Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

Estudio morfo fisiológico y germinación de las semillas de *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli para su conservación

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en Botánica

AUTOR

María Milagros Judith SÁNCHEZ BARBACHAN

ASESOR

Dr. Rafael Simón Oswaldo LA ROSA LOLI

Lima, Perú

2026



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

Sánchez, M. (2026). *Estudio morfo fisiológico y germinación de las semillas de Ciliosemina pedunculata (H. Karst) A. Antonelli para su conservación*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	María Milagros Judith Sánchez Barbachan
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70424497
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1427-717X
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Rafael Simón Oswaldo La Rosa Loli
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06134564
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5619-9811
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Enoc Efer Jara Peña
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08456362
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Richard Tito León
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42218792
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Giovana Patricia Vadillo Galvez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07268590
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.1.2. Biodiversidad y Ecología de Ecosistemas terrestres

Grupo de investigación	Grupo de investigación en Ecosistemas Marinos y Costeros - ECOMAC Centro de Investigación de Recursos Naturales - CIRNA
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación PCONFIGI – 2021. RESOLUCION DIRECTORAL Nº 00572-DGA-2021. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Proyectos de Investigación e Innovación para el Fortalecimiento de las Líneas de Investigación de los Grupos de Investigación de la UNMSM en la Política Nacional de Educación Superior Técnico Productiva (PNESTP-MINEDU) Año 2021. RESOLUCION DIRECTORAL Nº 00464-DGA-2021.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Anatomía y Farmacognosia Vegetal – Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Av. Germán Amézaga 375, Ciudad Universitaria. Latitud: -12.05604 Longitud: -77.08419
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021-2025
URL de disciplinas OCDE	Ciencias de las plantas, Botánica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.10

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 PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo las 10:00 horas del 23 de marzo de 2026, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga con mención en Botánica** de **MARÍA MILAGROS JUDITH SÁNCHEZ BARBACHAN.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N.º UNMSM-20250008823**, la titulando expuso su tesis: **ESTUDIO MORFO FISIOLÓGICO Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli PARA SU CONSERVACIÓN**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: APROBADO CON MENCIÓN HONROSA.

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 **MARÍA MILAGROS JUDITH SÁNCHEZ BARBACHAN** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 11:04 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 23 de marzo de 2026.

Dr. ENOC EFER JARA PEÑA
(PRESIDENTE)

Dr. RAFAEL SIMON OSWALDO LA ROSA LOLI
(ASESOR)

Dr. RICHARD TITO LEON
(MIEMBRO)

Mg. GIOVANA PATRICIA VADILLO GALVEZ
(MIEMBRO)

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, RAFAEL SIMÓN OSWALDO LA ROSA LOLI en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen de la EP **N° 000003-2026-EPECB-FCB/UNMSM** de la tesis, cuyo título es, "ESTUDIO MORFO FISIOLÓGICO Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli PARA SU CONSERVACIÓN" presentado por el bachiller **MARÍA MILAGROS JUDITH SÁNCHEZ BARBACHAN** para optar el título profesional de Bióloga con mención en **BOTÁNICA**.

CERTIFICO, que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el **6%** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título profesional de Bióloga con mención en BOTÁNICA

Lima, 22 de Enero de 2026

Firma del Asesor:

Nombres y Apellidos del asesor: Rafael Simón Oswaldo La Rosa Loli
DNI: 06134564

* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi niña interior, para demostrarle que los sueños y metas si se cumplen, que todo es posible y que somos imparables, a mi adulta interior por ser resiliente y luchar por nosotras, a mis padres Judith y Edgar, por enseñarme a ser constante, a no aceptar un no por respuesta y trabajar arduo; a mis hermanos Judith y Walter por ser mis complementos y almas gemelas; a mis papitos Lola, German y Dona por llenarme la vida de risas y amor; y por último, a mis hijas Kiru y Nala por motivarme a querer darles lo mejor, dando lo mejor de mí.

AGRADECIMIENTOS

Para empezar, me gustaría agradecer al Dr. Rafael Simón Oswaldo La Rosa Loli por darme la oportunidad de trabajar con él, por los conocimientos impartidos, la confianza depositada, su paciencia y constante guía a lo largo de esta desafiante experiencia.

