIMBIO.htm>
- Yanes, C., Orozco, A., Rojas, M., Sanchez, M., & Cervantes, V. (2016). La reproducción de las plantas. semillas y meristemos. *Fondo de cultura económica*, 1, 170.

Zuñiga, M. (2017). *Caracterizacion del habitat del motiño (Vaccinium Floribundum Kunth) en el paramo de Cotacachi. Ecuador.* Quito: Universidad de las Americas.