



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

**Condiciones que incrementan la germinación de  
semillas y el vigor de plantines de *Cinchona krauseana*  
L. Andersson y *C. calisaya* Wedd. (Rubiaceae)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en  
Botánica

**AUTOR**

Sandra CANCHO CCAICO

**ASESOR**

Mery Luz SUNI NINATAYPE

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Cancho, S. (2017). *Condiciones que incrementan la germinación de semillas y el vigor de plantines de Cinchona krauseana L. Andersson y C. calisaya Wedd. (Rubiaceae)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA CON MENCIÓN EN BOTÁNICA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

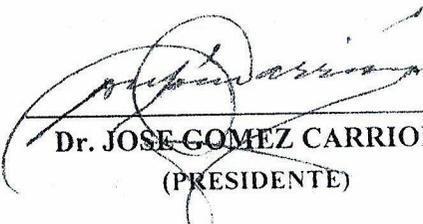
Siendo las 16:11 horas del 12 de diciembre de 2017, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga con mención en **Botánica** de SANDRA CANCHO CCAICO.

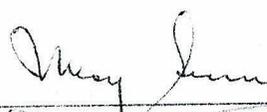
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 051-EPCB-2017, la titulando expuso su tesis: "CONDICIONES QUE INCREMENTAN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EL VIGOR DE PLANTINES DE *Cinchona krauseana* L. Andersson y *C. calisaya* Wedd (RUBIACEAE)", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 17, calificativo: *Aprobado con mención honorosa*

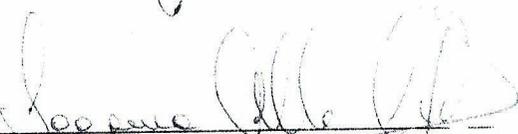
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga con mención en **Botánica** a SANDRA CANCHO CCAICO y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:35 horas se levantó la sesión.

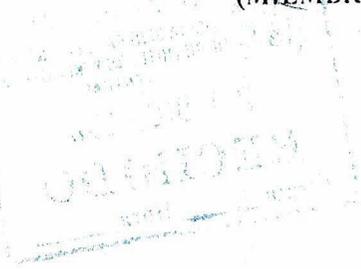
Ciudad Universitaria, 12 de diciembre de 2017

  
Dr. JOSE GOMEZ CARRION  
(PRESIDENTE)

  
Mg. MERY SUNI NINATAYPE  
(ASESORA)

  
Dra. JOAQUINA ALBA CASTILLO  
(MIEMBRO)

  
Mg. RAFAEL LA ROSA LOLI  
(MIEMBRO)



## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente, a quienes me acompañaron en este recorrido. A Dios Padre porque siempre está conmigo. A mis padres y hermanos, por su paciencia y comprensión. Mi estimada asesora, la profesora Mery Suni, por la oportunidad de trabajar con ella, por sus palabras, motivación y sobre todo por su ejemplo. A mis amigos por la empatía y a otros simplemente por escuchar.

Finalmente, al Vicerrectorado de la UNMSM por financiar parcialmente los gastos que demandaron el presente trabajo y brindarme la oportunidad de lograr esta meta mediante el Fondo de Promoción de trabajo de Tesis de Pregrado con R.R. N° 00722-R-16.

## INDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>INDICE GENERAL</b> .....	iv
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	vii
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>RESUMEN</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2 MARCO TEÓRICO</b> .....	5
2.1 Diversidad y Distribución de las especies .....	5
2.2 Características de las semillas de <i>Cinchona calisaya</i> y <i>C. krauseana</i> .....	6
2.3 Germinación .....	6
2.4 Tolerancia a la desecación .....	9
2.5 Contenido de humedad de las semillas .....	10
2.6 Viabilidad de semillas .....	10
2.7 Prueba de Tetrazolio para determinar la viabilidad de las semillas .....	11
2.8 Uso del Nitrato de potasio como inductor de la germinación.....	12
2.9 Uso del agua de coco como inductor de la germinación.....	13
2.10 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal .....	14
2.11 Vigor de semillas y plántulas .....	16
<b>3 HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	18
4.1 Objetivo general .....	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
<b>5 MATERIALES</b> .....	19
5.1 Material Biológico.....	19
5.2 Material de Campo y de Laboratorio .....	19
<b>6 MÉTODOS</b> .....	22
6.1. Origen de las semillas de <i>C. calisaya</i> y <i>C. krauseana</i> .....	22
6.2. Relación del color y visibilidad del embrión en las semillas de <i>C. krauseana</i> y <i>C. calisaya</i> con sus porcentajes de viabilidad. ....	22

6.3. Evaluación del efecto de la aplicación de nitrato de potasio y agua de coco (técnica de <i>seed priming</i> ) en semillas de <i>C. krauseana</i> y <i>C. calisaya</i> para maximizar el porcentaje de germinación.....	24
6.3.1 Preparación de las soluciones inductoras .....	24
6.3.2 Preparación de las dosis de nitrato de potasio .....	24
6.3.3 Siembra y evaluación .....	24
6.4. Evaluación del efecto de 2, 6 y 11 semanas de almacenamiento de las semillas de <i>C. krauseana</i> a 4, 8.7, 12.9 y 25% de contenido de humedad sobre su porcentaje de germinación.....	28
6.4.1 Ensayos previos.....	28
6.4.2 Método para que las semillas alcancen 4, 8.7, 12.9 y 25% de contenido de humedad.....	28
6.4.3 Estabilización del contenido de humedad alcanzado por las semillas.....	29
6.4.4 Cálculo del contenido de humedad real.....	29
6.4.5 Cálculo del porcentaje de germinación.....	30
6.5. Evaluación del efecto de la inoculación con PGPR ( <i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i> ) sobre el vigor de las plantines de <i>C. krauseana</i> y <i>C. calisaya</i> .....	31
6.5.1 Colecta del suelo.....	31
6.5.2 Aislamiento y ensayos para la selección de rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta.....	31
6.5.3 Preparación de las bandejas y trasplante de las plántulas de <i>Cinchona</i> .....	32
6.5.5 Evaluación de las variables.....	33
<b>7 RESULTADOS</b> .....	36
7.1 Relación del color y visibilidad del embrión en las semillas de <i>C. krauseana</i> y <i>C. calisaya</i> con sus porcentajes de viabilidad.....	36
7.2 Efecto de la aplicación de nitrato de potasio y agua de coco (técnica de <i>seed priming</i> ) en semillas de <i>C. krauseana</i> y <i>C. calisaya</i> para maximizar el porcentaje de germinación.....	42
7.3 Efecto de 2, 6 y 11 semanas de almacenamiento de las semillas de <i>C. krauseana</i> a 4, 8.7, 12.9 y 25% de contenido de humedad sobre el porcentaje de germinación. ....	50
7.4 Efecto de la inoculación con PGPR ( <i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i> ) sobre el vigor de los plantines de <i>C. krauseana</i> y <i>C. calisaya</i> .....	59
<b>8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	63
8.1 Relación del color y visibilidad del embrión en las semillas de <i>C. krauseana</i> y <i>C. calisaya</i> con sus porcentajes de viabilidad.....	63
8.2 Efecto de la aplicación de nitrato de potasio y agua de coco (técnica de <i>seed priming</i> ) en semillas de <i>C. krauseana</i> y <i>C. calisaya</i> para maximizar el porcentaje de germinación.....	64

8.3 Efecto de 2, 6 y 11 semanas de almacenamiento de las semillas de <i>C. krauseana</i> a 4, 8.7, 12.9 y 25% de contenido de humedad sobre el porcentaje de germinación. ....	65
8.4 Efecto de la inoculación con PGPR ( <i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i> ) sobre el vigor de los plantines de <i>C. krauseana</i> y <i>C. calisaya</i> . ....	67
<b>9 CONCLUSIONES</b> .....	69
<b>10 RECOMENDACIONES</b> .....	70
<b>11 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	71
<b>12 ANEXO</b> .....	82

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución geográfica de <i>C. calisaya</i> en Perú.....	5
<b>Tabla 2.</b> Viabilidad de las semillas según la tinción de los embriones de <i>Cinchona</i> .....	23
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos inductores de la germinación para <i>C. krauseana</i> y <i>C. calisaya</i> . ....	25
<b>Tabla 4.</b> Concentración bacteriana por inóculo de PGPR (UFC/ml).....	33
<b>Tabla 5.</b> Clasificación inicial que se dio a las semillas según su especie, color y visibilidad del embrión en el estereoscopio.....	36
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de viabilidad de las semillas de <i>Cinchona</i> considerando su coloración. ....	41
<b>Tabla 7.</b> Porcentajes de germinación de <i>Cinchona</i> con los tratamientos inductores.....	44
<b>Tabla 8.</b> Semillas de <i>C. krauseana</i> clasificadas en Lotes según su contenido de humedad y tiempo de almacenamiento. ....	51
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de germinación de las semillas de <i>C. krauseana</i> almacenadas a los contenidos de humedad y los tiempos de almacenamiento establecidos. ....	52
<b>Tabla 10.</b> Promedio de las variables evaluadas en cada especie de <i>Cinchona</i> .....	60

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de adsorción de agua de las semillas y las actividades metabólicas asociadas con las diferentes fases.....	8
Figura 2. Matraces con soluciones inductoras de la germinación. ....	26
Figura 3. Siembra de semillas por cada tratamiento inductor .....	26
Figura 4. Placas Petri con las semillas sembradas ubicadas en el área de cultivo.....	27
Figura 5. Cámara húmeda. ....	30
Figura 6. Cámara seca. ....	30
Figura 7. Árbol joven de <i>Cinchona pubescens</i> en la concesión para la Conservación del Bosque Pichita Puyu Sacha (Junín).....	34
Figura 8. Colecta de muestras de suelo para producción del inóculo de PGPR. ....	34
Figura 9. Plántulas de <i>Cinchona</i> en crecimiento dentro del “mini invernadero”.....	35
Figura 10. Medición de las variables de una plántula de <i>Cinchona</i> .....	35
Figura 11. Diferencias entre los lotes de <i>Cinchona calisaya</i> . ....	37
Figura 12. Diferencias entre lotes de <i>Cinchona krauseana</i> . ....	38
Figura 13. Extracción de los embriones en semillas de <i>C. calisaya</i> .....	38
Figura 14. Embriones de <i>Cinchona calisaya</i> . ....	39
Figura 15. Embriones de <i>Cinchona krauseana</i> . ....	40
Figura 16. Vigor de las semillas de <i>Cinchona</i> según intensidad de tinción con Tz. ....	42
Figura 17. Semillas de <i>Cinchona calisaya</i> tratadas con inductor agua de coco. ....	45
Figura 18. Semilla y embriones de <i>Cinchona krauseana</i> tratadas con agua de coco y evaluadas con prueba Tz. ....	46
Figura 19. Semillas y plántulas de <i>C. calisaya</i> después de 11 días de ser llevadas a germinar.....	47
Figura 20. Semillas y plántulas de <i>C. krauseana</i> después de 20 días de ser llevadas a germinar.....	48
Figura 21. Gráfico de barras con el porcentaje de germinación de <i>Cinchona</i> por cada tratamiento.....	49
Figura 22. Germinación de las semillas de <i>C. krauseana</i> almacenadas con 4 % de contenido de humedad.....	53
Figura 23. Germinación de las semillas de <i>C. krauseana</i> almacenadas 8.7% de contenido de humedad.....	54
Figura 24. Germinación de las semillas de <i>C. krauseana</i> almacenadas 12.9% de contenido de humedad.....	55
Figura 25. Germinación de semillas de <i>C. krauseana</i> con 25% de contenido de humedad. ....	56
Figura 26. Gráfico que describe la velocidad de germinación de las semillas que fueron almacenadas por 2 semanas.....	57
Figura 27. Gráfico que describe la velocidad de germinación de las semillas que fueron almacenadas por 6 semanas.....	57
Figura 28. Gráfico que describe la velocidad de germinación de las semillas que fueron almacenadas por 11 semanas.....	58
Figura 29. Comparación del promedio de número de hojas de <i>Cinchona</i> por tratamiento PGPR y Control durante las fechas de evaluación.....	61

Figura 30. Comparación del promedio del largo de ambas hojas de <i>Cinchona</i> por tratamiento PGPR y Control durante las fechas de evaluación.....	61
Figura 31. Comparación del promedio del número de plantines vivos de <i>Cinchona</i> por tratamiento PGPR y Control durante las fechas de evaluación.....	62

## RESUMEN

Las especies de *Cinchona* conocidas como “quinas” o “cascajillas” comprenden varias especies del género *Cinchona*, entre ellas *C. officinalis* y *C. pubescens*. Las dos especies de *Cinchona* más estudiadas son la *C. officinalis* y *C. calisaya*; sus alcaloides han sido aislados de sus cortezas y han sido utilizadas mundialmente como remedio contra la malaria por más de 300 años. El uso de estas especies y la expansión de la zona urbana ha implicado que sus poblaciones naturales bajen drásticamente y en algunos de los casos estén amenazadas debido principalmente a su baja tasa de germinación y regeneración, encontrándose únicamente en lugares apartados y en pequeños grupos. Además, existe poca información sobre la fisiología de la germinación de sus semillas y vigor de plantines con fines de propagación y su establecimiento en campo. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar las condiciones que incrementan el porcentaje de germinación y el vigor de los plantines de *C. calisaya* Wedd. y *C. krauseana* L. Andersson. Se clasificaron las semillas de ambas especies por su coloración y visibilidad de su embrión para conocer si existe relación con su porcentaje de viabilidad. También se evaluó el efecto del  $\text{KNO}_3$  y agua de coco sobre sus porcentajes de germinación. Por otra parte, se estudió el efecto que tiene el tiempo de almacenamiento y contenido de humedad de las semillas sobre su porcentaje de germinación. Finalmente, se evaluó el efecto de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, aisladas del suelo nativo de *C. pubescens* en la Concesión para la Conservación del Bosque Pichita Puyu Sacha (Junín), sobre el vigor de los plantines de *C. krauseana* y *C. calisaya*. Los resultados nos indicaron que la clasificación por coloración y visibilidad del embrión no tienen relación con el porcentaje de viabilidad de las semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya*. Las semillas de *C. krauseana* son recalcitrantes y el  $\text{KNO}_3$  aumentó el porcentaje de germinación de estas semillas. Finalmente, los inóculos de PGPR aplicados a los plantines de las dos especies no se presentaron diferencias significativas con el Control a un p-valor 0.05. El presente trabajo aporta información que servirá para

mejorar el manejo de las semillas y plantines de *Cinchona* y así plantear a futuro la propagación y/o reforestación de estas especies en el Perú.

## ABSTRACT

*Cinchona* species known as “quinas” or “husks”; comprise several species of the genus *Cinchona*, including *C. officinalis* and *C. pubescens*. The two most studied species of *Cinchona* are *C. officinalis* and *C. calisaya*; its alkaloids have been isolated from their bark and have been used worldwide as a remedy against malaria for more than 300 years. The use of these species and the expansion of the urban area has involved that their natural populations drop drastically and in some of the cases they are threatened due mainly to their low germination and regeneration rate, being found only in isolated places and in small groups. In addition, there is little information about the physiology of seed germination and seedling vigor for propagation purposes and field establishment. Therefore, the objective of this work was to determine the conditions that increase the percentage of germination and the vigor of the seedlings of *C. calisaya* Wedd and *C. krauseana* L. Andersson. The seeds of both species were classified by their coloration and visibility of their embryo to know if there is a connection with their viability percentage. The effect of KNO<sub>3</sub> and coconut water on its germination percentages was also evaluated. On the other hand, the effect of the storage time and moisture content of the seeds on their percentage of germination was studied. Finally, the effect of the plant growth promoting bacteria, isolated from the native soil of *C. pubescens* in the Pichita Puyu Sacha Forest Conservation Concession (Junín), on the vigor of the *C. krauseana* and *C. calisaya* seedlings was evaluated. The results indicated that the classification by coloration and visibility of the embryo have no connection with the percentage of viability of the seeds of *C. krauseana* and *C. calisaya*. The seeds of *C. krauseana* are recalcitrant and the KNO<sub>3</sub> increased the percentage of germination of these seeds. Finally, the PGPR inocula applied to the seedlings of the two species did not show significant differences with the Control at a p-value of 0.05. The present work provides

information that will serve to improve the management of sedes and seedlings of Cinchona and thus propound future propagation and / or reforestation of these species in Peru.

## 1 INTRODUCCIÓN

Las especies de *Cinchona* identificadas como “quininas” o “cascañillas” símbolo en el escudo nacional de nuestra riqueza vegetal, comprende especies del género *Cinchona*, entre ellas *C. officinalis* y *C. pubescens*. Son plantas medicinales distribuidas en el bosque montano de la región andina sudamericana (Andersson, 1998) y han sido utilizadas mundialmente como remedio contra la malaria y desórdenes infecciosos por más de 300 años, lo que ha llevado a considerarlas como plantas “salvadoras de la humanidad” (Buitrón, 1999).

Las dos especies de *Cinchona* más estudiadas son la *C. officinalis* y *C. calisaya*; sus alcaloides han sido aislados y caracterizados, principalmente mediante cromatografía líquida de alta eficacia (Keene et al., 1983). Se han aislado alrededor de 25 alcaloides entre las diversas especies de *Cinchona* (Verpoorte et al., 1989) siendo los más importantes la quinina y su estereoisómero quinidina que se encuentra en la corteza de las mismas. En la actualidad la demanda de la corteza ha disminuido, dada la síntesis obtenida a partir del compuesto, con propiedades análogas a la quinina disminuyendo dramáticamente la importancia de la cosecha comercial (Albán, 2013). Sin embargo, habiéndose incrementado la resistencia de los parásitos de la malaria, (algunos de estos resistentes a la quinina) se ha revitalizado el interés por el descubrimiento de otros alcaloides más eficaces provenientes de otras especies de *Cinchona* y géneros afines como *Ledenbergia* y *Remigia* (Albán, 2013).

Según Albán (2013), la corteza de *C. calisaya* Wedd es usada como antifebrifugo, quita las calenturas y tercianas. Fue empleado por los indígenas para combatir toda clase de calenturas, y tercianas; así también, es astringente, antiséptica, sudorífica, estomática, diurética y cicatrizante de heridas. Albán (2013) también menciona que *C. krauseana* tiene se usa como antifebrifugo y se bebe la infusión de la corteza (en Bolivia).

El uso de estas especies ha implicado que sus poblaciones naturales bajen drásticamente y en algunos de los casos estén amenazadas. El Ministerio de agricultura en su propuesta de Categorización de las especies de la Flora Silvestre Amenazada ha incluido a *Cinchona calisaya* en la categoría de vulnerable (Vu) (basados en los criterios del UICN, 2001), bajo la disposición del decreto Supremo N° 043-2006-AG. Por ello, es fundamental realizar trabajos que apoyen su conservación *in situ* y *ex situ*.

Buddenhagen et al. (2004) menciona que en condiciones naturales *Cinchona pubescens* presenta baja tasa de germinación y regeneración, encontrándose únicamente en lugares apartados y en pequeños grupos. Esto nos puede dar una idea del comportamiento del género.

Información como la morfología de las cápsulas y semillas de las plantas nos ayudan a obtener mayor conocimiento de su calidad y por tanto, del manejo y conservación de sus semillas. Por ejemplo, los rasgos morfológicos de las cápsulas podrían ayudar a establecer su calidad (Romero, 2015). No existe información sobre el vigor de los plantines de *Cinchona*. Sin embargo, por el lento y delicado desarrollo observado en experimentos anteriores en plantines de *C. calisaya* y *C. krauseana* se puede indicar que su vigor es bajo. Por esto sería conveniente conocer las condiciones de las plantas en campo y sus semillas desde el momento de colecta.

Por ejemplo, Amorim et al (1997), con fines de favorecer la germinación de *Trema micrantha* (Familia Ulmaceae) concluyen que los rasgos morfológicos son una importante herramienta para comprender los procesos germinativos de esa especie. Además, Martin (1946) utilizó rasgos morfológicos para clasificar a las semillas, de acuerdo con el tamaño y disposición del embrión dentro de la semilla, clasificación que hasta la actualidad se sigue utilizando como una referencia en estudios de evolución, morfología y dormancia de semillas (Forbis et al., 2002; Baskin & Baskin, 2004; FinchSavage & Leubner-Metzger, 2006).

Existen algunos estudios donde se han evaluado el porcentaje de germinación de diferentes especies de *Cinchona*, entre ellas *C. pubescens*, *C. krauseana*, *C. macrocalix* y *C. officinalis* (Mejía, 2014; Cancho et al., 2016). Campos et al. (2014) utilizó nitrato de potasio y agua de coco con la finalidad de elevar el porcentaje de germinación de semillas de *Cinchona pubescens*. También se han investigado diferentes maneras de propagar el género, enraizamiento por estacas, enraizamiento por brotes, enraizamiento por acodos aéreos y con diferentes sustratos para germinar las semillas (Conde et al., 2017). Esto nos demuestra que hay un interés por propagar el género. Sin embargo, sigue siendo un problema el manejo de las semillas y los plantines.

Mejía (2014) realizó una investigación sobre las condiciones extrínsecas e intrínsecas que requieren las semillas de 6 especies de *Cinchona* y presenta en sus resultados que semillas de *Cinchona krauseana* llevadas a un rango de contenido de humedad entre 4-6% y analizadas luego de 16 semanas de almacenamiento en refrigeración incrementan su porcentaje de germinación. Así mismo, asegura que el contenido de humedad de las semillas de *C. krauseana* tiene una relación inversa y significativa con su porcentaje de germinación.

Por otro lado, estudios en plantas de *Cinchona* demuestran su capacidad micorrítica. Caso específico es el de *Cinchona pubescens* en Loja, Ecuador (Apolo, 2012). Así también, se han realizado conteo de esporas de micorrizas en plantas jóvenes y adultas de *C. pubescens* en la Concesión para la Conservación del Bosque Pichita Puyu Sacha en Junín, Perú encontrándose que *Cinchona pubescens* presenta una fuerte interacción con micorrizas desde una etapa temprana de desarrollo indicando una aparente necesidad a micorrizar (Cancho et al., 2016). Información que nos lleva a pensar sobre el apoyo fundamental de los microorganismos para el establecimiento de *Cinchona* en campo. Por lo tanto, es inevitable pensar en las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

que logran mejorar la disponibilidad de nutrientes para las plantas, producen hormonas vegetales y logran suprimir enfermedades de plantas.