A la Dra. Eleucy Pérez Tuesta por abrirme las puertas de su laboratorio siendo estudiante y darme la oportunidad de aprender bajo su ejemplo.

Al Mg. Domingo Iparraguirre León jefe del Laboratorio de Anatomía y Farmacognosia Vegetal por brindarme las instalaciones necesarias para la experimentación de mi tesis.

A la Dra. María Mercedes Soberón Lozano, directora del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA-UNMSM) por proporcionarme las instalaciones para realizar mi tesis.

A la Dra. Lastenia Ruíz Mesía por apoyarme a colectar el material biológico y su hospitalidad en los viajes de campo.

Asimismo, agradecer al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos que financió totalmente mi tesis mediante los proyectos: "Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación PCONFIGI – 2021" y el "Programa de Proyectos de Investigación e Innovación para el Fortalecimiento de las Líneas de Investigación de los Grupos de Investigación de la UNMSM en la Política Nacional de Educación Superior Técnico Productiva (PNESTP-MINEDU) Año 2021".

Por último, quería agradecer a mi familia y amistades que estuvieron conmigo en este proceso alentándome, aconsejándome y apoyándome para seguir adelante con mis sueños y metas, por recordarme que puedo con todo y contra todo, y por acompañarme en esta interesante prueba que asienta los cimientos de mi vida profesional y suma a mi crecimiento personal.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN 1
2. MARCO TEÓRICO 3
2.1. Generalidades de *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli 3
2.2. Introducción a *in vitro* 6
2.3. Maduración y germinación de semillas 7
2.4. Pruebas de vigor 10
2.5. Viabilidad de semillas con Tetrazolium 11
2.6. Histología de semillas 13
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 15
3.1. Hipótesis 15
3.2. Objetivos 15
3.2.1. Objetivo general 15
4. MATERIAL Y MÉTODOS 16
4.1. Materiales 16
4.1.1. Material biológico 16
4.1.2. Material de laboratorio y campo 17
4.2. Métodos 18
4.2.1. Métodos de colecta en campo 18
4.2.2. Germinación *in vitro* de semillas de *C. pedunculata (H. Karst) A*. Antonelli 19
4.2.3. Prueba de viabilidad de semillas de *C. pedunculata (H. Karst) A*. Antonelli con Tetrazolium 21
4.2.4. Histología y morfología de semillas de *C. pedunculata (H. Karst) A*. Antonelli 22
5. RESULTADOS 23
5.1. Germinación *in vitro* de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli 23
5.2. Prueba de viabilidad de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli con Tetrazolium 28
5.3. Histología y morfología de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli 29
5.4. Cuidados post germinación de las semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli 32
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS 34
6.1. Germinación *in vitro* de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli 34
6.2. Prueba de viabilidad de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli con Tetrazolium 36
6.3. Histología y morfología de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli 39

7. CONCLUSIONES 41
8. RECOMENDACIONES 42
9. REFERENCIAS BILBIOGRÁFICAS 43
10. ANEXOS 50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la prueba de Tetrazolium de las semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli 22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resumen de las etapas asociadas al desarrollo de maduración de las semillas. 1. Histodiferenciación, 2. Maduración y 3. Desecación. Elaborado por Kermode et al., 1986. 8

Figura 2. Fórmula del Tiempo Medio de Germinación propuesta por Ellis y Roberts (1980).....11

Figura 3. Fórmula del Índice de Velocidad de Germinación propuesta por Maguire (1962).....11

Figura 4. Reacción química de reducción del Tetrazolium a Formazan (Elías et al., 2012).....12

Figura 5. Ubicación de colecta en un mapa satelital de Google Earth. 16

Figura 6. Fórmula de la Transformación Angular de Bliss.....21

Figura 7. Porcentaje de germinación total según los tratamientos y edades de las semillas en valores porcentuales (promedio ± E.E.). 24

Figura 8. Evolución en el tiempo del porcentaje de germinación en valores porcentuales (promedio) según los tratamientos y edades de las semillas. 25

Figura 9. Tiempo Medio de Germinación (TMG) según los tratamientos y edades de las semillas (promedio ± E.E.). 26

Figura 10. Índice de Velocidad de Germinación (IVG) según los tratamientos y edades de las semillas (promedio ± E.E.). 27

Figura 11. Germinación de semillas de C. pedunculata. **A.** Semilla germinada y desarrollada en plántula a 4X. **B.** Semilla no germinada a 4X. 27

Figura 12. Coloración de embriones de Ciliosemina pedunculata como resultado de la prueba de viabilidad con Tetrazolium. **A.** Embrión teñido de rosado a 40X. **B.** Embrión incoloro a 40X. 28

Figura 13. Corte transversal de semilla de Ciliosemina pedunculata teñida con safranina a 400X. **TES:** Testa, **CU:** Cutina, **EPD:** Epidermis, **END:** Endospermo de reserva y **EM:** Embrión.....29

Figura 14. Prueba con el reactivo de Lugol de la semilla de Ciliosemina pedunculata. **A.** Tinción positiva a almidón en el endospermo (100 X). **B.** Gránulos de almidón teñidos de azul dentro del endospermo (400 X).....30

Figura 15. Fruto de Ciliosemina pedunculata con sus valvas abiertas. **A.** Tres cápsulas abiertas. **B.** Una cápsula abierta mostrando un tabique al cuál las semillas están adheridas. **C.** Tabique con semillas de C. pedunculata. 31

Figura 16. Semilla y embrión de C. pedunculata. **A.** Semilla a 40X. **B.** Tricomas de las alas de la semilla a 100X. **C.** Endospermo cubriendo al embrión a 100X. **D.** Embrión espatulado con sus dos cotiledones a 400X.....32

Figura 17. Proceso de crecimiento in vitro de una plántula de Ciliosemina pedunculata. **A.** Embrión germinado a los 6 días. **B.** Plántula a los 12 días. **C.** Plántula a los 24 días. **D.** Plántula a los 78 días. **E.** Plántula de C. pedunculata en tierra a los 60 días. 33

RESUMEN

Ciliosemina pedunculata (H. Karst) A. Antonelli fue una de las especies que se utilizó para combatir la malaria en épocas precolombinas por los nativos sudamericanos debido a los alcaloides Quinina, Quinidina y Cinchonina presentes en su corteza y hojas. Pertenece a la familia Rubiaceae, es conocida como “Cascarilla” y se distribuye en la selva amazónica de Sudamérica en Brasil, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela. También pertenece a la tribu *Cinchonae*, junto a *Cinchona*. Con el fin de obtener sus propiedades se pela la corteza de sus troncos, se deja secar al sol y posteriormente se pulveriza para su comercio. Esta práctica de cosecha es muy destructiva. Por otro lado, la literatura encontrada se enfoca en el estudio de la fitoquímica y filogenética de *Ciliosemina*, es por eso que esta investigación se orienta a conocer la morfo fisiología de esta especie y utilizar esa información para poder propagarla, para así contribuir en la protección y conservación de la especie debido a su importancia económica y extracción insostenible. Se testearon dos tratamientos para su germinación con semillas de 266 y 396 días de edad (de almacenamiento), encontrándose que agua destilada es suficiente para que germinen. Asimismo, se observó que las semillas de 266 días tuvieron mayor porcentaje de germinación que las de 396 días. Por otro lado, la prueba de Tetrazolium indicó una viabilidad del 2.5% para semillas de 595 días de edad, esto indica que hay una reducción de la viabilidad a medida que transcurre el tiempo. También se determinó que las semillas manifiestan un comportamiento recalcitrante, por lo mismo de la pérdida de viabilidad y presentarían dormancia porque no germinan del todo a pesar de tener las condiciones ambientales necesarias para hacerlo. Las semillas dieron positivo al reactivo de Lugol, demostrando ser farináceas, también se encontró que pueden germinar bajo luz. Por último, la dispersión de sus semillas es aérea por la presencia de epispermo membranoso alado.

Palabras clave: *Ciliosemina pedunculata*, Cascarilla, introducción *in vitro*, germinación, histología, morfología, Prueba de viabilidad.