Tomando en cuenta estos factores externos e internos importantes, el presente trabajo planteó evaluar las condiciones que las semillas y plantines de dos especies de *Cinchona* requieren para mejorar su porcentaje de germinación y vigor con fines de propagación y su establecimiento en campo.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Diversidad y Distribución de las especies

Las especies del género *Cinchona* se distribuyen desde Costa Rica hasta el Oeste de Sur América (Albán, 2013). *calisaya* Wedd. está distribuido en Perú, Bolivia, Colombia, Guatemala, Madagascar, India y Tanzania. En Perú, su distribución geográfica es limitada (región Puno); y con menos de 10,000 individuos en 20,000 Km<sup>2</sup>, lo que proyecta la posibilidad de extinción de sus individuos en estado silvestre del 10% en los próximos 100 años (Albán, 2013). En el Perú se encuentra entre los 1,000 y 1,500 m.s.n.m. La situación poblacional de esta especie es de peligro. Además, en la actualidad dicha zona viene sufriendo una fuerte deforestación, para ampliación de la frontera agrícola y extracción de madera. La especie se encuentra confinada entre las provincias de Carabaya y Sandia del departamento de Puno (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Distribución geográfica de *C. calisaya* en Perú

Nombre científico	Departamento	Provincia	Longitud (°S; O)	Latitud (°S; S)	Altitud (msnm)
<i>Cinchona calisaya</i>	Puno	Carabaya	70°00'00"	14°00'00"	2190
	Puno	Sandia	69°26'24"	14°15'00"	

\*Fuente: Zevallos, (1989).

Por otra parte, *Cinchona krauseana* se encuentra distribuida en Bolivia, Ecuador y Perú (Albán, 2013).

Albán (2013) menciona que el género se encuentra distribuido principalmente en bosques montanos de los Andes. Así mismo, menciona que la familia Rubiaceae encuentra su mayor representación en bosques amazónicos (selva alta y baja), registrándose el 89.68%, para los andes el 9.94% y para la Costa el 0.36%.

*Cinchona* es un género neotropical con cerca de 23 especies distribuidas desde Costa Rica hasta el sur de Bolivia. En Perú, Brako y Zarucchi (1993) reportaron 18 especies del género, 6 de ellas endémicas entre las que se encontraba *Cinchona krauseana* (Pino y Taylor, 2006). Así mismo, el departamento de Amazonas presenta 9 especies, por lo que también podría considerarse un centro de diversidad (Albán, 2012).

Para Colombia se conocen siete especies, la mayoría exclusivas de la región Andina en altitudes por encima de los 1.000m; *C. barbacoensis* se encuentra en el piedemonte pacífico del departamento de Nariño y puede bajar hasta los 100 m de altitud (Delprete & Cortés, 2002; Andersson, 1992; Jiménez, 2002).

## **2.2 Características de las semillas de *Cinchona krauseana* y *C. calisaya***

Las semillas de *Cinchona krauseana* presentan una forma plana convexa de testa blanca con presencia de alas frágiles de color café y miden aproximadamente 5.1 mm de largo por 3.9 mm de ancho, incluida el ala, el margen del ala se encuentra dentado (Mejía, 2014).

Las semillas de *Cinchona calisaya* presentan una forma fusiforme de testa blanda con superficie membranosa con presencia de alas muy frágiles que se rompen fácilmente y terminan en pequeños tricomas simples de color café amarillento. Semillas con endospermo y embrión pequeño espatulado con desarrollo rudimentario, tipo espatulado de color blanco.

## **2.3 Germinación**

La germinación incorpora aquellos eventos que se inician con la absorción de agua por la semilla seca y terminan con la elongación del eje embrionario. El proceso concluye cuando la radícula penetra y atraviesa las estructuras que rodean el embrión, lo que frecuentemente se conoce como “germinación visible” (Herrera et al., 2006). La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos que incluye la respiración,

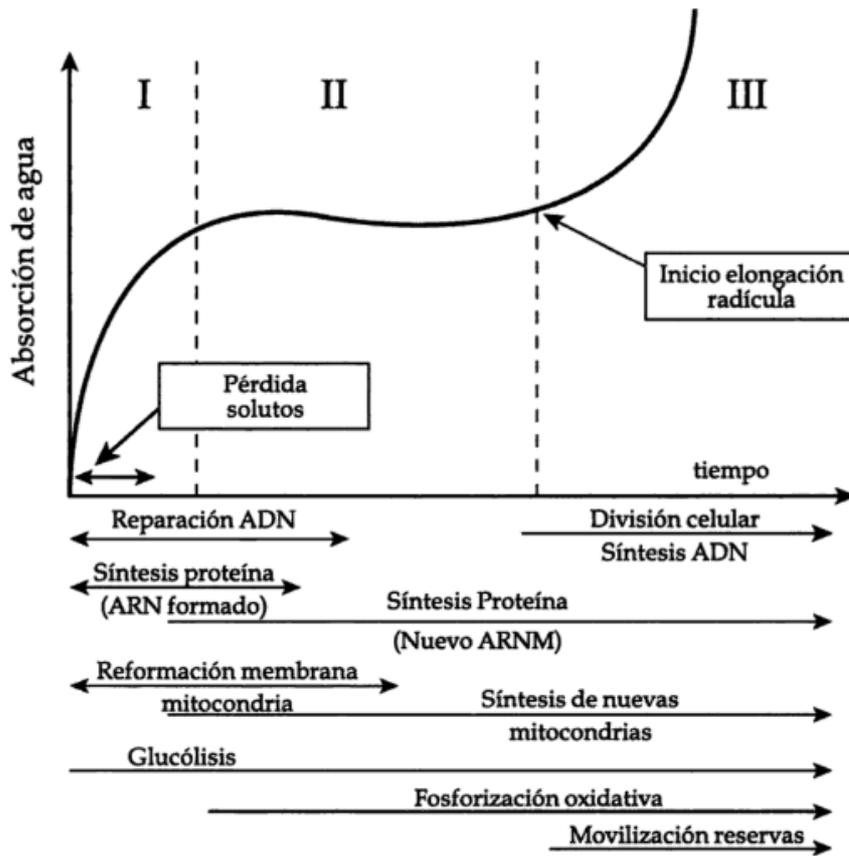
síntesis protéica y movilización de reservas. A su vez, la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la rotura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula (Chong et al., 2001). Sin embargo, las semillas de muchas especies son incapaces de germinar, aun cuando presentan condiciones favorables para ello, lo cual se debe a que las semillas se encuentran en estado de latencia. Por ello, mientras no se den las condiciones adecuadas para la germinación, la semilla se encontrará en estado latente durante un tiempo variable, dependiendo de la especie, hasta que en un momento dado pierda su capacidad de germinar (Chong et al., 2001).

Fases de la germinación son (**Figura 1**):

**Hidratación:** la absorción de agua por imbibición, causando su hinchamiento y ruptura de la testa, este es el primer paso para la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria.

**Germinación:** representa el verdadero proceso en el que se producen las transformaciones metabólicas necesarias para el completo crecimiento y desarrollo de la plántula. Representa el inicio de la actividad enzimática, translocación y asimilación de las reservas alimentarias en las regiones de crecimiento del embrión. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse.

**Crecimiento:** es la última fase de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria (Koornneef et al. 2002). Concluyendo con el desarrollo de una plántula, que representa el primer estadio de desarrollo de la planta hasta que emergen las primeras hojas verdaderas.



**Figura 1.** Curva de adsorción de agua de las semillas y las actividades metabólicas asociadas con las diferentes fases.

I= fase de imbibición; II= germinación sensu stricto; III= crecimiento de la radícula.

Fuente: Herrera et al. (2006).

## 2.4 Tolerancia a la desecación

Las semillas ortodoxas toleran niveles de desecación hasta de 3 %, lo que permite conservarlas por décadas a temperaturas cercanas a 0 °C en bancos de germoplasma.

Estas adquieren la capacidad de tolerar la desecación durante la última etapa de su desarrollo, a través de cambios celulares, fisiológicos y bioquímicos. Entre los cambios celulares, Fisher et al. (1988) encontraron reducción de almidón en los plastidios de los embriones en *Sinapis alba* L. Por otro lado, Berjak et al. (1992) observaron reducción de vacuolas en embriones de semillas ortodoxas de *Landolphia kirkii*, mientras que en semillas recalcitrantes de *Avicennia marina* no se manifestó esa reducción (Farrant et al., 1997). En semillas de *Phaseolus vulgaris* L. se reportó una reducción en el número de mitocondrias (Farrant et al., 1997) y alineamiento de cuerpos lipídicos sobre la membrana celular en embriones de maíz (*Zea mays* L.) (Córdova y Burris, 2002).

El contenido mínimo de humedad que tolera la semilla, varía entre especies y dentro de la misma especie, de otra manera muere. En semillas ortodoxas ese contenido fluctúa entre 3 y 7 %, mientras que en las recalcitrantes fluctúa entre 12 y 31 % (Wesley-Smith et al., 1992). Chin (1978) reportó que la viabilidad de semillas de alcanfor de Borneo (*Dryobalanops aromatica* L.), cacao y rambután se redujo considerablemente con humedades de 35, 27 y 20 %, respectivamente. Además, Dursset et al. (1998) observaron que *Coffea arabica* es sensible a la desecación con contenidos de humedad inferiores a 8 %, mientras que en *C. sessiliflora* y *C. racemosa* se observó por debajo de 30 %.

De modo que las semillas se clasifican como:

Semillas ortodoxas, aquellas que son tolerantes a la desecación, se dispersan y conservan luego de alcanzar un bajo porcentaje de humedad.

Semillas recalcitrantes, aquellas que son sensibles a la desecación, se dispersan junto con los tejidos del fruto (carnoso) con altos contenidos de humedad.

## **2.5 Contenido de humedad de las semillas**

Entre los factores físicos más importantes que afectan la calidad de las semillas durante el almacenamiento son la humedad de equilibrio de la semilla, humedad relativa y temperatura de almacenamiento que la rodea, ya que estos dos últimos son los que inciden principalmente sobre su contenido de humedad (Piriz et al., 2008).

El contenido de humedad de la semilla se incrementa cuando aumenta la temperatura del ambiente donde se encuentra almacenado, siempre y cuando la humedad relativa permanezca estable. Pero cuando la temperatura del aire se calienta, las semillas disminuirán su humedad de equilibrio: por ejemplo, las semillas de arroz en una humedad relativa de 70 % y temperatura de 15°C tendrán una humedad de equilibrio de 13,8 %, pero si se aumenta la temperatura a 25°C a la misma humedad relativa, la capacidad de retención de agua de ese ambiente también aumenta y la humedad de equilibrio de la semilla en ese ambiente disminuye a 13,3 %. No obstante, hay que señalar que la temperatura y humedad relativa actúan en forma independiente; por tanto, si una aumenta hay que disminuir la otra (Magnitskiy y Plaza, 2007)

## **2.6 Viabilidad de semillas**

Se consideran semillas viables a aquellas que son capaces de transformarse en plántulas aceptables para su posterior trasplante en el campo, suelo o invernadero. Por el contrario, el concepto de no viable serían aquellas semillas totalmente muertas o que pudieran dar lugar a plántulas anormales, que no formarían parte del porcentaje de germinación real y que si se llevasen a campo no darían cosecha (Pérez y Pita, 1999).

Carvalho y Nakagawa (1993) argumentan que el porcentaje de viabilidad está influenciado por las características genéticas de la planta progenitora y por factores ambientales como

las condiciones climáticas durante la floración, formación, desarrollo y maduración del fruto, el grado de madurez de la semilla al momento de la cosecha y el manejo durante la colecta y la postcosecha.

El tiempo que tardan las semillas en perder su viabilidad (longevidad) es variable según las especies y dependiente de factores tanto externos (temperatura ambiental), como internos (contenido en humedad, genotipo, etc.) a las propias semillas.

De acuerdo con Bidwell (2000), el envejecimiento es un factor que generalmente disminuye la viabilidad en las semillas, y es de suma importancia conocer la viabilidad de las semillas para determinar el periodo de tiempo en el que conservan su capacidad para germinar y así lograr una propagación exitosa (Hartmann y Kester 1994).

## **2.7 Prueba de Tetrazolio para determinar la viabilidad de las semillas**

La metodología del ensayo de tetrazolio (Tz) ha sido propuesta por la ISTA (*International Seed Testing Association*) para evaluación de la viabilidad de numerosas especies de plantas cultivadas. Es una prueba bioquímica que nos ayuda a determinar la viabilidad de los embriones de las semillas. Diferencia los tejidos vivos de los muertos sobre la base de la actividad de enzimas deshidrogenasas las cuáles participan en las reacciones de respiración que se producen en la mitocondria de las células vivas. Al ser hidratadas las semillas, la actividad de las deshidrogenasas incrementa, resultando en la liberación de iones hidrógeno, lo que reducen la solución incolora de 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio en un color rojo/rosa genéricamente llamado formazán. El formazán tiñe a las células vivas de color rojo o rosado intenso, en tanto que las muertas permanecen sin colorear. La viabilidad de las semillas se determina en función al 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 (Ruiz, 2009).

## **2.8 Uso del Nitrato de potasio como inductor de la germinación**

El nitrato de potasio es una fuente ideal de N y K para una óptima nutrición vegetal. Según el IPNI (International Plant Nutrition Institute), el nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) es una fuente soluble de dos nutrientes esenciales muy importantes. Es comúnmente utilizado como fertilizante para cultivos de alto valor que se benefician con la nutrición de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y una fuente de potasio (K) libre de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ).

Según el PNA (Potassium Nitrate Association) el nitrógeno es el mayor componente de las proteínas (incluidas las enzimas).

El tratamiento de semillas con compuestos nitrogenados, como el  $\text{KNO}_3$ , está ampliamente relacionado con una mayor tasa de germinación y el crecimiento temprano en diferentes especies vegetales (Shim et al, 2008). El efecto del  $\text{KNO}_3$  sobre la germinación es dependiente de la concentración y del modo de aplicación usados. Por otro lado, las especies reactivas del nitrógeno, como el óxido nítrico (NO), también están asociadas al proceso de germinación (Diaz-Vivancos et al., 2013).

Así también, Hartmam y Kester (1994) sostienen que muchas semillas recién cosechadas y en letargo germinan mejor después de ser remojadas en una solución de nitrato de potasio.

Fontana et al. (2002) consideran 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. Batak et al. (2002) señalan que 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 A. Alboresi

et al. (2005) señalan que la aplicación exógena de nitrato logra que estos actúen como moléculas de señal en las vías metabólicas del ácido abscísico o del ácido giberélico. Por estas razones es un promotor de la germinación recomendado ampliamente en las Reglas Internacionales de Ensayos de Semillas (ISTA, 2008) para superar la dormición en semillas de diversas especies. Asimismo, se han realizado ensayos usando el  $\text{KNO}_3$  en diferentes especies (*Vaccinium meridionale*, *Panicum máximum*, *Brachiaria*, *Nothofagus betuloides*, etc.) que presentan resultados favorables por el uso de este compuesto en semillas con dificultades para germinar, así como también, es considerable el aumento que genera en la velocidad de germinación comparada con los testigos.

## **2.9 Uso del agua de coco como inductor de la germinación**

El agua de coco es un componente natural el cual además de su comprobado contenido de reguladores de crecimiento (citoquininas) es rico en componentes nutritivos como aminoácidos, vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos y otros elementos nitrogenados (Krikorian, 1993).

Los frutos en desarrollo son también otra rica fuente de citoquininas, observándose que las más altas concentraciones se han encontrado en frutos jóvenes, particularmente en semillas (Weaver, 1976).

Las citoquininas son importantes en todas las etapas del desarrollo vegetal, desde la división celular hasta la elongación de las células, por lo cual se encuentran en mayor concentración en los meristemas de embriones y frutos inmaduros, en donde normalmente se encuentra en concentraciones inferiores a la mayoría de fitohormonas y el efecto fisiológico que genera depende de la especie (Smith y Atkins, 2002). Por lo que participan activamente en la regulación de la división celular y la elongación de la raíz. Posteriormente la fitohormona se redistribuye dentro del embrión a las regiones donde dirige el crecimiento de la raíz (Kucera et al., 2005).

En un estudio realizado por Patiño et al. (2011) se evaluó el porcentaje de germinación de semillas de *Dracontium grayumianum* después de su inmersión en endospermo líquido de coco (agua de coco) al 100% proveniente de frutos jóvenes verdes por tres días, encontrando que el porcentaje de germinación de estas semillas aumentó hasta 50% en comparación del control. Sin embargo, un ensayo realizado por Campos et al. (2014) en semillas de *Cinchona*, específicamente en semillas de *Cinchona pubescens* evaluó el efecto del agua de coco a concentraciones de 30, 50 y 70% como tratamiento inductor de la germinación encontrando que las concentraciones mayores a 50% redujeron su porcentaje de germinación de hasta 29% en comparación al tratamiento control.

## **2.10 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés Plant growth promoting rhizobacteria) son microorganismos de gran importancia para la agricultura. Los microorganismos considerados PGPR habitan en la rizósfera de las plantas.

Hiltner (1904), definió por primera vez el término rizósfera (Hartmann et al., 2008). En la cual, él hace referencia a la parte del suelo donde se lleva a cabo la interacción entre la raíz de las plantas y los microorganismos. Múltiples investigaciones han demostrado la eficacia de los PGPR en cultivos agrónomicamente importantes (Peña y Reyes, 2007; Piromyou, et al., 2011; Sánchez et al., 2014).

Además, los PGPR de vida libre poseen más de un mecanismo para ejercer su capacidad promotora de crecimiento (Ribaudó et al., 2013). Estos son directos e indirectos (Camelo et al., 2011; Gómez et al., 2012). Los mecanismos directos están relacionados con la producción de fitohormonas tales como, el ácido Indol acético (AIA), citoquinina y giberelinas (Sarabia et al., 2010); la disponibilidad de nutrientes en el suelo mediante la solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno y producción de sideróforos (Martínez et al.,

2013); aumento del volumen de la raíz (Criollo, 2012), promoción de la germinación de semillas y emergencia, mediante la producción de sustancias fenólicas como las quinonas (Frioni, 2011). Por otro lado, los mecanismos indirectos se relacionan con la resistencia a patógenos por síntesis de sustancias inhibitorias, producidas por las PGPR empleando la producción de sideróforos, antibióticos, enzimas líticas o inducción de mecanismos de resistencia (Otero, 2011).

Barreto (2007) menciona que realizó ensayos en plántulas de *Anacardium excelsum* para conocer la estimulación del crecimiento vegetal con inóculos PGPR resultando con mejor desarrollo foliar las inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* con 6 hojas y con menor desarrollo foliar las del tratamiento Control (sin inóculo PGPR) con 3 hojas. Sin embargo, no menciona qué cantidades de inóculo utilizó y cada cuánto tiempo lo aplicó.

Fernández (2015) logró aumentar en 34% el porcentaje de germinación de semillas de café que embebió en una suspensión de bacterias (*Azotobacter* y *Pseudomonas*) de  $10^8$  UFC/ml por 15 minutos a 24°C y sembró en placas Petri con papel toalla humedecido incubadas a 22°C por 40 días. Sin embargo, el 91% de las cepas evaluadas no presentaron efecto favorable en el porcentaje de germinación, respecto al control. Esto puede deberse a que las semillas de café no producen los exudados que sirven de nutriente para los microorganismos (Fernández, 2015).

Ogata y Zúñiga (2008) referencian a Prevost et. al. (1987) y Meissner y Gross, (1980) para inocular diferentes cepas por separado de rizobio puro y crecidas a una densidad de  $10^6$  –  $10^8$  cel/ml en semillas de *Phaseolus vulgaris* “frijol”, *Phaseolus lunatus* “pallar” *Medicago sativa* “alfalfa”, *Glycine max* “soja” y *Caesalpinia espinosa* “tara”, previamente desinfectadas y que finalmente aumentan sus porcentajes de germinación.

Las bacterias para que sean considerados PGPR, deben cumplir con las siguientes condiciones importantes: (1) poseer la capacidad de colonización de raíces. Siendo esta

condición la más relevante para la producción de inóculos (Lugtenberg et al., 2001). (2) deben ser compatibles y específicos a diversos cultivos y condiciones ambientales. Los microorganismos PGPR con más referencia son los géneros: *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Actinomicetos*. Barreto et al. (2010) clasificó los inóculos de PGPR en: Biofertilizantes (mejora la disponibilidad de nutrientes), Bioestimulantes (producción de hormonas vegetales) y Bioprotectores (supresión de enfermedades de plantas).

### **2.11 Vigor de semillas y plántulas**

Ferguson (1995), en su intento por conceptualizar el vigor de las semillas, expresó que este se basa en el comportamiento físico o fisiológico de un lote de semillas, e incluye:

1. Los cambios en los procesos bioquímicos
2. La tasa y uniformidad de la germinación y el crecimiento de las plántulas
3. La germinación o capacidad de emergencia de las semillas al ser expuestas a condiciones de estrés.

Con respecto a pruebas para conocer el vigor de las semillas, estas se desarrollan con la finalidad de ofrecer solo información complementaria a la obtenida por la prueba de germinación y que, a su vez, permiten estimar el potencial de la emergencia en el campo, en una amplia gama de condiciones ambientales (Barros et al., 2002; Costa y Carvalho, 2006).

### **3 HIPÓTESIS**

Existen condiciones que incrementan el porcentaje de germinación de las semillas y el vigor de plantines de *C. krauseana* y *C. calisaya*.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar las condiciones que incrementan el porcentaje de germinación de las semillas y el vigor de plantines de *C. krauseana* y *C. calisaya*.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Relacionar el color y visibilidad del embrión de las semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya* con sus porcentajes de viabilidad.
- Evaluar el efecto de la aplicación de nitrato de potasio y agua de coco (técnica de *seed priming*) en semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya* para maximizar sus porcentajes de germinación.
- Evaluar el efecto de 2, 6 y 11 semanas de almacenamiento de las semillas de *C. krauseana* a 25, 12.9, 8.7 y 4% de contenido de humedad sobre su porcentaje de germinación.
- Evaluar el efecto de la inoculación de PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) sobre el vigor de plantines de *C. krauseana* y *C. calisaya*.

## 5 MATERIALES

### 5.1 Material Biológico

Para el desarrollo del presente estudio se trabajó con:

- Semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya* almacenadas en el Banco de semillas del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.
- Suelo nativo colectado de plantas adultas y jóvenes de *C. pubescens* ubicadas en la Concesión para la Conservación del Bosque Pichita Puyu Sacha (Junín).
- Coco maduro para la preparación de soluciones inductoras de la germinación.