ABSTRACT

Ciliosemina pedunculata (H. Karst) A. Antonelli was one of the species used to fight malaria in pre-Columbian times by South American natives due to the presence of alkaloids Quinine, Quinidine, and Cinchonine in its bark and leaves. It belongs to the Rubiaceae family, known as “Cascarilla”, it is distributed in the Amazon Forest in Brazil, Peru, Ecuador, Colombia, and Venezuela. It also belongs to the Cinchoneae tribe, with *Cinchona.* In order to obtain its properties, the bark is peeled, dried under the Sun, and pulverized for its trade. This harvest practice is very destructive. On the other hand, the literature on this species is focused on its phytochemistry and phylogenetics, therefore this investigation aims to know its morphophysiology, and use that information to propagate *C. pedunculata* so it can be protected and conservated given its economic importance and unsustainable extraction. Two treatments were tested with 266 and 396 days-old seeds (storage time), resulting in distilled water be enough to germinate them. In addition, the 266-days-old seeds had more germination than the 396-days-old seeds. The Tetrazolium test indicated a 2.5% of viability on 595-days-old seeds, this indicates that there is a reduction in the viability as time passes. Also, it was determined that the seeds behave as recalcitrant due to the loss of viability and they have dormancy because not all of them germinate even when they have the environmental conditions to do so. The seeds were positive for Lugol reactive, showing to be farinaceous, and it was found that they can germinate under light. When the seeds were examined, it was observed that not all of them possessed embryos. Finally, the seed dispersion is aerial because of the presence of winged episperm.

Keywords: *Ciliosemina pedunculata*, Cascarilla*, in vitro* introduction, germination, histology, morphology, Viability Test.

1. INTRODUCCIÓN

La corteza presente en los árboles de los géneros *Cinchona*, *Remijia* y *Ladenbergia* fue utilizada para combatir la fiebre en épocas precolombinas por los nativos sudamericanos (García Barriga, 1992). Ésta se caracteriza por la presencia de alcaloides, entre los más importantes están Quinina, Quinidina, Cinchonina y Cinchonidina, aunque su propiedad febrífuga se debe a las dos primeras (Wijnsma y Verpoorte, 1988; Kacprzak, 2013). Además, se empleaba como antimalárico, acelerante del parto, para los catarros del estómago, tónico y eupéptico (García Barriga, 1992).

Entre las especies utilizadas para tratar síntomas de la malaria, se encuentra a *Remijia peruviana* Standl. (Díaz et al., 2004), cuyo nombre científico actual es *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst.) A. Antonelli (Andersson y Antonelli, 2005), es una dicotiledónea de la familia *Rubiaceae* conocida como “Cascarilla” (Ruiz-Mesía et al., 2005). En el 2006, Kvist comprobó la efectividad antimalárica de *C. pedunculata* inhibiendo *in vitro* a *Plasmodium* utilizando extracto de su corteza. Se distribuye en la selva amazónica de Sudamérica en Brasil, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela (Andersson y Antonelli, 2005).

La literatura científica que se tiene de esta especie es escasa, la mayoría de estudios se enfocan en la fitoquímica: García (2003) estudió la actividad antipalúdica de 10 especies vegetales entre ellas *C. pedunculata*, Díaz et al. (2004) aisló 5 nuevos alcaloides de sus hojas, mientras que Lastenia Ruiz-Mesía et al. (2005) utilizó la corteza aislando 5 alcaloides y estableció su estructura química, al igual que Vargas-Arana (2011) que analizó cualitativamente sus metabolitos secundarios, además de cuantificar e identificar alcaloides de la corteza. También hay un estudio filogenético de la especie elaborado por Andersson y Antonelli en el 2005. Sin embargo, no hay estudios enfocados en la biología, el tipo de semillas o la morfo fisiología que oriente para poder conservar a esta especie.