### 5.2 Material de Campo y de Laboratorio

- GPS
- Pala
- Bolsas ziploc
- Cooler
- Cuaderno de campo
- Costales
- Baldes
- Tetrazolium
- Agua destilada
- Alcohol de 70° y 96°
- Silica gel

- Hipoclorito de sodio
- Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )
- Cajas herméticas (Cámaras de humedad y secado)
- Guantes quirúrgicos
- Bisturí (mango y hojas)
- Estiletes
- Papel toalla
- Pro-pipeta
- Algodón
- Láminas porta objeto
- Placas Petri
- Matraces
- Baguetas
- Pipetas
- Almacigueras
- Macetas
- Arena fina estéril
- Estereoscopio con cámara incorporada
- Cámara fotográfica
- Termohigrómetro
- Estufa eléctrica
- Balanza analítica
- Cámara de siembra
- Cámara de crecimiento
- Autoclave

- Computadora
- Plumón marcador
- Lapiceros
- Cuaderno de apuntes
- Hoja milimetrada
- Regla milimetrada

## 6 MÉTODOS

### 6.1. Origen de las semillas de *C. calisaya* y *C. krauseana*

Para el desarrollo del presente estudio se trabajó con semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya* almacenadas a 4°C en el Banco de semillas del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM. Las primeras corresponden a semillas almacenadas de *C. krauseana* que Mejía (2014) colectó en el 2012 en Amazonas (6°10'18.5304" S 77°51'32.9653" W a 2600 msnm). Con contenido de humedad 7.07% en el 2016. Las segundas corresponden a semillas extraídas de cápsulas maduras e inmaduras colectadas en agosto del 2014 en la localidad de Quinquira en la selva de Puno (14°10'34.8636" S 69°17'11.3088" W a 1900 msnm) que fueron secadas dentro de cajas herméticas con silica gel para favorecer la apertura de la cápsula y así la extracción de sus semillas para finalmente ser almacenadas. Con contenido de humedad 9.6% en el 2016.

Las especies mencionadas fueron identificadas por la Dra. Joquina Albán especialista en la familia Rubiaceae de la UNMSM.

### 6.2. Relación del color y visibilidad del embrión en las semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya* con sus porcentajes de viabilidad.

Observando las semillas de *Cinchona calisaya* almacenadas en el Banco de Semillas se encontró que había diferencias en su coloración, por lo tanto, se clasificaron en semillas claras y semillas oscuras y se almacenaron nuevamente hasta su uso subsiguiente. Posteriormente, al evaluarlas en el estereoscopio se notó que había semillas con embrión visible y otras sin embrión visible (**Figura 11**), por lo que se hizo una nueva clasificación formando lotes (**Tabla 5**).

También se notó que las semillas de *Cinchona krauseana* podían ser clasificadas sólo por su coloración mas no por la visibilidad de su embrión en el estereoscopio (**Figura 12 y Tabla 5** (Lote 1 y 2)).

Después de clasificar las semillas en lotes se les aplicó la prueba de Tetrazolio o Tz para evaluar su viabilidad. Inicialmente, se sumergieron todos los lotes de *Cinchona* en agua destilada por 24 horas para iniciar la actividad de las enzimas deshidrogenasas; además así ablandar los tejidos y que sea más fácil el ingreso del colorante. Pasadas las 24 horas se sumergieron los lotes en el colorante, también por 24 horas y se colocaron en placas Petri las que se recubrieron con papel aluminio para mantenerlas en oscuridad. Para concluir con la evaluación, se extrajeron los embriones (**Figura 13**) y se calculó el porcentaje de viabilidad de cada lote según conteo de embriones viables (**Tabla 6**).

Considerando como viables las semillas con embriones teñidos de rojo y rosado con el Tetrazolio y no viables a los embriones parcialmente rosados y blancos (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Viabilidad de las semillas según la tinción de los embriones de *Cinchona*.

Tinción del embrión	Viable	Código de tinción
Rojo	SI	3
Rosado	SI	2
Parcialmente rosado	NO	1
Blanco	NO	0

### **6.3. Evaluación del efecto de la aplicación de nitrato de potasio y agua de coco (técnica de *seed priming*) en semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya* para maximizar el porcentaje de germinación.**

Para evaluar el efecto de la aplicación de nitrato de potasio y agua de coco en semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya* sobre el porcentaje de germinación se prepararon diferentes soluciones inductoras pre germinativas que se encuentran descritas en la **Tabla 3**.

#### **6.3.1 Preparación de las soluciones inductoras**

Para la preparación de las soluciones de agua de coco se utilizó un coco maduro el cual se perforó en el poro de germinación con la ayuda de un desarmador limpio y con el endospermo líquido se prepararon las tres dosis planteadas en la **Tabla 3**. Seguidamente, estas soluciones fueron esterilizadas en autoclave y después de enfriarse se llevaron a la cámara de siembra limpia.

#### **6.3.2 Preparación de las dosis de nitrato de potasio**

Con ayuda de una balanza analítica se pesó el  $\text{KNO}_3$  y se diluyó en agua destilada. Estas diluciones también fueron esterilizadas en autoclave y después de enfriarse se llevaron a la cámara de siembra limpia junto con las otras soluciones inductoras (**Figura 2**).

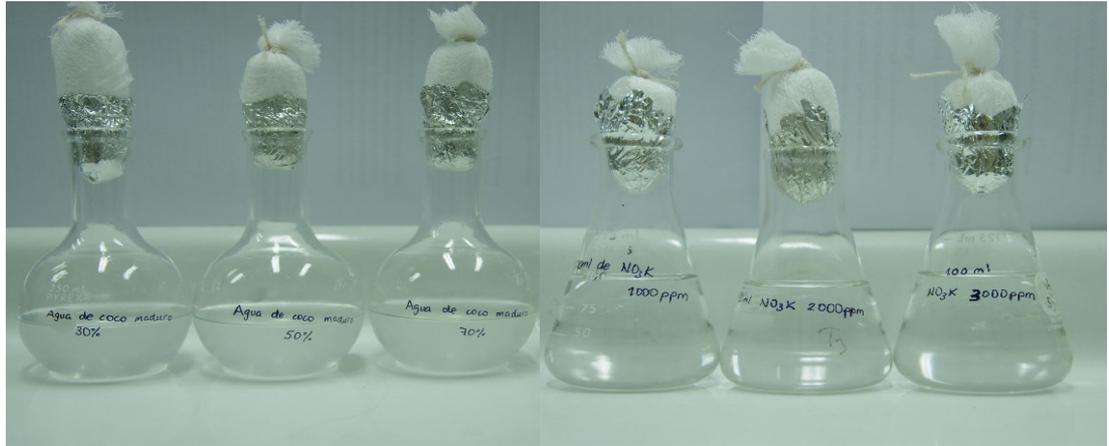
#### **6.3.3 Siembra y evaluación**

La siembra de las semillas en las soluciones inductoras se realizó con una previa preparación de materiales, los cuales fueron esterilizados en autoclave y colocados dentro de la cámara de siembra donde se desarrolló el trabajo. Se utilizaron 1050 semillas por especie. Cada especie tuvo 7 tratamientos con 5 réplicas de 30 semillas cada una (**Tabla 3 y Figura 3 y 4**).

La evaluación del número de semillas germinadas se contabilizó cada dos días con ayuda de un estereoscopio y con ello se armó una base de datos para los análisis estadísticos posteriores.

**Tabla 3.** Tratamientos inductores de la germinación para *C. krauseana* y *C. calisaya*.

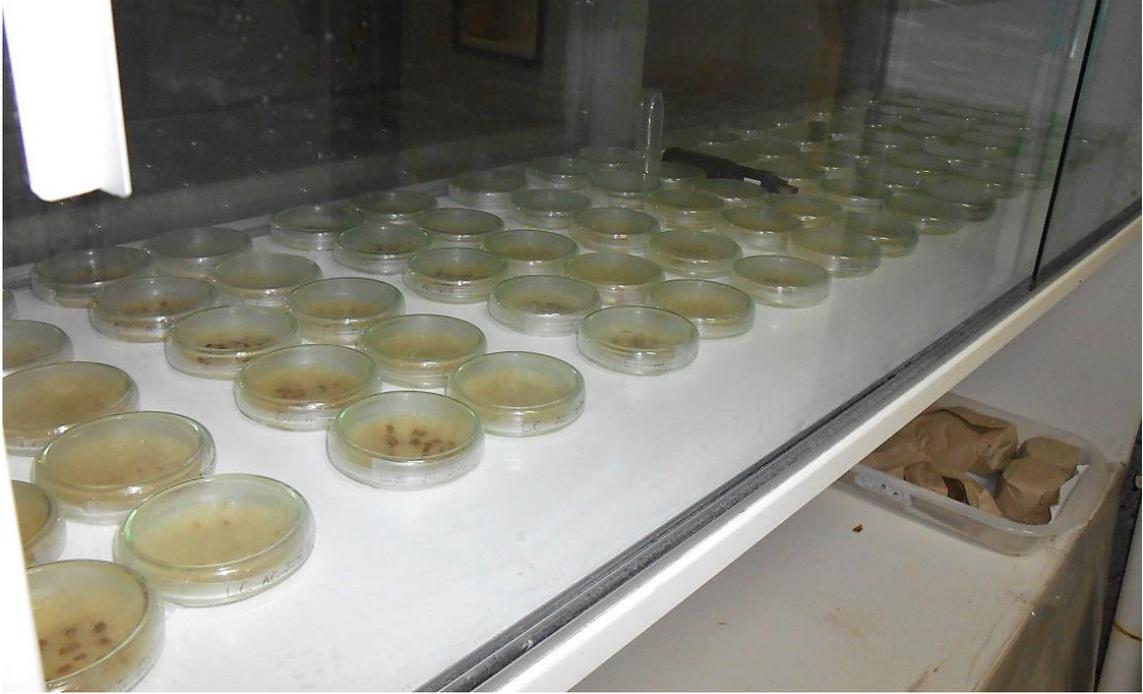
Tratamiento	Especie	Inductores	Dosis
1	<i>C. krauseana</i>	KNO <sub>3</sub>	1000 ppm
2	<i>C. krauseana</i>	KNO <sub>3</sub>	2000 ppm
3	<i>C. krauseana</i>	KNO <sub>3</sub>	3000 ppm
4	<i>C. krauseana</i>	Agua de coco	30%
5	<i>C. krauseana</i>	Agua de coco	50%
6	<i>C. krauseana</i>	Agua de coco	70%
7	<i>C. krauseana</i>	Agua destilada	CONTROL
8	<i>C. calisaya</i>	KNO <sub>3</sub>	1000 ppm
9	<i>C. calisaya</i>	KNO <sub>3</sub>	2000 ppm
10	<i>C. calisaya</i>	KNO <sub>3</sub>	3000 ppm
11	<i>C. calisaya</i>	Agua de coco	30%
12	<i>C. calisaya</i>	Agua de coco	50%
13	<i>C. calisaya</i>	Agua de coco	70%
14	<i>C. calisaya</i>	Agua destilada	Control



**Figura 2.** Matracos con soluciones inductoras de la germinación.



**Figura 3.** Siembra de semillas por cada tratamiento inductor dentro de la cámara de siembra.



**Figura 4.** Placas Petri con las semillas sembradas ubicadas en el área de cultivo.

#### **6.4. Evaluación del efecto de 2, 6 y 11 semanas de almacenamiento de las semillas de *C. krauseana* a 4, 8.7, 12.9 y 25% de contenido de humedad sobre su porcentaje de germinación.**

##### **6.4.1 Ensayos previos**

Para conocer los tiempos en que las semillas de *C. krauseana* aumentan y disminuyen cierto contenido de humedad se realizaron ensayos con ayuda de la cámara húmeda para la hidratación de las semillas (**Figura 5**), la cámara seca para la deshidratación de las semillas (**Figura 6**) y una balanza. Estos tiempos sirvieron de referencia para calcular aritméticamente el tiempo que tomaría llevar a las semillas al contenido de humedad deseado (4, 8.7, 12.9 y 25%).

##### **6.4.2 Método para que las semillas alcancen 4, 8.7, 12.9 y 25% de contenido de humedad**

Haciendo uso de la fórmula propuesta por Hong et al. (1996), se monitoreó el peso de las semillas al inicio y durante el aumento y disminución de su contenido de humedad con la finalidad de alcanzar el contenido de humedad deseado (DMC).

$$\textit{Weight of seed (g) at DMC\%} = \frac{(100 - MC\% \textit{ inicial})}{(100 - DCM\%)} * \textit{Winicial of seed (g)}$$

*DMC%* = Contenido de humedad deseado.

*Weight of seed (g) at DMC%* = El peso que deberían tener las semillas al contenido de humedad deseado.

*MC% inicial* = Contenido de humedad inicial.

#### **5.3.2.1 Reducción del contenido de humedad a 4%**

La preparación de la cámara seca se dio 24 horas antes, para esto se colocó dentro silica gel con la finalidad de reducir al máximo la humedad de su ambiente, seguidamente se introdujo una placa Petri con las semillas de *C. krauseana* para disminuirles su contenido de humedad.

#### **5.3.2.2 Aumento del contenido de humedad a 8.7, 12.9 y 25%**

La preparación de la cámara húmeda se dio 24 horas antes, para esto se colocó dentro dos pliegues de papel toalla húmedo con la finalidad de aumentar al máximo la humedad de su ambiente, seguidamente se introdujo una placa Petri con las semillas de *C. krauseana* para aumentarles su contenido de humedad.

#### **6.4.3 Estabilización del contenido de humedad alcanzado por las semillas**

Después de que las semillas alcanzaran los diferentes contenidos de humedad se guardaron en bolsas trilaminadas por separado, se sellaron y se dejaron en el desecador por 3 días para estabilizarles el contenido de humedad (Hong et al., 1996).

#### **6.4.4 Cálculo del contenido de humedad real**

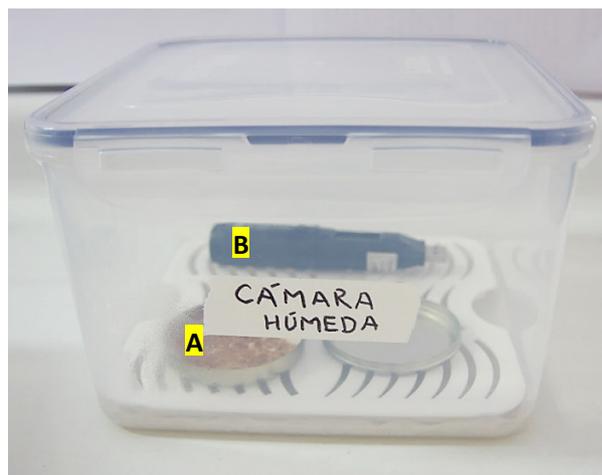
Pasados los tres días, se seleccionaron 3 réplicas de 100 de semillas por cada contenido de humedad y usando la estufa se verificaron los contenidos de humedad.

Finalmente, se separaron en lotes tomando en cuenta que se calcularían sus porcentajes de germinación después de 2, 6 y 11 semanas de almacenadas (**Tabla 8**).

$$\text{Contenido de humedad de las semillas}(\%) = \frac{W_{fresco} - W_{seco}}{W_{fresco}} * 100$$

#### 6.4.5 Cálculo del porcentaje de germinación

Se contabilizó, con ayuda del estereoscopio, el número de semillas germinadas por lote y con ello se armó una base de datos para los posteriores análisis estadísticos.



**Figura 5.** Cámara húmeda.

Táper hermético con rejilla. **A.** Placa con semillas. **B.** Hermohigrómetro.



**Figura 6.** Cámara seca.

Táper hermético con rejilla y silica gel. **A.** Placa con semillas. **B.** Silica gel.

## **6.5. Evaluación del efecto de la inoculación con PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) sobre el vigor de las plantinesde *C. krauseana* y *C. calisaya*.**

La preparación de los inóculos de PGPR se realizaron por aislamiento de algunas bacterias del suelo de plantas adultas y jóvenes de *C. pubescens* ubicadas en la concesión para la Conservación del Bosque Pichita Puyu Sacha (Junín). Para lo cual se desarrollaron los siguientes pasos:

### **6.5.1 Colecta del suelo**

En condiciones de esterilidad, usando guantes y bolsas ziploc, se muestreó suelo rizosférico que contenía raicillas de plantas adultas y jóvenes de *C. pubescens* ubicadas en La Concesión de Junín (**Figura 7 y 8**) y se transportaron en cadena de frío hacia el Laboratorio de Microbiología de Suelos, Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria La Molina. Así mismo, se realizó un análisis fisicoquímico del suelo para conocer las condiciones en las que se desarrollan las bacterias en el suelo nativo.

### **6.5.2 Aislamiento y ensayos para la selección de rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta**

Como parte de un proyecto colaborativo de investigación con el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Facultad de Agronomía – UNALM (2015-2016), las cepas fueron brindadas por esta unidad de investigación. El procedimiento consistió en aislar cepas de bacterias y actinomicetos del suelo rizosférico a fin de obtener una primera generación para su purificación. Estas cepas crecieron en medio sólido agar peptona (fluconazol 0.25 %), pH 5.5 a 27°C por 48 horas. Se realizó el recuento estándar en placa de la población de bacterias totales expresados en UFC/g según ICMSF (*The International Commission on Microbiological Specifications for Foods*). De la población total se aislaron 23 cepas codificadas desde I1 a I23, las que se cultivaron en 50 ml de medio caldo peptona

de pH 5.5 e incubaron a 27°C, cada una, la agitación del medio con las cepas fue manual y se dio dos veces al día durante dos días.

Con la finalidad de seleccionar las mejores cepas para conocer su efecto como PGPR sobre las plántulas de *C. calisaya* y *C krauseana* se realizaron ensayos previos para evaluar el efecto de la inoculación sobre la germinación y crecimiento de la raíz de semillas de llantén. Se eligieron 18 cepas y se probaron como inóculos  $10^7$  UFC/ml en medio sólido MS sucrosa (10 semillas/placa inclinada) aplicándose 0.1 ml sobre cada semilla. Las cepas seleccionadas fueron 4: I21 e I22 con 100% de germinación y I5 e I17 las cuales incrementaron la longitud de raíz de llantén (Aguero et al., 2016).

### **6.5.3 Preparación de las bandejas y trasplante de las plántulas de *Cinchona***

Se prepararon dos bandejas con sustrato arena estéril, la esterilización consistió en lavar la arena fina con abundante agua corriente y luego esterilizarla en autoclave. Luego de enfriada la arena a temperatura ambiente se colocó en cada bandeja, una bandeja para cada especie. Cada hoyo de la bandeja contenía una plántula de *Cinchona* con edad de 2 semanas después de su germinación. Finalmente, se cubrió cada bandeja con bolsa adherente, simulando un mini invernadero, para evitar la evaporación rápida del agua (**Figura 9**).

Cada hoyo de las bandejas se regó una vez por semana con 4ml de solución hidropónica San Marcos al 50%, la que le proporcionaba un pH 6.5 al sustrato. Así mismo, se regó con inóculo de PGPR una vez dentro de la misma semana.

Para generar una condición de temperatura estable a las plántulas, estas se colocaron dentro de la cámara de crecimiento del laboratorio que tenía temperatura de día 18°C y de noche 12°C.

#### 5.4.4 Aplicación del inóculo de PGPR

Las cuatro cepas otorgadas por el Laboratorio de Suelos se mezclaron para formar un sólo inóculo de PGPR (**Tabla 4**). Dicha mezcla se aplicó una vez por semana usando 1.5 ml por plántula. El inóculo de PGPR se conservó en la cámara de siembra que tenía como temperatura promedio 23°C y se agitó 2 veces al día por 2 semanas (cantidad que duró para 2 aplicaciones), los inóculos fueron proporcionados en 3 oportunidades y con ello se completó el experimento de 6 semanas. La aplicación de los inóculos se dio en plántulas con edad de 2 semanas después de la germinación.

**Tabla 4.** Concentración bacteriana por inóculo de PGPR (UFC/ml).

Cepas	UFC/ml inóculo
I5	$2.8 \times 10^9$
I17	$1.05 \times 10^9$
I21	$2.15 \times 10^9$
I22	$1.70 \times 10^9$

#### 6.5.5 Evaluación de las variables

Las evaluaciones se realizaron 4 veces durante 6 semanas y se evaluaron las variables: “Número de hojas”, “Largo de ambas hojas” y “Número de plantines vivos”. Para la variable “Número de hojas” se contabilizó el número total de hojas por plántula. Para la variable “Largo de ambas hojas” se midió con regla milimetrada de extremo a extremo el primer par de hojas de los plantines (**Figura 10**). Finalmente, el “Número de plantines vivos” correspondió a la sobrevivencia de los plantines en cada fecha de evaluación.



**Figura 7.** Árbol joven de *Cinchona pubescens* en la concesión para la Conservación del Bosque Pichita Puyu Sacha (Junín).



**Figura 8.** Colecta de muestras de suelo para producción del inóculo de PGPR.  
Los círculos rojos representan los puntos de colecta en un árbol de *Cinchona pubescens*.



**Figura 9.** Plantines de *Cinchona* en crecimiento dentro del “mini invernadero” preparado con bolsas adherentes.



**Figura 10.** Medición de las variables de una plántula de *Cinchona* con regla milimetrada.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Relación del color y visibilidad del embrión en las semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya* con sus porcentajes de viabilidad.

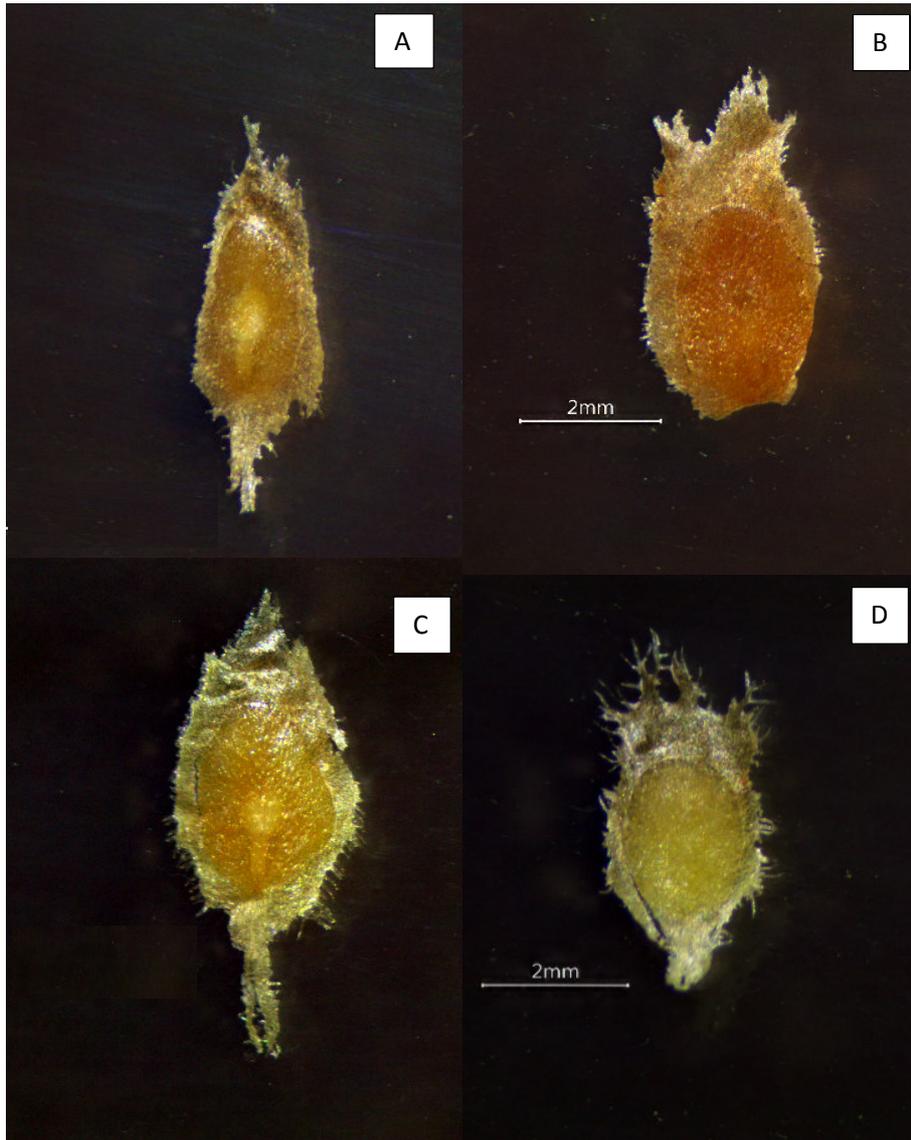
La clasificación realizada usando las variables color de las semillas y visibilidad de su embrión se muestra en la **figura 11** y **12**. Sin embargo, después de realizar la prueba Tz se evidenció que la clasificación realizada inicialmente (**Tabla 5**) no es válida debido a que las semillas de *C. calisaya* clasificadas como semillas sin embrión visible en el estereoscopio, sí tenían embrión. Por lo tanto, se descartó la clasificación de visibilidad del embrión en el estereoscopio y se mezclaron los lotes de *C. calisaya* teniendo finalmente sólo los lotes *C. calisaya* oscura y *C. calisaya* clara.

Para el caso de *C. krauseana* donde todos los embriones eran visibles al estereoscopio sólo se realizó la comparación entre los porcentajes de viabilidad de los lotes *C. krauseana* oscuras y *C. krauseana* claras.

Los embriones de *C. krauseana* y *C. calisaya* teñidos con tetrazolio se muestran en la **Figura 14** y **Figura 15**.

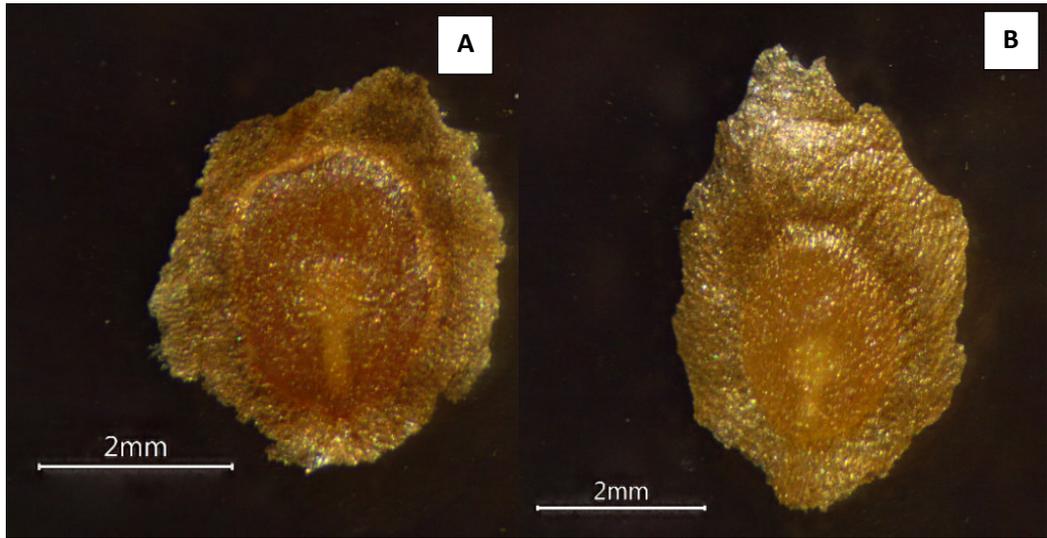
**Tabla 5.** Clasificación inicial que se dio a las semillas según su especie, color y visibilidad del embrión en el estereoscopio.

Lote	Especie	Procedencia	Color de semilla	Visibilidad del embrión
1	<i>C. krauseana</i>	Distrito Huancas Amazonas	Oscura	Si
2	<i>C. krauseana</i>		Clara	Si
3	<i>C. calisaya</i>	Centro poblado Quinquira (Puno)	Oscura	Si
4	<i>C. calisaya</i>		Oscura	No
5	<i>C. calisaya</i>		Clara	Si
6	<i>C. calisaya</i>		Clara	No



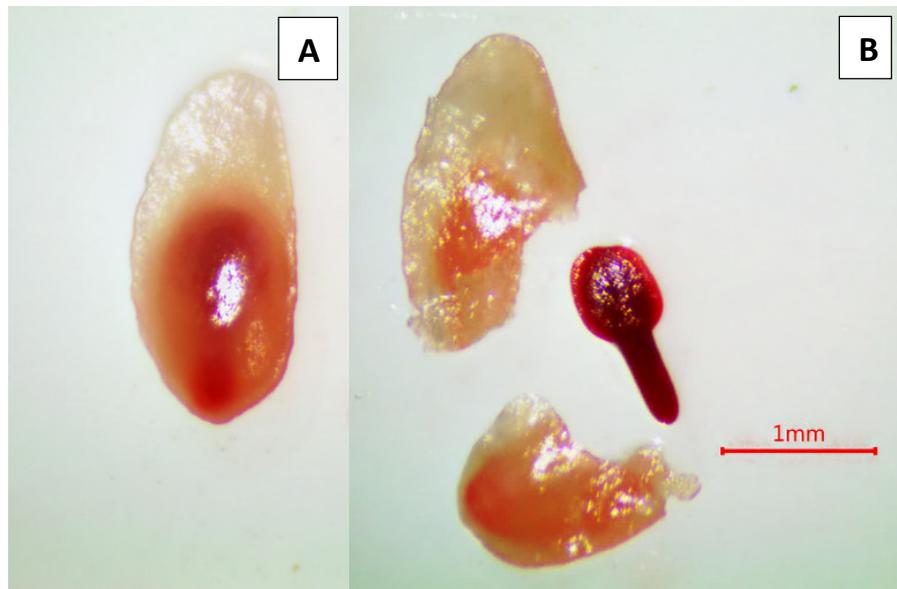
**Figura 11.** Diferencias entre los lotes de *Cinchona calisaya*.

**A. Lote 3**, Semilla oscura con embrión visible, **B. Lote 4**, Semilla oscura sin embrión visible. **C. Lote 5**, Semilla clara con embrión visible. **D. Lote 6**, Semilla clara sin embrión visible.



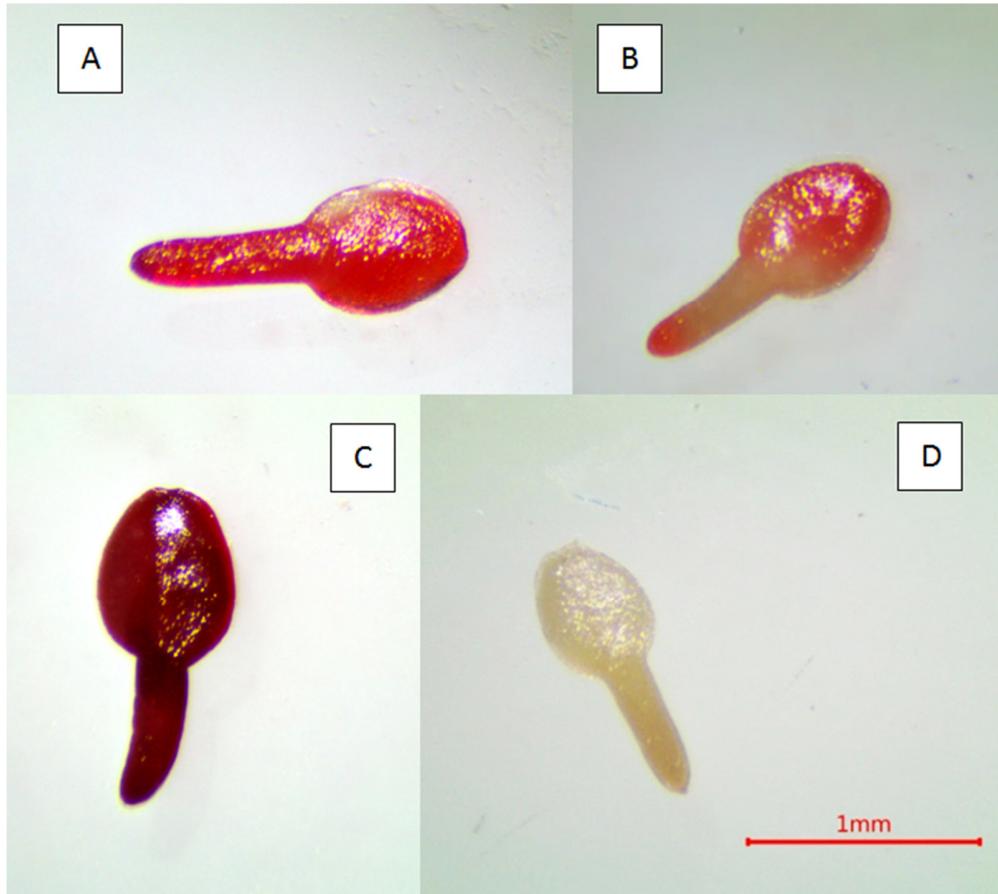
**Figura 12.** Diferencias entre lotes de *Cinchona krauseana*.

**A. Lote 1,** Semilla oscura con embrión visible. **B. Lote 2,** Semilla del clara con embrión visible.



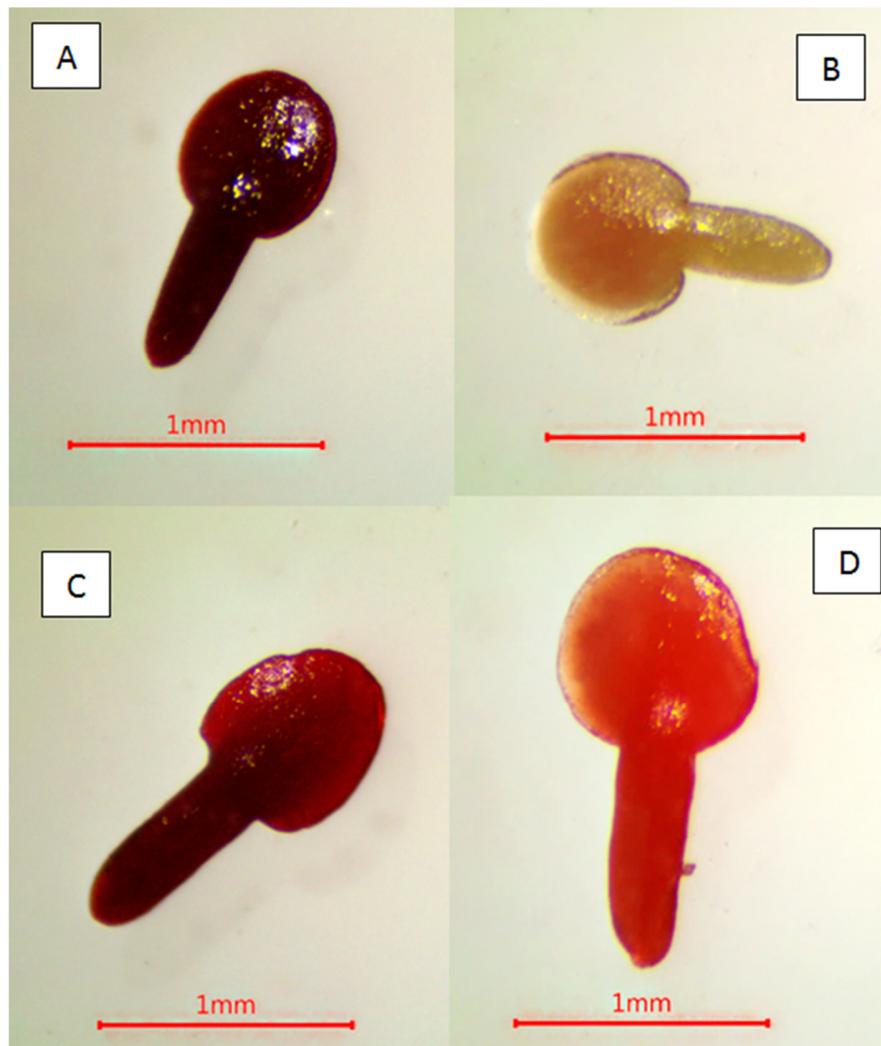
**Figura 13.** Extracción de los embriones en semillas de *C. calisaya*.

**A.** Semilla con el embrión dentro del endospermo. **B.** Embrión extraído del endospermo.



**Figura 14.** Embriones de *Cinchona calisaya*.

**A.** Embrión rosado, **B.** Embrión parcialmente rosado, **C.** Embrión rojo intenso, **D.** Embrión blanco. **Vista a 30X.**



**Figura 15.** Embriones de *Cinchona krauseana*.

**A.** Embrión rojo intenso, **B.** Embrión blanco, **C.** Embrión rojo, **D.** Embrión rosado. **Vista a 30X.**

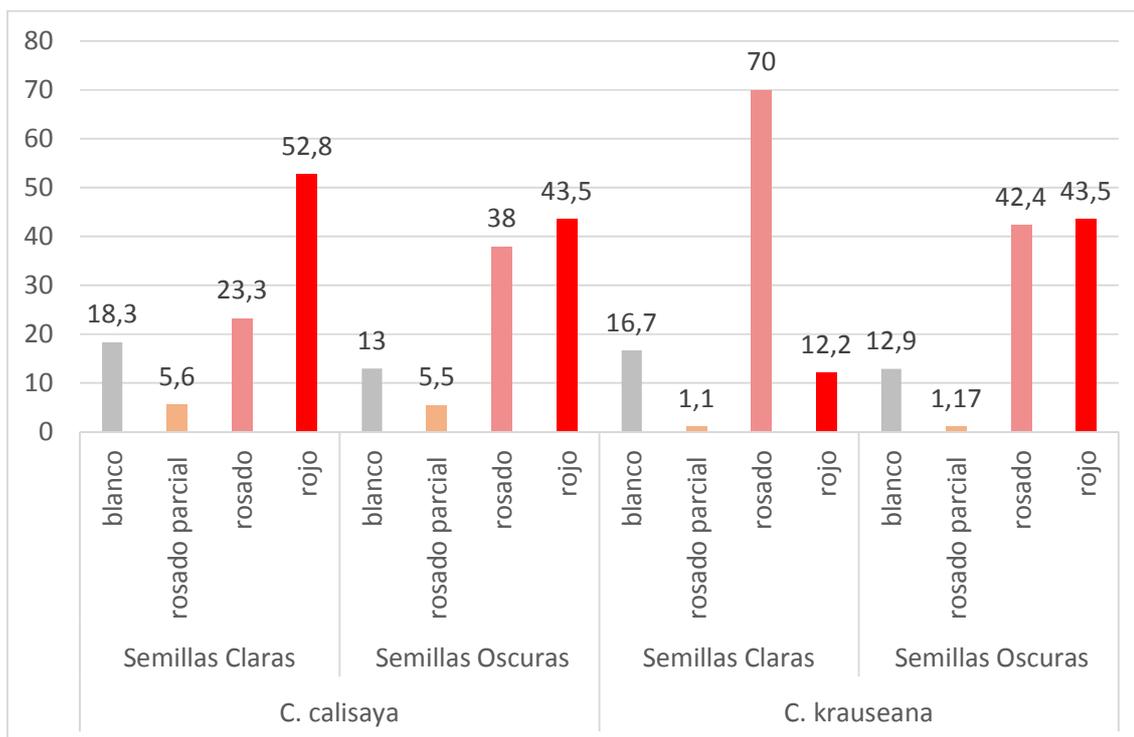
**Tabla 6.** Porcentaje de viabilidad de las semillas de *Cinchona* considerando su coloración.

Especie	Presencia de embrión	Código de tinción	n° de embriones por código de tinción en Semillas Claras	n° de embriones por código de tinción en Semillas Oscuras	% de Viabilidad de Semillas Claras	% de Viabilidad de Semillas Oscuras
<i>C. calisaya</i>	Si	0	26	26	-	-
		1	8	11	-	-
		2	33	76	23.3	38
		3	75	87	52.8	43.5
<i>C. krauseana</i>	Si	0	11	15	-	-
		1	1	1	-	-
		2	36	63	42.4	70
		3	37	11	43.5	12.2

\* Para comprender el código de tinción véase nuevamente la **Tabla 2**.

\* Para *C. calisaya* se evaluó más de 100 semillas por clasificación y para *C. krauseana* se evaluó aproximadamente 90 semillas por clasificación debido a la falta de material.

Se consideró como semillas viables las teñidas de rojo y rosado intenso (Ruiz, 2009). Sin embargo, tomando en cuenta que los bajos vigores de las semillas determinan el nivel de actividad y capacidad de las semillas durante la germinación y posterior emergencia de las plántulas (ISTA, 1995) y conociendo que *Cinchona* posee un bajo vigor en sus plántulas y alta mortandad (Suni et al., 2016), se decidió considerar a las semillas con embriones teñidos de rojo como semillas viables con vigor alto y a las semillas con embriones teñidos de rosado como semillas viables con vigor bajo (**Figura 16**) de tal manera que las semillas de *C. krauseana* poseen 43.5% de vigor alto en sus semillas claras y 12.2% de vigor alto en sus semillas oscuras. Así también, las semillas de *Cinchona calisaya* poseen 52.8% de vigor alto en sus semillas claras y 43.5% de vigor alto en sus semillas oscuras (**Tabla 6**).



**Figura 16.** Vigor de las semillas de *Cinchona* según intensidad de tinción con Tz.

## 7.2 Efecto de la aplicación de nitrato de potasio y agua de coco (técnica de *seed priming*) en semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya* para maximizar el porcentaje de germinación.

El tiempo de evaluación del porcentaje de germinación de las semillas duró aproximadamente 20 días, en los que se registró una temperatura máxima promedio de 30°C y mínima de 23°C, encontrándose mayor número y velocidad de germinación en semillas tratadas con KNO<sub>3</sub> (**Figura 19** y **Figura 20**) y menor número, menor velocidad y hasta bloqueo de la germinación en semillas tratadas con agua de coco (**Figura 17** y **Figura 18**)

Las soluciones inductoras de agua de coco llegaron a ser perjudiciales para la mayoría de semillas tanto de *C. calisaya* donde redujo su porcentaje de germinación hasta 50.7%

menos que el Control y en *C. krauseana* donde redujeron el porcentaje de germinación a 0. Caso contrario ocurrió con las semillas tratadas con  $\text{KNO}_3$  de esta misma especie, donde se logró elevar la germinación hasta 32% más que las semillas del tratamiento agua destilada (**Tabla 7**).

En la **Figura 21** se observa que en *C. calisaya* el porcentaje más alto de germinación fue 84.1 y se dio en el tratamiento con  $\text{KNO}_3$  a 2000ppm. También, que los tratamientos con 50 y 70% de agua de coco reducen la germinación de sus semillas comparadas con el tratamiento testigo. En *C. krauseana* se observa que el porcentaje más alto de germinación fue 84 y se dio en el tratamiento  $\text{KNO}_3$  a 1000ppm. También, que el inductor agua de coco a un porcentaje mayor o igual a 30% tiene un efecto altamente negativo en la germinación de sus semillas, reduciéndola a 0%.

Finalmente, en los análisis estadísticos, para *Cinchona calisaya* no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos del inductor  $\text{KNO}_3$  y el tratamiento Agua destilada a un p-valor (0.05). Así mismo, no hay diferencias significativas entre los tratamientos con agua de coco al 30% y  $\text{KNO}_3$  a 3000ppm a un p-valor (0.05) (**Anexo 1**).

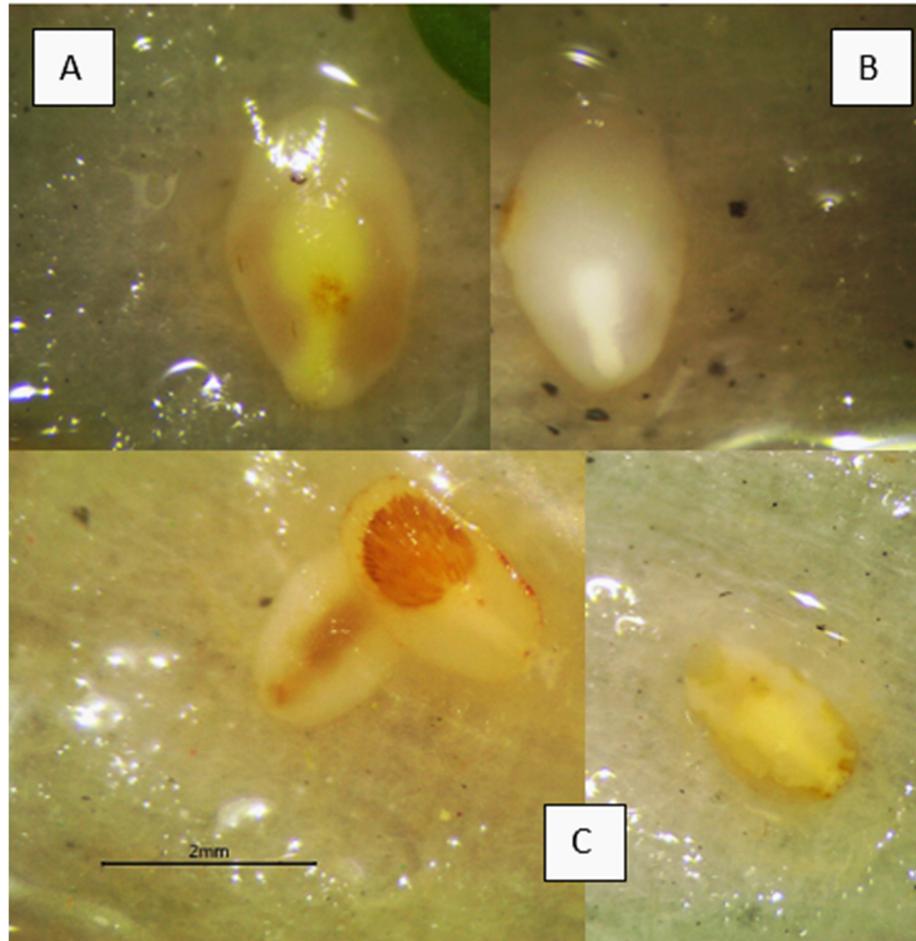
Para *Cinchona krasueana*, no hay diferencias significativas entre los tratamientos 30, 50 y 70% de agua de coco a un p-valor (0.05). Sin embargo, existen diferencias significativas entre el tratamiento  $\text{KNO}_3$  a 1000 ppm y el tratamiento Agua destilada a un p-valor (0.05) (**Anexo 2**).

**Tabla 7.** Porcentajes de germinación de *Cinchona* con los tratamientos inductores.

Tratamientos inductores	Porcentajes de germinación por especies (%)	
	<i>C. calisaya</i>	<i>C. krauseana</i>
Agua de coco al 30%	75.5 BC	5.2 A
Agua de coco al 50%	56.6 AB	6.8 A
Agua de coco al 70%	29.5 A	0.0 A
Agua destilada	80.2 D	52.1 B
KNO3 1000ppm	79.2 D	84.0 C
KNO3 2000ppm	84.1 D	79.1 BC
KNO3 3000ppm	78.6 CD	72.2 BC

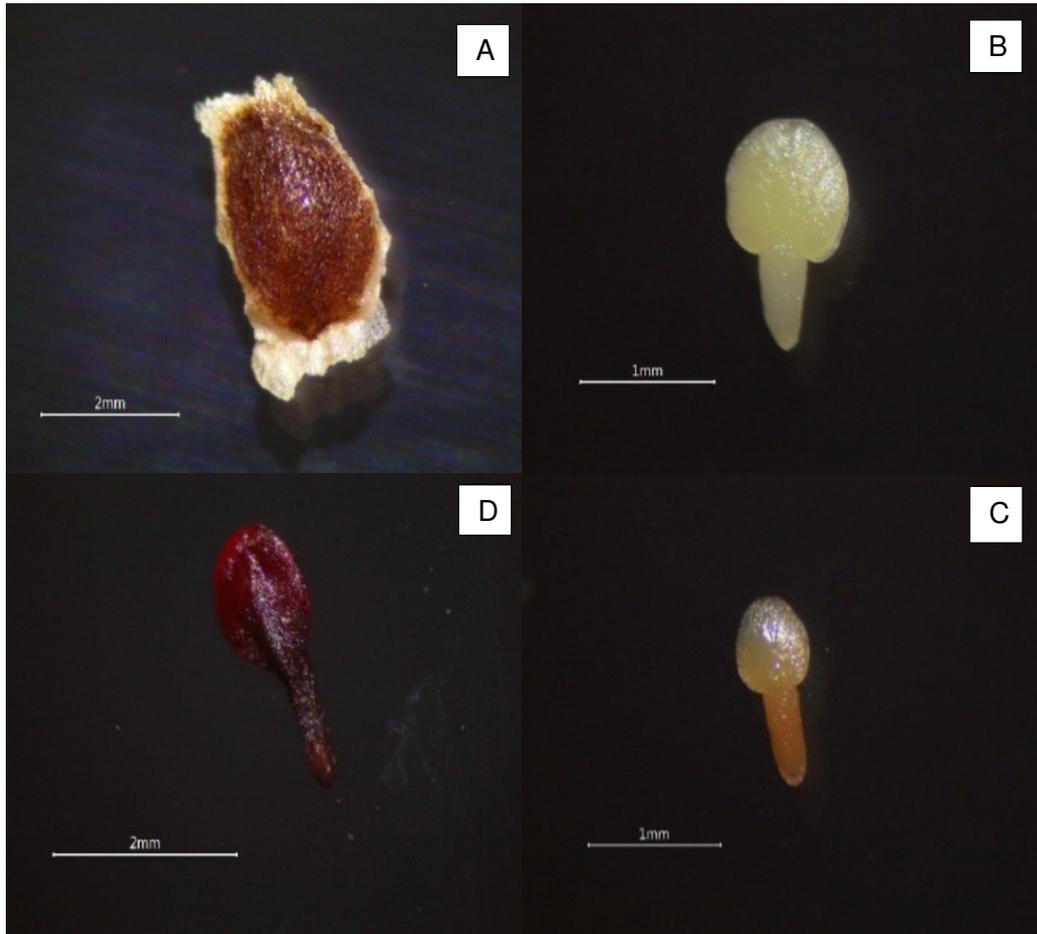
\*Cada tratamiento tenía 5 réplicas de 30 semillas cada una.

\*Las letras indican la separación de promedios por Tuckey a un nivel de 5%.



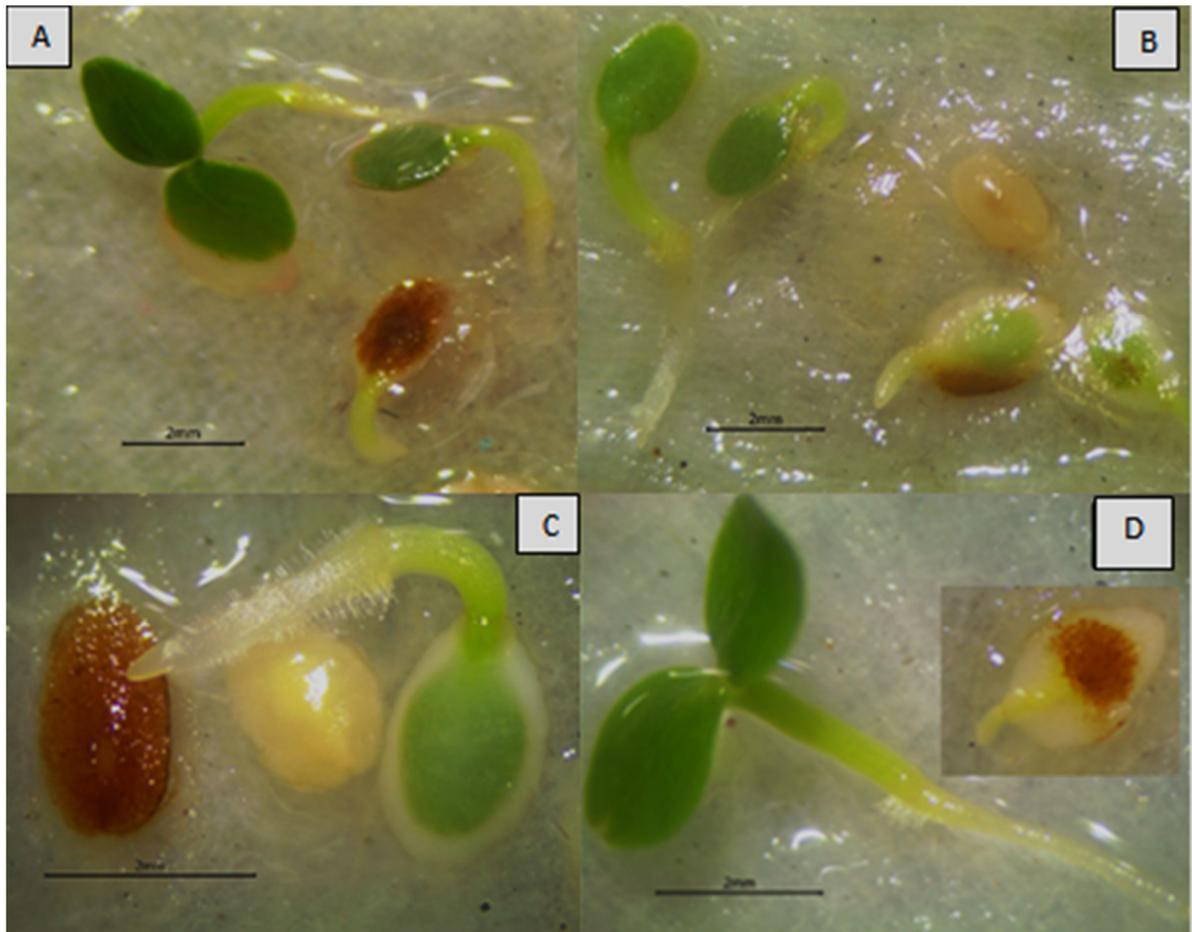
**Figura 17.** Semillas de *Cinchona calisaya* tratadas con inductor agua de coco.

- A.** Semilla dañada con agua de coco al 30% (nótese el endospermo necrosado). **B.** Semilla dañada con agua de coco al 50% (nótese el borde del endospermo necrosado). **C.** Semilla dañada con agua de coco al 70% (nótese el embrión y el endospermo necrosado). **Vistas a 20X.**



**Figura 18.** Semilla y embriones de *Cinchona krauseana* tratadas con agua de coco y evaluadas con prueba Tz.

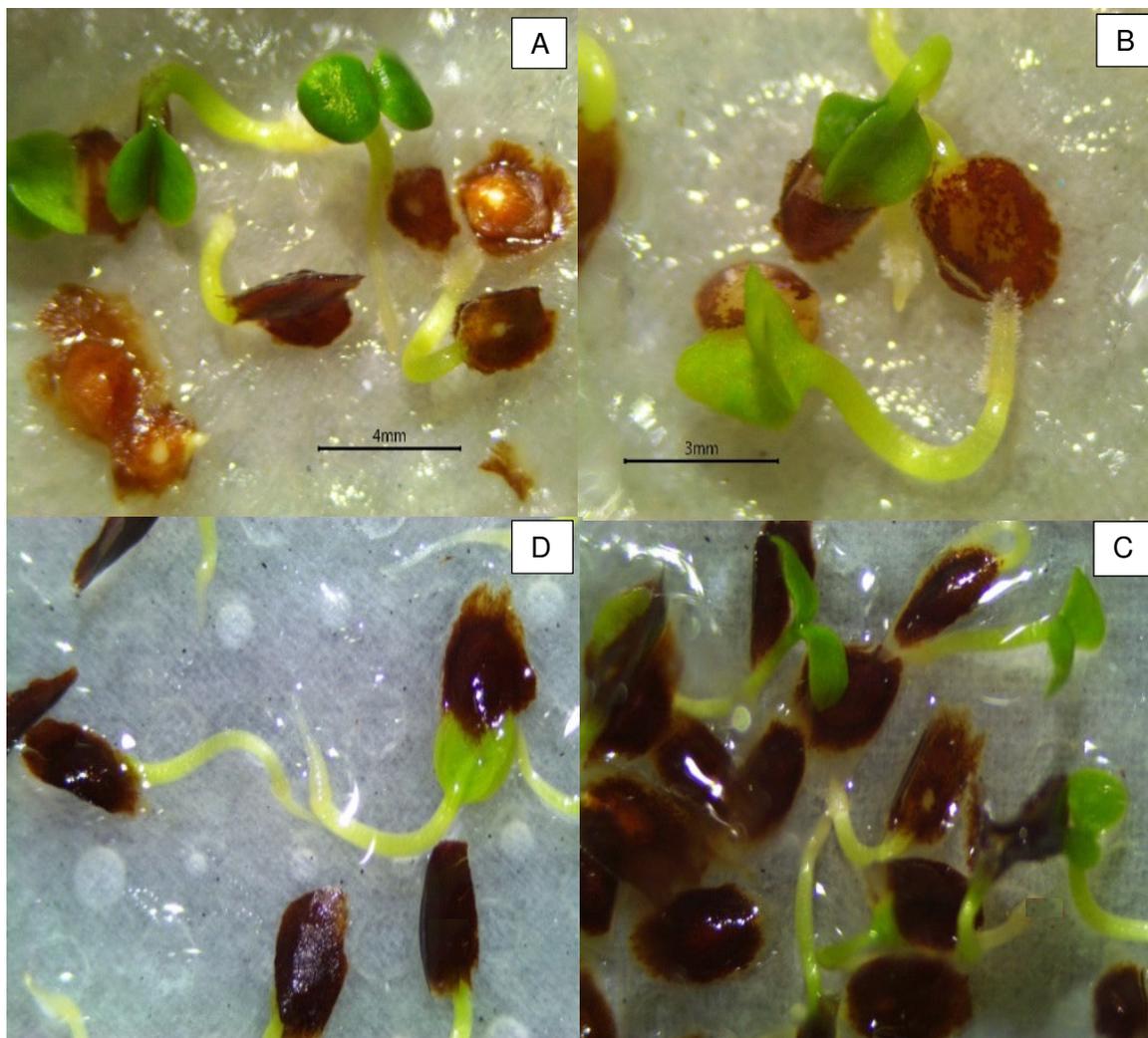
**A.** Semilla que no logró germinar embebida en 30% de agua de coco en estadio fenológico 01 (Obsérvese la turgencia de la semilla). **Vista a 15 X.** **B.** y **C.** Embriones no viables. **Vista a 30X** y en otros **D.** Embriones viables, que no lograron germinar. **Vista a 20X.**



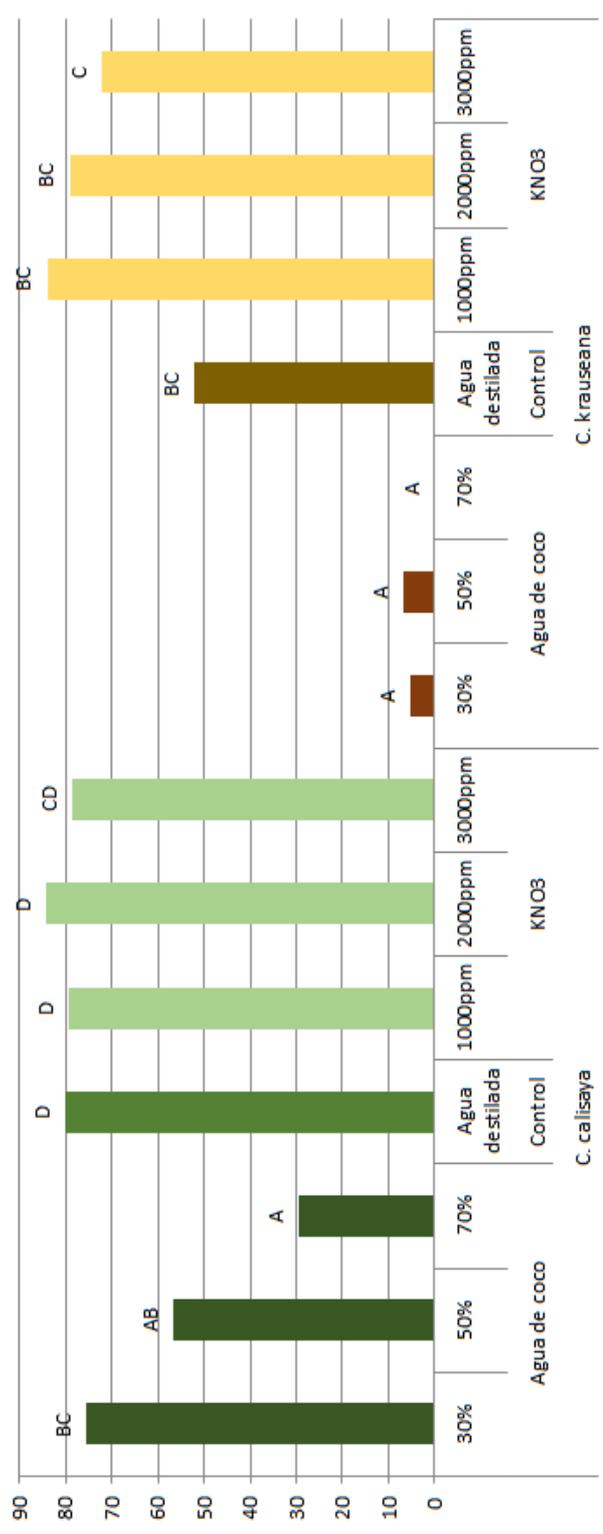
**Figura 19.** Semillas y plántulas de *C. calisaya* después de 11 días de ser llevadas a germinar.

- A.** Semillas tratadas con  $\text{KNO}_3$  a 1000 ppm. **B.** Semillas tratadas con  $\text{KNO}_3$  a 2000 ppm. **Vistas a 10X.** **C.** Semillas tratadas con  $\text{KNO}_3$  a 3000 ppm, **Vista a 20X.** **D.** Semilla y plántula con tratamiento Agua destilada. **Vista a 10X.**

**Figura 20.** Semillas y plántulas de *C. krauseana* después de 20 días de ser llevadas a germinar.



**A.** Semillas tratadas con  $\text{KNO}_3$  a 1000 ppm, **Vista a 7X.** **B.** Semillas tratadas con  $\text{KNO}_3$  a 2000 ppm, **Vistas a 10X.** **C.** Semillas en tratamiento Agua destilada, **D.** Plántulas tratadas con  $\text{KNO}_3$  a 3000 ppm. **Vista a 7X.**



**Figura 21.** Gráfico de barras con el porcentaje de germinación de *Cinchona* por cada tratamiento.

### **7.3 Efecto de 2, 6 y 11 semanas de almacenamiento de las semillas de *C. krauseana* 6a 4, 8.7, 12.9 y 25% de contenido de humedad sobre el porcentaje de germinación.**

Después de contar el número de semillas germinadas en los diferentes lotes con la finalidad de calcular sus porcentajes de germinación, se encontró que, las semillas almacenadas por 2 semanas a 4°C lograron los porcentajes de germinación más altos en todos los contenidos de humedad (4, 8.7, 12.9 y 25%), mayor que las semillas almacenadas por 6 ó más semanas, teniendo en cuenta que a 25% de contenido de humedad no germinaron sino que se contaminaron y también que a las 11 semanas de almacenamiento, en donde sólo germinaron semillas con 8.7% y 12.9% de contenido de humedad. (**Tabla 9**).

Finalmente, se notó que la mayoría de las semillas almacenadas al 4% de contenido de humedad no prosperaron en plántulas en ninguno de los tiempos de almacenamiento ya que la gran mayoría de las semillas quedaron estancadas en la emergencia de la raíz y en otras, el hipocótilo que sale a través del tegumento más los cotiledones no lograron liberarse y por lo tanto no se desarrollan en plántulas (**Figura 22**). También resultó que las semillas almacenadas a 8.7% de contenido de humedad terminaron de desarrollarse en plántulas vigorosas después de 2 y 6 semanas de almacenamiento, sin embargo, después de las 11 semanas muchas de las semillas no completaron su germinación y las plántulas que se desarrollaron tuvieron bajo vigor. (**Figura 23**). Y que la mayoría de las semillas con contenido de humedad de 12.9 y 25% después de 6 semanas de almacenamiento se desarrollaron en plántulas de vigor bajo, algunos con bordes irregulares o simplemente las semillas no se desarrollan y necrosan después de germinar (**Figura 24 y 25**).

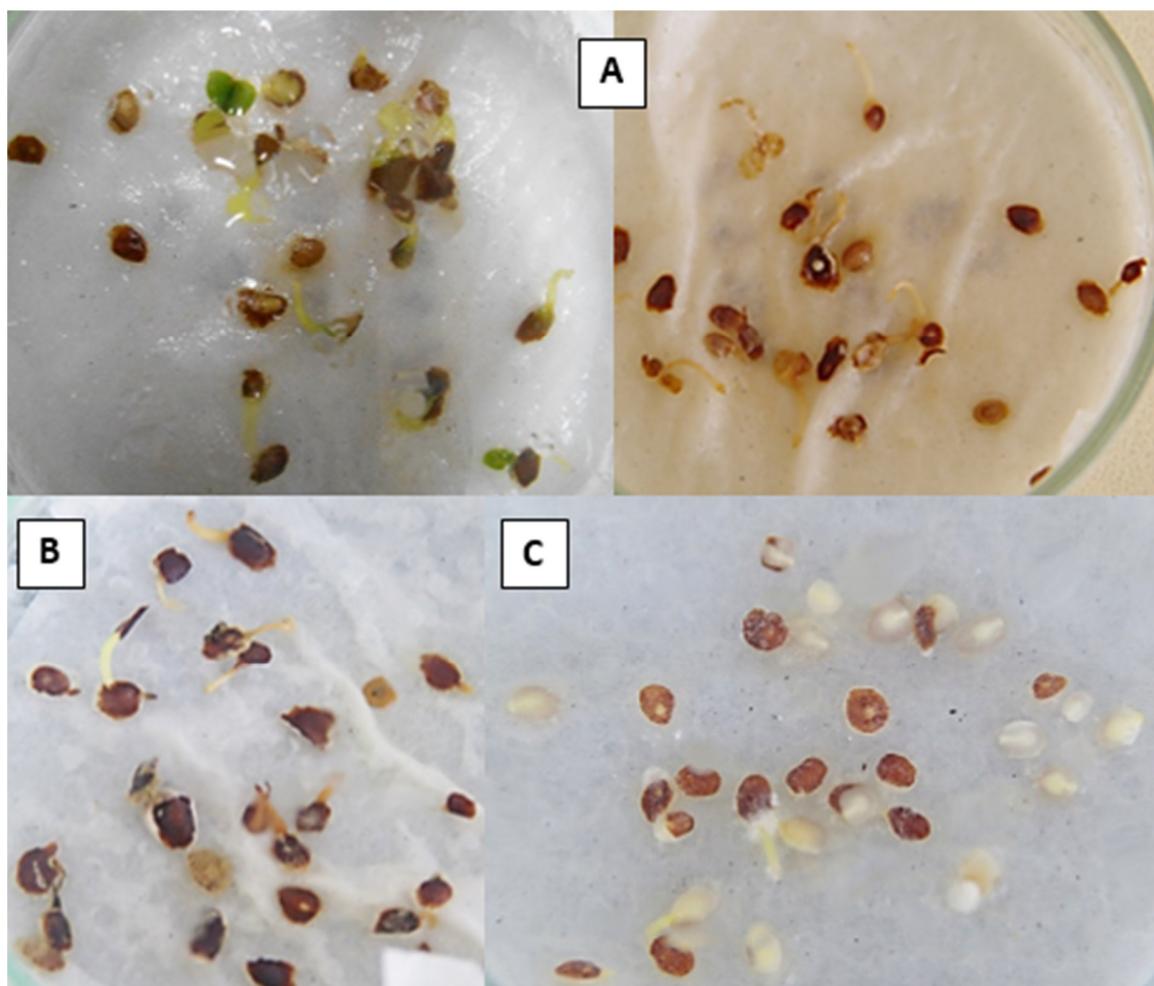
**Tabla 8.** Semillas de *C. krauseana* clasificadas en Lotes según su contenido de humedad y tiempo de almacenamiento.

Lote/Tratamiento	Especie	Contenido de humedad de las semillas (%)	Tiempo de almacenamiento (semanas)
1	<i>C. krauseana</i>	4	2
2	<i>C. krauseana</i>	4	6
3	<i>C. krauseana</i>	4	11
4	<i>C. krauseana</i>	8.7	2
5	<i>C. krauseana</i>	8.7	6
6	<i>C. krauseana</i>	8.7	11
7	<i>C. krauseana</i>	12.9	2
8	<i>C. krauseana</i>	12.9	6
9	<i>C. krauseana</i>	12.9	11
10	<i>C. krauseana</i>	25	2
11	<i>C. krauseana</i>	25	6
12	<i>C. krauseana</i>	25	11

\*Cada Lote tiene 5 réplicas de 30 semillas cada una.

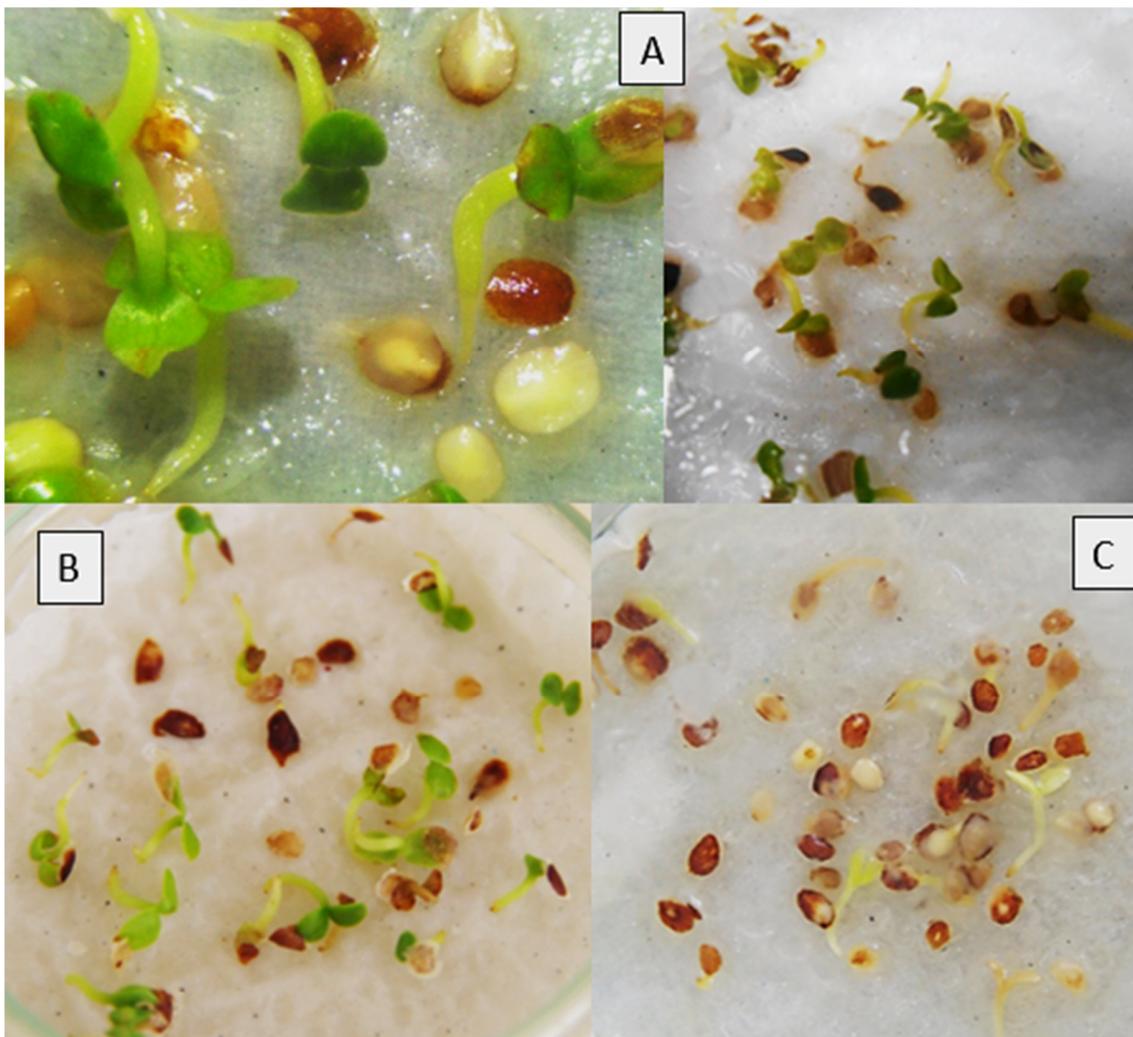
**Tabla 9.** Porcentaje de germinación de las semillas de *C. krauseana* almacenadas a los contenidos de humedad y los tiempos de almacenamiento establecidos.

<b>Contenido de humedad de las semillas (%)</b>	<b>Tiempo de almacenamiento (Semanas)</b>	<b>Promedio de porcentaje de germinación (%)</b>
4	2	88
	6	60
	11	0
8.7	2	84
	6	73
	11	27
12.9	2	90
	6	66
	11	37
25	2	81
	6	0
	11	0



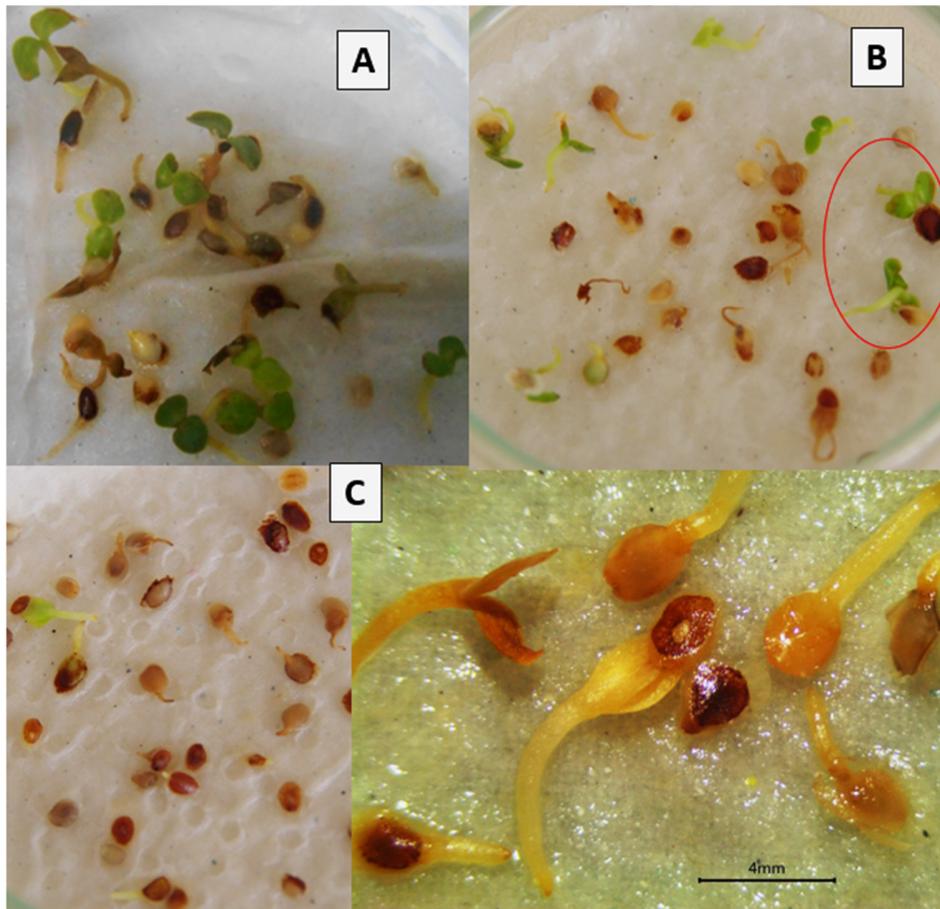
**Figura 22.** Germinación de las semillas de *C. krauseana* almacenadas con 4 % de contenido de humedad.

**A.** Germinación de semillas almacenadas por 2 semanas y evaluadas después de 21 días de ser sembradas (izquierda) y germinación de semillas después de 48 días de ser sembradas (derecha). **B.** Germinación de semillas almacenadas por 6 semanas con 4 % de contenido de humedad después de 56 días de ser sembradas. **C.** Semillas almacenadas por 11 semanas con 4 % de contenido de humedad después de 17 días de ser sembradas.



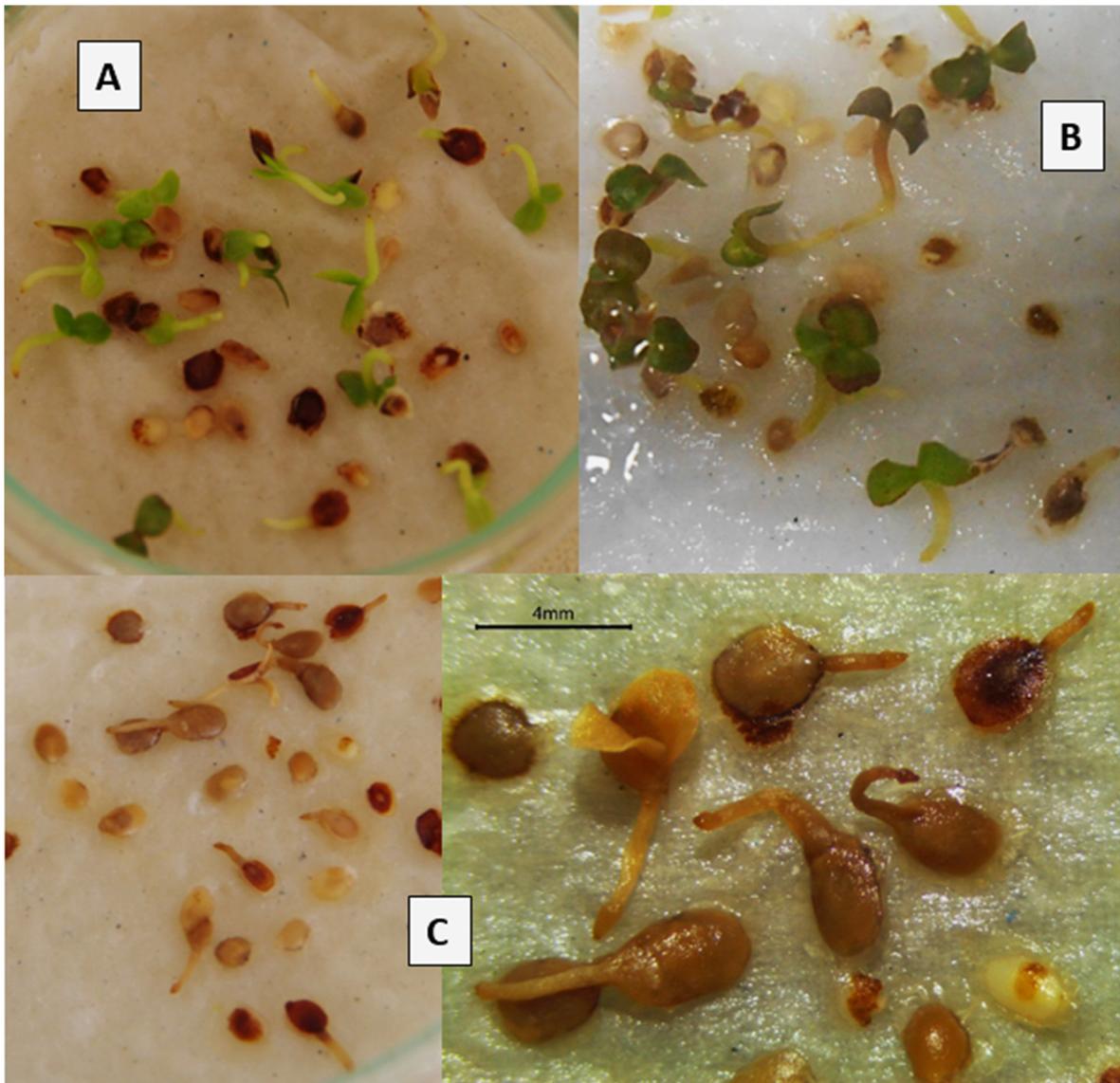
**Figura 23.** Germinación de las semillas de *C. krauseana* almacenadas 8.7% de contenido de humedad.

**A.** Germinación de semillas almacenadas por 2 semanas evaluadas después de 21 días de ser sembradas (izquierda) y las mismas después de 33 días de ser sembradas (derecha). **B.** Plántulas vigorosas resultantes de la germinación de semillas almacenadas por 6 semanas con 8.7 % de contenido de humedad después de 18 días de ser sembradas. **C.** Germinación de semillas almacenadas por 11 semanas con 8.7 % de contenido de humedad después de 18 días de ser sembradas.



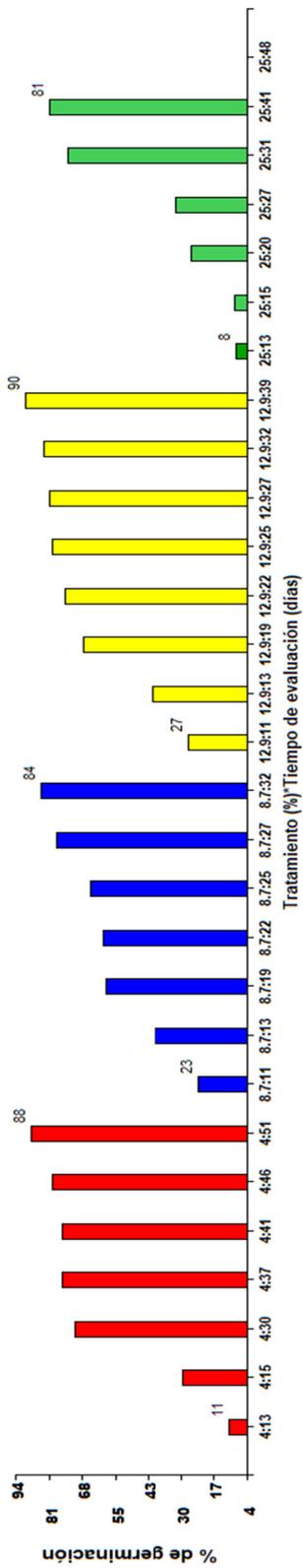
**Figura 24.** Germinación de las semillas de *C. krauseana* almacenadas 12.9% de contenido de humedad.

**A.** Germinación de semillas almacenadas por 2 semanas después de 33 días de haber sido sembradas. **B.** Germinación de semillas almacenadas por 6 semanas después de 40 días de haber sido sembradas. Se observan muchas semillas necrosadas después de germinar y plántulas con bordes irregulares y necrosados (círculo rojo). **C.** Germinación de semillas almacenadas por 11 semanas después de 36 días de haber sido sembradas.

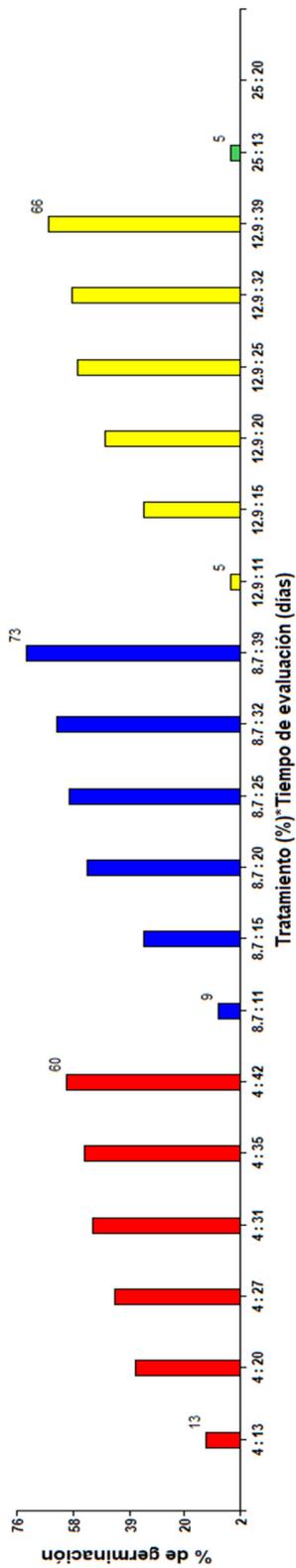


**Figura 25.** Germinación de semillas de *C. krauseana* con 25% de contenido de humedad.

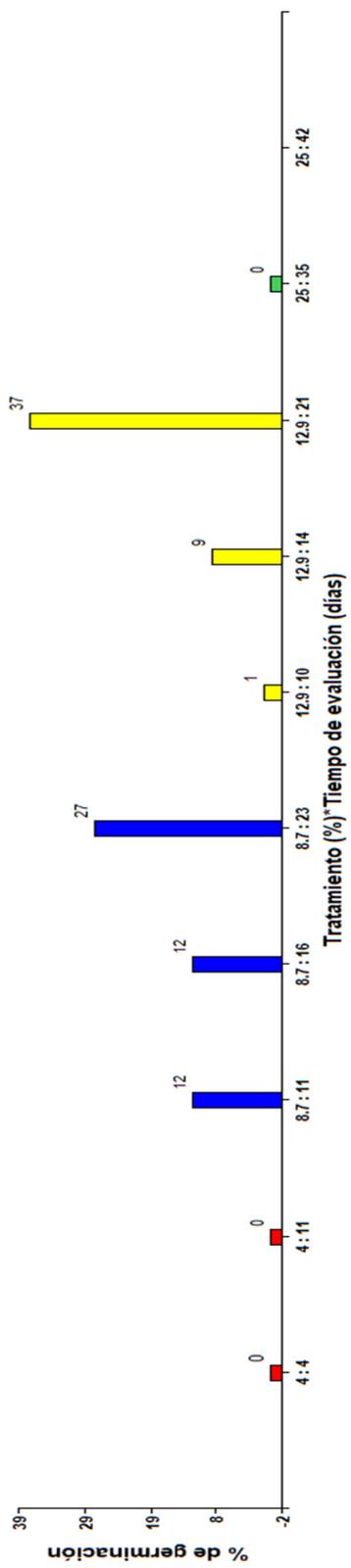
**A.** Germinación de semillas almacenadas por 2 semanas después de 21 días de haber sido sembradas. **B.** Germinación de semillas almacenadas por 6 semanas después de 18 días de haber sido sembradas. **C.** Germinación de semillas almacenadas por 11 semanas después de 36 días de haber sido sembradas.



**Figura 26.** Gráfico que describe la velocidad de germinación de las semillas que fueron almacenadas por 2 semanas.



**Figura 27.** Gráfico que describe la velocidad de germinación de las semillas que fueron almacenadas por 6 semanas.



**Figura 28.** Gráfico que describe la velocidad de germinación de las semillas que fueron almacenadas por 11 semanas.

#### **7.4 Efecto de la inoculación con PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) sobre el vigor de los plantines de *C. krauseana* y *C. calisaya*.**

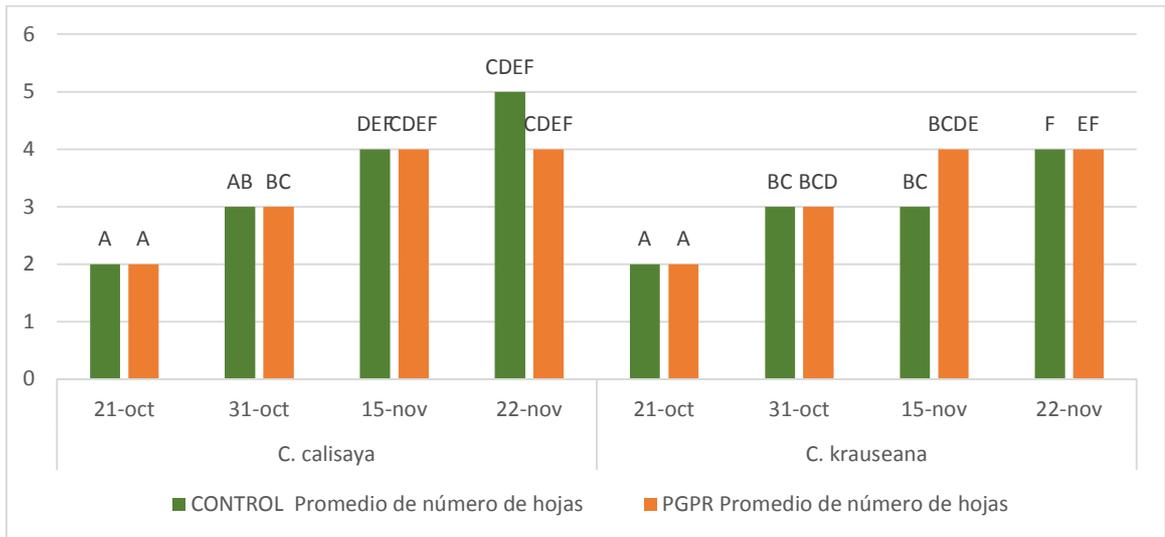
Las evaluaciones se realizaron sólo por 6 semanas debido a la alta mortandad de las plántulas. El experimento concluyó cuando los plantines tenían 8 semanas después de su germinación.

Los análisis estadísticos no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos PGPR y Control para las variables “Largo de ambas hojas” (**Figura 30, Anexo 5 y 6**), “Número de hojas” (**Figura 29, Anexo 7 y 8**) y “Número de plantines vivos” (**Figura 31, Anexo 9 y 10**) para ambas especies a un p-valor < 0.05. Sin embargo, en la variable “Número de plantines vivos” puede notarse una tendencia de mayor mortandad con el tratamiento PGPR (**Tabla 10**).

Los promedios de todas las variables evaluadas pueden visualizarse en la **Tabla 10**.

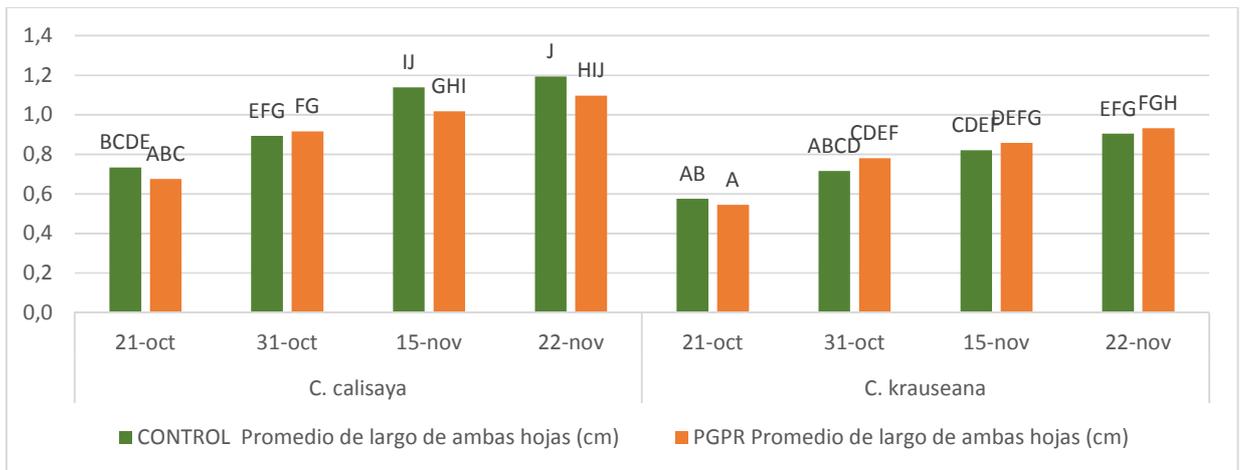
**Tabla 10.** Promedio de las variables evaluadas en cada especie de *Cinchona*.

<b>Especie</b>	<b>Fecha de evaluación</b>	<b>Número de hojas en el tratamiento Control</b>	<b>Número de hojas en el tratamiento PGPR</b>	<b>Largo de ambas hojas (cm) Control</b>	<b>Largo de ambas hojas (cm) PGPR</b>	<b>Número de plantines vivos Control</b>	<b>Número de plantines vivos PGPR</b>
<b><i>C. calisaya</i></b>	21/10/2016	2	2	0.7	0.7	30	30
	31/10/2016	3	3	0.9	0.9	27	25
	15/11/2016	4	4	1.1	1	23	18
	22/11/2016	5	4	1.2	1.1	17	12
<b><i>C. krauseana</i></b>	21/10/2016	2	2	0.6	0.5	30	30
	31/10/2016	3	3	0.7	0.8	23	20
	15/11/2016	3	4	0.8	0.9	23	17
	22/11/2016	4	4	0.9	0.9	15	10



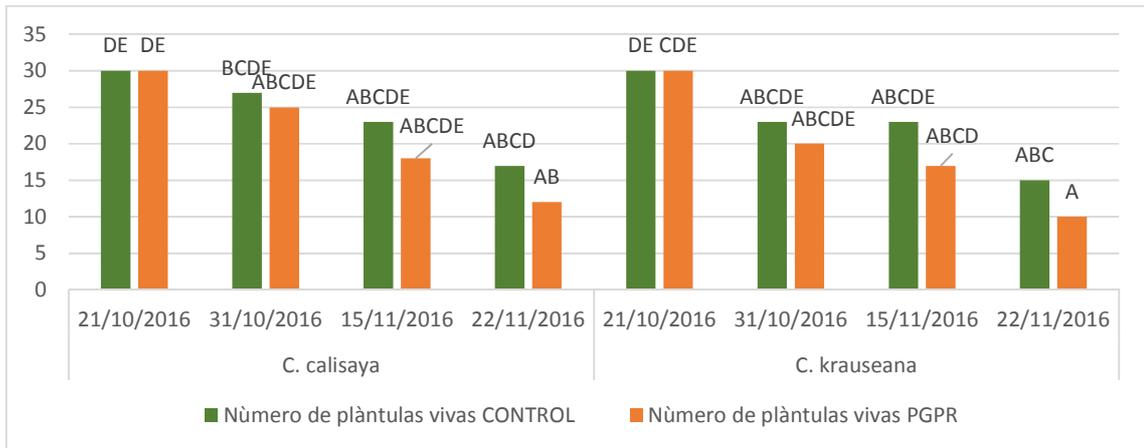
\*Las letras indican la separación de promedios por Tuckey a un nivel de 5%.

**Figura 29.** Comparación del promedio de número de hojas de *Cinchona* por tratamiento PGPR y Control durante las fechas de evaluación.



\*Las letras indican la separación de promedios por Tuckey a un nivel de 5%.

**Figura 30.** Comparación del promedio del largo de ambas hojas de *Cinchona* por tratamiento PGPR y Control durante las fechas de evaluación.



**Figura 31.** Comparación del promedio del número de plantines vivos de *Cinchona* por tratamiento PGPR y Control durante las fechas de evaluación.

## 8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 8.1 Relación del color y visibilidad del embrión en las semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya* con sus porcentajes de viabilidad.

Resultados obtenidos por Mejía (2014) en semillas de *Cinchona krauseana* almacenados a 4°C mostraron positiva la clasificación de las semillas por su coloración sobre su porcentaje de germinación, donde las semillas de *Cinchona krauseana* clasificadas como oscuras alcanzaron 47% de germinación y las claras 16%. Sin embargo, los resultados del presente trabajo, donde se utiliza semillas de la misma colecta, indican que las semillas oscuras de *Cinchona krauseana* tienen 12.2% de viabilidad con vigor alto y que las semillas claras con vigor alto tienen 43.5% de viabilidad. Bewley et al. (2013) menciona que la viabilidad y la germinación de numerosas semillas mejoran luego de un tiempo de almacenamiento bajo condiciones específicas como bajas temperaturas y humedades relativas cercanas al 0%. Mejía (2014) menciona que la coloración oscura de las semillas se ha relacionado con su grado de maduración, así como también lo menciona Bewley et al. (2013) que las semillas oscuras se encontrarían maduras, y las claras, aun durante el proceso de maduración. De los resultados obtenidos en este trabajo podemos interpretar que las semillas claras consideradas como inmaduras en el 2012 por Mejía (2014) han mejorado su viabilidad con el tiempo probablemente por madurar y que las semillas oscuras han reducido su viabilidad con el tiempo por envejecer. Finalmente, con respecto a la clasificación de embriones visibles y no visibles, podemos inferir que un mayor volumen del endospermo reduce o anula la visibilidad de su embrión por lo que el uso de este carácter para su clasificación no es válida.

## **8.2 Efecto de la aplicación de nitrato de potasio y agua de coco (técnica de *seed priming*) en semillas de *C. krauseana* y *C. calisaya* para maximizar el porcentaje de germinación.**

Shim et al. (2008) sugirieron que el  $\text{KNO}_3$  promueve la reparación metabólica de tejidos y el aumento de respiración, con lo cual se mejora la tasa de crecimiento y la germinación de las semillas. Esto se ve claramente en los resultados obtenidos en las semillas de *C. krauseana* donde el uso de  $\text{KNO}_3$  como solución inductora se ve reflejado en el aumento del porcentaje de germinación y vigor de las plántulas debido a que estas eran más verdes, de mayor tamaño y con raíces más grandes. Lo que supondría que la disponibilidad de nutrientes como los que aporta el  $\text{KNO}_3$  es un requisito para la germinación y vigor de semillas en estas especies.

Campos et al. (2014) exponen que *C. pubescens* no logra aumentar su porcentaje de germinación de manera significativa usando como solución inductora  $\text{KNO}_3$ . Sin embargo, menciona tener plántulas más vigorosas en comparación al tratamiento Control. De manera similar ocurre en el presente trabajo con *C. calisaya* donde no hay diferencias significativas para la germinación de las semillas tratadas con  $\text{KNO}_3$  y las del testigo, siendo sus valores de porcentaje de germinación altos (80% y 79% respectivamente). Sin embargo, en *C. krauseana* sí aumenta significativamente su porcentaje de germinación hasta un 31.9% sobre el valor del tratamiento Control con  $\text{KNO}_3$  a 1000ppm, asemejándose al porcentaje de germinación de *C. calisaya*. Esto podría deberse a que las semillas de *C. calisaya* y *C. pubescens* eran semillas que se encontraban con menos tiempo de almacenamiento y no requerían de un inductor para aumentar la tasa de germinación y que las semillas de *C. krauseana* que ya tenían 4 años almacenadas sí lo necesitaban. Como menciona Shim et al. (2008), el  $\text{KNO}_3$  promueve la reparación metabólica de tejidos y el aumento de respiración, con lo cual habría mejorado la tasa de crecimiento y germinación de las semillas de *C. krauseana*.

Roca y Mroginski (1991) mencionan que el agua de coco es uno de los líquidos que al ser nutritivos para los embriones inmaduros, podía producir el mismo efecto en tejidos y en células explantadas. Así también dicen que una de las técnicas para estimular la división celular de los explantes es utilizar agua de coco a concentraciones muy bajas como 5 y 10%, concentraciones que podrían actuar con las auxinas y promover el crecimiento. Sin embargo, Campos et al. (2014) realizó ensayos con semillas de *Cinchona pubescens*, y reportaron que el porcentaje de germinación disminuyó hasta 29.2 % con agua de coco al 70%. En el presente trabajo también se realizaron ensayos con las mismas dosis, agua de coco al 70% y se encontró que *C. calisaya* reduce su porcentaje de germinación hasta 50.7 % y *C. krauseana* hasta 52.1%. De estos resultados podemos descartar las concentraciones altas de agua de coco como inductor de la germinación para semillas de *Cinchona* ya que ha sido comprobado en 3 especies.

### **8.3 Efecto de 2, 6 y 11 semanas de almacenamiento de las semillas de *C. krauseana* a 4, 8.7, 12.9 y 25% de contenido de humedad sobre el porcentaje de germinación.**

Campos et al. (2015) exponen que las semillas de *C. pubescens* con las que trabajaron poseían 16.67% de contenido de humedad al momento de ser ingresadas a laboratorio y alcanzaron 84.66% de germinación. Mejía (2014) expone en sus resultados que las semillas de *C. krauseana* recién ingresadas al laboratorio en el 2012 alcanzaron 47% de germinación. Sin embargo, las semillas de *C. krauseana* del mismo lote, en el 2014, con contenido de humedad 7.2% alcanzaron 88% de germinación (Sun et al. 2016) y en el 2016, el presente trabajo expone que las semillas del mismo lote contenían 7.07% como contenido de humedad y germinaron sólo el 52%. Según Popiniguis (1985) la madurez fisiológica de la semilla se da cuando esta alcanza su máximo vigor y poder germinativo donde desempeña eficientemente sus funciones fisiológicas propias; después de este punto, el vigor y el poder germinativo tienden a disminuir debido a procesos naturales de

deterioro. Considerando lo anterior, podemos decir que estas semillas alcanzaron su madurez en el 2014 y después empezaron a deteriorarse y perder su viabilidad.

Mejía (2014) menciona también que las semillas de *C. krauseana* almacenadas a 4% de contenido de humedad en el banco de semillas por 2 semanas alcanzan 61% de germinación y después de 16 semanas en almacenamiento alcanzan 74.3% de germinación. Si contrastamos estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo tenemos que las semillas de *C. krauseana* almacenadas también a 4% de contenido de humedad por 2 semanas alcanzaron 88% de germinación y a las 11 semanas redujeron su porcentaje de germinación a 0. Mejía (2014) concluye que el porcentaje de germinación aumenta a medida que pasa el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, el presente trabajo nos indicaría que Mejía usó semillas inmaduras o en dormancia que aumentaron su porcentaje de germinación después de 16 semanas de almacenamiento debido a que las bajas temperaturas del Banco de Semillas podrían haber roto algún tipo de dormancia presente por simular una fase de vernalización natural (Berrie, 1990). Sin embargo, después de 4 años de almacenamiento las semillas ya habían madurado y de salir de su dormancia por lo que han ido perdiendo su vigor o han envejecido e ido perdiendo su viabilidad como lo menciona Bidwell (2000). Es por ello, que almacenar a las semillas con 4% de contenido de humedad por 11 semanas disminuye su porcentaje de germinación a 0.

Mejía (2014) también menciona que el contenido de humedad de las semillas de *C. krauseana*, tiene una relación inversa y significativa con su porcentaje de germinación, obteniéndose mayores porcentajes de germinación a 4% de contenido de humedad luego de 16 semanas en almacenamiento en comparación con el 5 y 6% de contenido de humedad que también evaluó. Sin embargo, el presente trabajo que evaluó las semillas de *C. krauseana* del mismo lote demuestra que después de 11 semanas de almacenamiento las semillas no germinan (0% de germinación) y que, en ese tiempo, las semillas que logran

los mejores porcentajes de germinación son las que tienen 8.7 y 12.9% de contenido de humedad.

Finalmente, Mejía (2014) menciona que las semillas de *C. officinalis* con contenidos de humedad mayores a 21% tienen 0% de viabilidad. Esto se puede corroborar en los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde las semillas de *C. krauseana* con 25% de contenido de humedad después de 6 semanas de almacenadas no germinan (0% de germinación). Según Hong y Ellis (1996), la madurez, calidad fisiológica, estado sanitario y contenido de humedad, afectan la velocidad de deterioro de las semillas. Según esta afirmación, almacenar semillas de *C. krauseana* maduras a contenidos de humedad tan altos como 25% habrían acelerado el proceso de deterioro de estas por lo que perdieron su viabilidad en poco tiempo.

#### **8.4 Efecto de la inoculación con PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) sobre el vigor de los plantines de *C. krauseana* y *C. calisaya*.**

Fernández (2015) logró aumentar en 34% el porcentaje de germinación de semillas de café que embebió en una suspensión de bacterias (*Azotobacter* y *Pseudomonas*) de  $10^8$  UFC/ml. Sin embargo, el 91% de las cepas evaluadas no presentaron efecto favorable en el porcentaje de germinación, respecto al control.

En el presente trabajo se aplicaron las 4 cepas en conjunto como consorcio bacteriano todas a  $10^9$  UFC/ml. Es posible que la concentración del inóculo haya sido muy alta y el intervalo de inoculación muy corto para los plantines de *Cinchona*.

El suelo de *Cinchona pubescens* es ácido con pH 5.3. Se sabe que el inóculo de bacterias posee un pH 5.5. Sin embargo, el pH de la solución hidropónica con la que se regaron los plantines es 6.5. Por lo que la mortandad de los plantines la atribuimos al aumento del pH del sustrato donde se generaron condiciones para la proliferación de hongos parásitos que causen la pudrición de las raíces y posterior necrosamiento de las hojas y finalmente la

muerte de los plantines. Por tal motivo, no lograron mejorar el vigor de los plantines de *Cinchona* resultando que los tratamientos Control y PGPR no tengan diferencias significativas.

## 9 CONCLUSIONES

No hay una relación de la coloración de las semillas de *C. calisaya* y *C. krauseana* y la visibilidad de su embrión vs sus porcentajes de viabilidad.

El tratamiento pre germinativo con soluciones de  $\text{KNO}_3$  incrementa el porcentaje de germinación de semillas de *Cinchona krauseana* que posean un vigor bajo, incluso mejora el vigor de las plántulas.

El agua de coco a concentraciones mayores iguales a 30% aplicadas como solución pre germinativa reduce el porcentaje de germinación de semillas de las dos especies de *Cinchona*.

Las semillas de *C. krauseana* almacenadas desde el 2012 a 4°C han envejecido y perdido su potencial germinativo por lo que por lo que demuestran ser recalcitrantes.

La aplicación de los inóculos de PGPR a los plantines de las dos especies de *Cinchona* bajo las condiciones que se dieron en el presente estudio no cumple su efecto como promotoras del crecimiento.

## 10 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar nuevos ensayos con los tratamientos inductores de agua de coco, usándolo sólo como estimulante temporal y no continuo.

Continuar con estudios de almacenamiento de las semillas *C. calisaya* para conocer qué tipo de semilla es (ortodoxa o recalcitrante).

Mejorar los métodos de aplicación de los inóculos de PGPR como frecuencia de aplicación y concentración del inóculo.

Se recomienda aplicar los inóculos de PGPR luego de obtenidos y no conservarlos para evitar contaminaciones.

Se recomienda continuar con las investigaciones sobre el manejo adecuado en los plantines de *Cinchona* con la finalidad de potenciar su vigor para un futuro establecimiento de la planta en campo.

.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

Aguero S., Suni M., Meneses R., Cancho S., Huerta K., Albán J. y García S. 2016. Aislamiento y evaluación de la actividad de rizobacterias de *Cinchona pubescens* “árbol de la quina”. 2<sup>nd</sup> International Workshop Biotechnology and Environment.

Albán J. 2012. “Las quininas o cascarillas del Perú: Un dilema”. En: XIV Congreso Nacional de Botánica. “Dr. Arbundio Sagastegui Alba”. Trujillo, Perú.

Albán J. 2013. Etnobotánica de Rubiaceae peruanas. Tesis para optar el grado de doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional San Marcos, Lima, Perú.

Alboresi A., Gestin C., Leydecker M., Bedu M., Meyer C. and Truong, H. 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. Plant Cell and Environment 28:200-512.

Andersson L. 1998. A revision of the genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchoneae). Mem. New York Bot. Gard. 80: 1–75.

Andersson L. 1992. A Provisional checklist of Neotropical Rubiaceae. Scripta Botanica Belgica 1.

Apolo Chamba M.E. 2012. Germinación en laboratorio e influencia de los hongos micorrízicos y la aplicación de nutrientes en el crecimiento de dos procedencias de *Cinchona pubescens*, a nivel de invernadero. Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniera Forestal. Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador. p. 39-67.

Barros D.I., Nunes H.V., Fernandes D.C. & Bhering M.C. 2002. Comparação entre testes de vigor para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de tomate. Rev. Bras. Sem. 24 (2):12-30.

Barreto M., Seldin L., Araujo F., Ramos R. 2010. Plant growth Promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: Maheshwari DK (ed). Plant growth and health promoting bacteria. Springer, Berlin. (18): 21-43.

Barreto D., Valero N., Muñoz A., Peralta A. 2007. Efecto de microorganismos rizosféricos sobre germinación y crecimiento temprano de *Anacardium excelsum*. Zonas Áridas, 11(1):240-250.

Batak I., Dević M., Gibal Z., Grubišić D., Poff K. & Konjević R. 2002. The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. Seed Science Research, 12(4), 253-259. doi:10.1079/SSR2002118.

Berjak P., Pammenter N. W., Vertucci C. W. 1992. Homohydrous (recalcitrant) seeds: development statuts, desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. Planta 186:249- 261.

Berrie A. 1990. Germination and Dormancy. En: Malcom B. Wilking. Advance Plant Physiology.USA. p. 440-468.

Bewley J., Bradford K., Hilhorst. and Nonogaki H. 2013. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd Edition. New York, NY: Springer NewYork. 392 p. ISBN. 1461446929.

Bidwell R.G.S., 2000. Fisiología Vegetal. AGT editores, S.A. México, D.F. 784 p

Buitrón X. 1999. Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación. TRAFFIC Internacional. Ecuador. 101 pp.

- Buddenhagen C. E., Renteria J., Gardener M., Wilkinson S. R., Soria M., Yanez P., Tye A. y Valle R. 2004. Control of a highly invasive tree *Cinchona pubescens* in Galapagos. *Weed Technology* 18: 1994 -1202.
- Brako L. & Zarucchi J. 1993. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Perú. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* Vol 45, n° i-xi, p. 1-1286.
- Camelo M., Vera S., Bonilla R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 12(2):159-166.
- Campos-Ruíz J., Cerna-Rebaza de Chico L., Chico-Ruíz J. 2014. Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de quina, *Cinchona pubescens*. Trujillo. Perú. *REBIOLEST* 2014; 2(1):3-9.
- Cancho S., Castañeda H., Agüero S., Suni M., Albán J. 2016. Evaluación de la presencia de micorrizas y esporas en *Cinchona pubescens* "quina o cascarilla" (Rubiaceae). Evento científico. ICBAR XXV.
- Carvalho M. y Nakawana J. 1993. Sementes. Ciencia, tecnologia e producao. Fundacao Cargill. Campinas. 429 p.
- Chin H. F. 1978. Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics: seed problems. *Acta Hort.* 83:17-21.
- Chong C., Bible B. B., & Ju H. Y. 2001. Germination and emergence. *Handbook of plant and crop physiology*, 57.
- Conde M. E., Moreno S. J., Eras G. V., Patiño D. J., González Z., Yaguana A., Valarezo O. C. 2017. Multiplicación sexual y asexual de *Cinchona officinalis* L., con fines de conservación de la especie. *Revista científica Universidad Señor de Sipán.* Volúmen 1. Número 9. p. 3-11.

Córdova T. L., Burriss J. S. 2002. Alignment of lipid bodies along the plasma membrane during the acquisition of desiccation tolerance in maize seed. *Crop Sci.* 42:1982–1988.

Costa P. de S.C. & Carvalho M.L.M. 2006. Teste de condutividade elétrica individual na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea arabica* L.). *Ciê. Agrotec.* 30 (1):92-120.

Criollo P., Obando M., Sánchez L., Bonilla R. 2012. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 13(2): 189-195

Delprete, P. & R. Cortés. 2002. Sinopsis of Neotropical Rubiaceae Genera. New York Botanical Garden (on line). <http://www.nybg.org/bsci/res/delpic2.html>

Diaz-Vivancos P., Barba Espin G. y Hernández J. A. 2013. Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. *Plant Cell Reports*, 32(10), 1491-1502.

Dursset S., Chabrilange N., Engelmann F., Anthony F., Louarn J., Hamon S. (1998). Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea Arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa*, and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. *Seed Sci. Res.* 8:9:15.

Ellis R., Hong T.D., Roberts E., Tao K. 1990. Low moisture limits to relations between seed longevity and moisture. *Annals of Botany*, vol. 65, p. 493-504.

Emery R.J.N., Ma Q. and Atkins C.A. 2000. The forms and sources of cytokinins in developing white lupine seeds and fruits. *Plant Physiology* 123, 1593–1604.

Farrant J. M., Pammenter, N. M., Berjak P., Walters C. 1997. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* 7:137-144.

Fernández Cerna J. C. 2015. "Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de café (*Coffea arabica* L. var. "Tipica" En sus primeros estadios de desarrollo" (Tesis para optar el título profesional de Biólogo). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Ferguson J. 1995. An introduction to seed vigour testing. In: Seed vigour testing seminar (Ed. H.A. van de Venter). International Seed Testing Association. Zürich, Switzerland. p. 14

Fisher W., Bergfeld R., Plachy R., Schopfer P. 1988. Accumulation of storage materials, precocious germination, and development of desiccation tolerance in mustard (*Sinapis alba* L.). *Bot. Acta* 101:344- 354.

Fontana P., Riscala E., Rodríguez R. y Gianfrancisco S. 2002. Efecto de diferentes tratamientos sobre la germinación de afata (*Sida rhombifolia*). XIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina. pp. 45-46.

Forbis T.A., Floyd S.K. y De Queiroz A. 2002. The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: implications for the evolution of seed dormancy. *Evolution*, 56:2112–2125.

Froni L. 2011. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Primera edición. Orientación Grafica Editorial, Buenos Aires.

Galán Torres J. A. 2016. Los tres premios Nobel de Medicina 2015. *Sanid. Mil.* vol.72 no.1. Madrid.

Gómez B., Hernández A., Herrera C., Arroyo G., Vargas L., Olalde V. 2012. Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de guayaba (*Psidium guajana*). Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable. 8 (3):97-102.

Hartmann H.T. y Kester D.E. 1994. Propagación de Plantas y Principios Básicos. CECSA. México, D.F. 760 p

Hartmann A., Rothballer M., Schmid M. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. Plant Soil. (312): 7 – 14.

Herrera J., Alizaga R., Guevara E. y Jimènez V. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. Fisiología de la producción de los cultivos tropicales. Vol 4. Editorial Universidad de Costa Rica.

Hiltner L. 1904. Über neuerer erfahrungern und problem auf dem gebiet der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundung und brache. Arbeiten Deutscher Landwirtschafts Gesellschaft. 98: 59-78.

Hong T.D., Linington S. and Ellis R.H. 1996. Seed Storage Behaviour: a Compendium. Handbooks for Genebanks: No. 4. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

IPNI (International Plant Nutrition Institute) "Fuentes de Nutrientes Específicas". Las hojas informativas. N° 11.

ISTA 2008. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Bassersdorf.

ISTA 1995. Handbook of Vigour Test Methods. International Seed Testing Association. 3<sup>rd</sup> Edition.

- Jäger H., Alencastro M., Kaupenjohann M. & Kowarik I. 2013. Ecosystem changes in Galápagos highlands by the invasive tree *Cinchona pubescens*. *Plant & Soil*, 371(1/2), 629. doi:10.1007/s11104-013-1719-8
- Jiménez L.C. 2002. Lista de las colecciones colombianas de Rubiaceae depositadas en el Herbario Nacional Colombiano (COL). *Caldasia*, 24(1): 41-64.
- Keene A., Anderson L., Phillipson J. 1983. Investigation of *Cinchona* leaf alkaloids by high-performance liquid chromatography; 260: 123-128.
- Koornneef M., Bentsink L. & Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Current opinion in plant biology*, 5(1), 33-36.
- Krikorian D.A. 1993. Medios de cultivo, generalidades, composición y preparación. En: Mroginski, M y W, Roca (Eds) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentación y Aplicaciones pp. 41, 77.
- Lavorel S., Díaz S., Cornelissen J., Garnier E., Harrison S.P., McIntyre S., Urcelay C. 2007. En: Canadell J.G., Pataki D., y Pitelka L. (eds). *Terrestrial Ecosystems in a Changing World*. The IGBP Series, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Lugtenberg B., Dekkers L., Bloemberg G. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*. 39: 461-490
- Magnitskiy S. V., Plaza A. G. 2007. Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agron. Colomb.* 25:96-103.
- Martínez L., Martínez R., Hernández M., Arvizu S., Pacheco J. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia*. 36(1): 63-69.

Mejía Prieto F. 2014. Factores que influyen en la germinación de semillas de 6 especies del género *Cinchona* (RUBIACEAE) en el Perú. Tesis para optar el título profesional de Biólogo con mención en Botánica. Universidad Nacional San Marcos, Lima, Perú.

Otero V. 2011. Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticos con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la costa atlántica colombiana. Tesis para obtener el grado de Magister en Ciencias – Microbiología. Universidad Nacional de Colombia.

Patiños Torres C. y Mosquera G. F. 2011. Efecto inductor del agua de coco sobre la germinación de semillas y brotamiento de los cormos de la hierba de la equis *Dracontium grayumianum*. *Acta biol. Colomb.* vol.16 no.1.

Peña H. y Reyes I. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia.* 32(8): 560 - 565.

Pérez F. y Pita J.M. 1999. Dormición de Semillas. Hojas Divulgadoras. Núm. 2103-HD. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, 20 pp.

Pino D. & Taylor Ch. 2006. Rubiaceae endémicas del Perú. El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. *Rev. Perú. Biol.* Número especial, vol. 13, n° 2. p. 586-599.

Piromyou P., Buranabanyat B., Tantasawat P., Tittabutr P., Boonkered N., Teaumroong N. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal Soil Biology.* 47: 44–54.

- Piriz V., Fassola H. E., Chaves A. R., Mugridge A. 2008. Almacenamiento refrigerado de semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze: conservación del poder germinativo. RIA [en línea], 2004, vol. 33, no. 2, p. 67-84. ISSN 0325-8718.
- Popiniguis, F. 1985. Fisilogia da semente. 2 ed. Brasilia. 289 p.
- Rangel M. A., Córdova L., López A. P., Delgado A., Zavaleta H. A. & Villegas A. 2011. Tolerancia a la desecación en semillas de tres orígenes genéticos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista fitotecnia mexicana*, 34(3), 175-182. Recuperado en 21 de septiembre de 2017, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802011000300008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802011000300008&lng=es&tlng=es).
- Ribaudo C., Riva D., Curá J., Ponds C., Granell A., Cantore M. 2013. Rizósfera, biodiversidad y agricultura sustentable. Capítulo 12: Etileno como mediador de los mecanismos directos e indirectos de la promoción del crecimiento vegetal ejercido por rizobacterias. Asociación Argentina de Microbiología. 1ra edición. pp 215-240.
- Roca W.M. & Mroginski L.A. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura , Fundamentos y Aplicaciones. p. 49-55.
- Romero J. M. 2015. Rasgos morfológicos de frutos, semillas y embriones de *Cinchona officinalis* L. (RUBIACEAE) en el sur del Ecuador.
- Ruiz María de los Angeles. 2009. El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: Cebadilla chaqueña. Instituto Nacional de tecnología agropecuaria. Publicación técnica N<sup>o</sup>77.
- Sánchez J., López I., Villegas J., Montañó N. 2014. Respuesta del maíz (*Zea mays* L) a la inoculación con *Azotobacter* sp y *Burkholderia* sp a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Scientia Agropecuaria*. 5:17-23.

- Sarabia M., Madrigal R., Martínez M., Carreón Y. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*. 12(1): 65- 71.
- Shim S.I., Moon J.C., Jang C.S., Raymer P. y Kim W. 2008. Effect of potassium nitrate priming on seed germination of seashore paspalum. *HortScience* 43:2259-2262.
- Smith, P.M y Atkins C.A.. 2002. Atkins purine biosynthesis, big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol.* 128, 793-802)
- Suni M., Cancho S., Albán J. 2016. Tolerancia a la desecación de las semillas de *Cinchona krauseana* L. y *C. calisaya* Wedd. (RUBIACEAE). *Revista peruana de Biología*. En revisión.
- Taiz L. & Zeiger E. 2006. *Plant physiology*. 4th ed. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA 705 p.
- Valverde B.F.M. 1998. *Plantas útiles del Litoral Ecuatoriano*. Ministerio de Medio Ambiente. Instituto para el Ecodesarrollo de la Región Amazónica (ECORAE) Y Fundación Ecuatoriana de estudios Ecológicos (EcoCiencia). Guayaquil-Ecuador.
- Verpoorte, R., Schripsema J., Van der Leer T. 1989. "Cinchona Alkaloids", in: Brossi, A. (Ed), *The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology*. Vol. 34. 331-334; 358-369.
- Weaver R. 1976. *Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura*. Editorial Trillas. México D.F., México. 65 p.)
- Wesley-Smith J., Vertucci C. W., Berjak P., Pammenter N. W., Crane J. 1992. Cryopreservation of desiccation-sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and the thermal properties of tissue water. *J. Plant Physiol.* 140:596- 604.
- Zevallos P.P.A. 1989. *Taxonomía distribución geográfica y status del Genero Cinchona en el Perú*. Lima, Perú. p.18-71.



## 12 ANEXO

**Anexo 1.** Prueba de Tuckey de los promedios de germinación de semillas de *C. calisaya* tratadas con las diferentes soluciones inductoras.

### Análisis de la varianza

Especie	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
<i>C. calisaya</i>	% semillas germinadas	165	0.39	0.37	54.97

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8.35	6	1.39	16.83	<0.0001
Inductores	8.35	6	1.39	16.83	<0.0001
Error	13.06	158	0.08		
Total	21.41	164			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.25042

Error: 0.0827 gl: 158

Inductores	Medias	n	E.E.		
Agua de coco al 70%	0.10	25	0.06	A	
Agua de coco al 50%	0.29	16	0.07	A	B
Agua de coco al 30%	0.43	24	0.06		B C
KNO <sub>3</sub> 3000 ppm(mg/L)	0.65	25	0.06		C D
Agua destilada	0.68	25	0.06		D
KNO <sub>3</sub> 1000 ppm(mg/L)	0.70	25	0.06		D
KNO <sub>3</sub> 2000 ppm(mg/L)	0.72	25	0.06		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 2.** Prueba de Tuckey de los promedios de germinación de semillas de *C. krauseana* tratadas con las diferentes soluciones inductoras.

Especie	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
<i>C. krauseana</i>	% semillas germinadas	163	0.39	0.36	103.81

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6.06	6	1.01	16.38	<0.0001
Inductores	6.06	6	1.01	16.38	<0.0001
Error	9.62	156	0.06		
Total	15.69	162			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.21671

Error: 0.0617 gl: 156

Inductores	Medias	n	E.E.	
Agua de coco al 70%	0.00	25	0.05	A
Agua de coco al 50%	0.02	19	0.06	A
Agua de coco al 30%	0.02	19	0.06	A
Agua destilada	0.25	25	0.05	B
KNO3 3000 ppm(mg/L)	0.37	25	0.05	B C
KNO3 2000 ppm(mg/L)	0.44	25	0.05	B C
KNO3 1000 ppm(mg/L)	0.47	25	0.05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 3.** Comparación del efecto de los inductores sobre el porcentaje de germinación de las especies de *Cinchona*.

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=16.27763

Error: 706.9274 gl: 312

Especie	Inductores	Medias	n	E.E.	
<i>C. calisaya</i>	KNO3	68.08	75	3.07	A
<i>C. krauseana</i>	KNO3	42.76	75	3.07	B
<i>C. calisaya</i>	Agua de coco	42.60	65	7.12	B
<i>C. calisaya</i>	Agua destilada	36.45	25	13.57	B C
<i>C. krauseana</i>	Agua destilada	24.09	25	5.32	C
<i>C. krauseana</i>	Agua de coco	1.42	63	3.38	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 4.** Comparación de los porcentajes de germinación de *Cinchona* por tratamiento Control y PGPR.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=9.46173

Error: 706.9274 gl: 312

Inductores	Medias	n	E.E.	
KNO3	55.42	150	2.17	A
Agua destilada	32.33	50	9.22	B
Agua de coco	24.95	128	4.32	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 5.** Comparación del promedio de Largo de ambas hojas por tratamiento de cada especie de *Cinchona*.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.10499

Error: 0.0346 gl: 168

Especie	Tratamiento	Medias	n	E.E.	
C. calisaya	CONTROL	1.03	68	0.02	A
C. calisaya	PGPR	0.83	48	0.03	B
C. krauseana	PGPR	0.81	40	0.03	B
C. krauseana	CONTROL	0.79	28	0.04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 6.** Comparación del promedio del Largo de ambas hojas en los tratamientos Control y PGPR por cada especie en las diferentes fechas evaluadas.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.28029

Error: 0.0346 gl: 168

Especie	Fecha de evaluación	Tratamiento	Medias	n	E.E.					
C. calisaya	28/11/2016	CONTROL	1.19	17	0.05	A				
C. calisaya	22/11/2016	CONTROL	1.11	17	0.05	A	B			
C. calisaya	15/11/2016	CONTROL	1.04	17	0.05	A	B	C		
C. calisaya	28/11/2016	PGPR	0.97	12	0.05	A	B	C	D	
C. krauseana	28/11/2016	CONTROL	0.93	7	0.07	A	B	C	D	
C. krauseana	28/11/2016	PGPR	0.92	10	0.06	A	B	C	D	
C. calisaya	22/11/2016	PGPR	0.90	12	0.05		B	C	D	E
C. krauseana	22/11/2016	CONTROL	0.84	7	0.07		B	C	D	E
C. krauseana	22/11/2016	PGPR	0.83	10	0.06		B	C	D	E
C. calisaya	15/11/2016	PGPR	0.81	12	0.05			C	D	E
C. calisaya	21/10/2016	CONTROL	0.78	17	0.05			C	D	E
C. krauseana	15/11/2016	PGPR	0.78	10	0.06			C	D	E
C. krauseana	15/11/2016	CONTROL	0.74	7	0.07				D	E
C. krauseana	21/10/2016	PGPR	0.70	10	0.06				D	E
C. krauseana	21/10/2016	CONTROL	0.64	7	0.07					E
C. calisaya	21/10/2016	PGPR	0.62	12	0.05					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 7.** Comparación del promedio de la variable “Número de hojas” por tratamiento Control y PGPR de cada especie de *Cinchona*.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.34510

Error: 0.3737 gl: 168

Especie	Tratamiento	Medias	n	E.E.	
C. calisaya	CONTROL	3.85	68	0.07	A
C. calisaya	PGPR	3.42	48	0.09	B
C. krauseana	CONTROL	3.36	28	0.12	B
C. krauseana	PGPR	3.15	40	0.10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 8.** Comparación del promedio de Número de hojas en los tratamientos por cada especie en las diferentes fechas evaluadas

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.92127

Error: 0.3737 gl: 168

Especie	Fecha de evaluación	Tratamiento	Medias	n	E.E.			
C. calisaya	28/11/2016	CONTROL	4.82	17	0.15	A		
C. calisaya	22/11/2016	CONTROL	4.59	17	0.15	A	B	
C. calisaya	28/11/2016	PGPR	4.00	12	0.18	A	B	C
C. krauseana	28/11/2016	CONTROL	4.00	7	0.23	A	B	C
C. krauseana	28/11/2016	PGPR	4.00	10	0.19	A	B	C
C. calisaya	15/11/2016	CONTROL	4.00	17	0.15	A	B	C
C. calisaya	22/11/2016	PGPR	3.83	12	0.18		B	C
C. calisaya	15/11/2016	PGPR	3.83	12	0.18		B	C
C. krauseana	15/11/2016	CONTROL	3.71	7	0.23		B	C
C. krauseana	22/11/2016	CONTROL	3.71	7	0.23		B	C
C. krauseana	22/11/2016	PGPR	3.40	10	0.19			C
C. krauseana	15/11/2016	PGPR	3.20	10	0.19			C
C. calisaya	21/10/2016	PGPR	2.00	12	0.18			D
C. calisaya	21/10/2016	CONTROL	2.00	17	0.15			D
C. krauseana	21/10/2016	PGPR	2.00	10	0.19			D
C. krauseana	21/10/2016	CONTROL	2.00	7	0.23			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 9.** Comparación de la variable “Número de plantines vivos” por tratamiento Control y PGPR en cada especie.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,92091

Error: 7,1944 gl: 9

Especie	Tratamiento	Medias	n	E.E.
C. krauseana	PGPR	18,75	4	1,34 A
C. calisaya	PGPR	19,00	4	1,34 A
C. krauseana	Control	20,00	4	1,34 A
C. calisaya	Control	21,75	4	1,34 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 10.** Base de datos de las evaluaciones del porcentaje de germinación de las semillas de *Cinchona calisaya* y *C. krauseana* en el tiempo.

<b>Especie</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Fecha de evaluación</b>	<b>Rèplicas</b>	<b>% semillas germinadas</b>
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	1	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	2	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	3	0.3
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	4	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	5	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	1	0.2
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	2	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	3	0.2
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	4	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	5	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	1	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	2	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	3	0.2

<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	4	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	5	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	07/10/2016	1	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	07/10/2016	2	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	07/10/2016	3	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	07/10/2016	4	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	07/10/2016	5	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	07/10/2016	1	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	07/10/2016	2	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	07/10/2016	3	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	07/10/2016	1	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	07/10/2016	2	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	07/10/2016	3	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	07/10/2016	4	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	07/10/2016	5	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	07/10/2016	1	0.2
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	07/10/2016	2	0.1

<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	07/10/2016	3	0.2
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	07/10/2016	4	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	07/10/2016	5	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	1	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	2	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	3	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	4	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	5	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	1	1.0
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	2	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	3	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	4	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	5	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	1	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	2	0.5
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	3	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	4	0.7

<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	5	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	11/10/2016	1	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	11/10/2016	2	0.3
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	11/10/2016	3	0.3
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	11/10/2016	4	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	11/10/2016	5	0.3
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	11/10/2016	1	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	11/10/2016	2	0.2
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	11/10/2016	3	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	11/10/2016	1	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	11/10/2016	2	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	11/10/2016	3	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	11/10/2016	4	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	11/10/2016	5	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	11/10/2016	1	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	11/10/2016	2	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	11/10/2016	3	0.6

<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	11/10/2016	4	0.6
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	11/10/2016	5	0.6
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	1	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	2	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	3	1.0
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	4	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	5	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	1	1.0
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	2	1.0
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	3	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	4	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	5	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	1	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	2	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	3	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	4	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	5	0.8

<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	15/10/2016	1	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	15/10/2016	2	0.6
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	15/10/2016	3	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	15/10/2016	5	0.6
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	15/10/2016	1	0.3
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	15/10/2016	2	0.3
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	15/10/2016	3	0.6
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	15/10/2016	1	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	15/10/2016	2	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	15/10/2016	3	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	15/10/2016	4	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	15/10/2016	5	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	15/10/2016	1	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	15/10/2016	2	1.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	15/10/2016	3	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	15/10/2016	4	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	15/10/2016	5	0.8

<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	1	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	2	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	3	1.0
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	4	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	5	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	1	1.0
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	2	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	3	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	4	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	5	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	1	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	2	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	3	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	4	1.0
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	5	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	19/10/2016	1	0.6
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	19/10/2016	2	0.7

<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	19/10/2016	3	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	19/10/2016	4	0.6
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	19/10/2016	5	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	19/10/2016	1	0.3
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	19/10/2016	2	0.4
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	19/10/2016	3	0.6
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	19/10/2016	5	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	19/10/2016	1	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	19/10/2016	2	0.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	19/10/2016	3	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	19/10/2016	4	0.2
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	19/10/2016	5	0.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	19/10/2016	1	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	19/10/2016	2	1.1
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	19/10/2016	3	1.0
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	19/10/2016	4	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	19/10/2016	5	0.8

<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	1	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	2	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	3	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	4	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	5	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	1	1.0
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	2	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	3	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	4	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	5	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	1	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	2	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	3	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	4	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	5	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	26/10/2016	1	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	26/10/2016	2	0.7

<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	26/10/2016	3	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	26/10/2016	4	0.6
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	26/10/2016	5	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	26/10/2016	2	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	26/10/2016	3	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	26/10/2016	5	0.2
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	26/10/2016	1	0.2
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	26/10/2016	2	0.2
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	26/10/2016	3	0.3
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	26/10/2016	4	0.5
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	26/10/2016	5	0.4
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	26/10/2016	1	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	26/10/2016	2	0.9
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	26/10/2016	3	0.8
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	26/10/2016	4	0.7
<i>C. calisaya</i>	<b>Agua destilada</b>	26/10/2016	5	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	1	0.0

<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	1	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	1	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	07/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	07/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	07/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	07/10/2016	4	0.0

<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	07/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	07/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	07/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	07/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	07/10/2016	1	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	07/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	07/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	07/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	07/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	07/10/2016	1	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	07/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	07/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	07/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	07/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	1	0.2
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	2	0.3
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	3	0.1

<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	5	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	1	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	2	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	3	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	1	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	2	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	3	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	4	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	11/10/2016	5	0.2
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	11/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	11/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	11/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	11/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	11/10/2016	3	0.0

<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	11/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	11/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	11/10/2016	1	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	11/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	11/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	11/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	11/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	11/10/2016	1	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	11/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	11/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	11/10/2016	4	0.3
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	11/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	1	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	2	0.6
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	3	0.5
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	4	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	5	0.7

<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	1	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	2	0.6
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	3	0.6
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	4	0.5
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	5	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	1	0.4
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	2	0.4
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	3	0.5
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	4	0.5
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	15/10/2016	5	0.5
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	15/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	15/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	15/10/2016	4	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	15/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	15/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	15/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	15/10/2016	4	0.0

<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	15/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	15/10/2016	1	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	15/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	15/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	15/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	15/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	15/10/2016	1	0.4
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	15/10/2016	2	0.2
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	15/10/2016	3	0.2
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	15/10/2016	4	0.3
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	15/10/2016	5	0.2
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	1	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	2	0.6
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	3	0.8
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	4	0.8
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	5	0.8
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	1	0.8

<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	2	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	3	0.6
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	4	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	5	0.8
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	1	0.5
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	2	0.5
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	3	0.5
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	4	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	19/10/2016	5	0.5
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	19/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	19/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	19/10/2016	4	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	19/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	19/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	19/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	19/10/2016	4	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	19/10/2016	5	0.0

<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	19/10/2016	1	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	19/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	19/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	19/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	19/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	19/10/2016	1	0.6
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	19/10/2016	2	0.6
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	19/10/2016	3	0.2
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	19/10/2016	4	0.3
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	19/10/2016	5	0.3
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	1	1.0
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	2	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	3	0.8
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	4	0.9
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 1000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	5	0.8
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	1	0.9
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	2	0.9

<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	3	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	4	0.7
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 2000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	5	0.8
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	1	0.9
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	2	0.6
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	3	0.6
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	4	0.8
<i>C. krauseana</i>	<b>KNO3 3000 ppm(mg/L)</b>	26/10/2016	5	0.8
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	26/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	26/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	26/10/2016	4	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 30%</b>	26/10/2016	5	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	26/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	26/10/2016	3	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	26/10/2016	4	0.1
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 50%</b>	26/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	26/10/2016	1	0.0

<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	26/10/2016	2	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	26/10/2016	3	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	26/10/2016	4	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua de coco al 70%</b>	26/10/2016	5	0.0
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	26/10/2016	1	0.8
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	26/10/2016	2	0.8
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	26/10/2016	3	0.3
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	26/10/2016	4	0.4
<i>C. krauseana</i>	<b>Agua destilada</b>	26/10/2016	5	0.4