Por otro lado, para obtener los alcaloides antimaláricos en *Cinchona* se extrajo la corteza de sus troncos y raíces, paso por un proceso de secado al sol, y finalmente se pulverizó, después de haberla cultivado de 7 a 16 años (Hunter, 1988), procedimiento similar que se realiza con *Ciliosemina*. Esta actividad resulta en una extracción insostenible que trajo como consecuencia la sobre explotación de los árboles de *Cinchona*, reduciendo sus poblaciones naturales llegando a haber varias especies amenazadas de este género (Aguirre y Madsen, 2002 y Romero, 2015). Esto ha traído preocupación en torno a *Cinchona*, más aún cuando las semillas presentan deficiente capacidad de germinación reportado por Acosta (1947), indicando que la edad propicia para germinar las semillas es de 11 a 20 días de edad (tiempo de almacenamiento). Lo cual fue corroborado por Mejía (2014) que encontró que la viabilidad de las semillas de *Cinchona* se ve influenciado por el estadio de madurez, tiempo de almacenamiento y contenido de humedad de las semillas.

En ese sentido, en estos tiempos se ha vuelto imperativo la conservación y protección de *Cinchona*, así como de otras especies que tienen propiedades antimaláricas como *Ciliosemina pedunculata*, utilizando herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* (Espinosa y Ríos, 2014) y el estudio morfo fisiológico de estas. El cultivo de tejidos vegetales (Plant tissue culture) es la técnica de propagación donde se cultivan células vegetales, tejidos, órganos y plántulas en un medio artificial aséptico y bajo condiciones ambientales controladas (Bhojwani y Dantu, 2013). La conservación *in vitro* ayuda a garantizar la continuidad de las especies, reduciendo la probabilidad de su extinción. Está técnica se orienta a la ecosostenibilidad para evitar la explotación de especies endémicas e indígenas (Daley, 2017).

Es por eso que, el objetivo de esta tesis es estudiar la morfo fisiología y germinación *in vitro* de las semillas de *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli

Según el sistema de clasificación Angiosperm Phylogeny Group IV (Chase et al., 2016) *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli se clasifica como:

División:	Angiospermas
Clase:	Eudicotiledóneas
Orden:	Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Familia:	Rubiaceae Juss.
Género:	Ciliosemina Antonelli

En 1859 el botánico alemán H. Karsten describió por primera vez a *C. pedunculata,* denominándola *Cinchona pedunculata* H. Karst. (Anexo 1), el cuál es el basiónimo de esta especie. Karsten la describió como un árbol mediano, con presencia de estípulas interpeciolares, hojas opuestas, coriáceas, pecioladas, lanceoladas o elípticas. Su inflorescencia es cimosa axilar, largamente pedunculadas, corimbiforme, con flores subsésiles, tubo ovalado del cáliz con 5 lóbulos, su corola es hipocraterimorfa, tubo cilíndrico blanco. Presenta 5 estambres insertados por encima del medio del tubo de la corola y anteras lineales. Su ovario es ínfero, bilocular, con numerosos óvulos en cada lóculo y su estilo es corto. Los frutos son cápsulas septicidas, con semillas de margen hialino, continuo y membranoso ciliados, el embrión es carnoso y pequeño. Esta especie fue observada por primera vez en las laderas orientales de la Cordillera de Bogotá.

A lo largo de los años fue descrito por otros científicos, F.A. Flückiger (1883) la denominó *Remijia pedunculata* (H. Karst.) Flück. encontrándola desde el río Magdalena hasta las laderas orientales de las Cordilleras, al sureste de Bogotá. Años más tarde, K. Schumann (Martius, 1889) la llamó *Ladenbergia pedunculata* (H. Karst.) K. Schum. observándola por primera vez al este de Perú, cerca de Tarapoto.

Después, P. Standley (1930) la describió como *Remijia peruviana* Standl. encontrándola en Iquitos, cerca al río Marañón, en Tarapoto y Nauta, a la entrada de Ucayali. No fue hasta el 2005 que Andersson y Antonelli realizaron un árbol filogenético de 55 especies de la Tribu Cinchoneae, donde descubrieron que *Remijia pedunculata* no se agrupaba con otras *Remijia*, ni tampoco pertenecía a *Cinchona* puesto que no presentaba los márgenes vellosos en los lóbulos de la corola, característica única de este género. Añadiendo que no pertenece a *Ladenbergia* porque las semillas de esta son grandes y presenta inflorescencia terminal, a diferencia de la inflorescencia lateral de *R. pedunculata*. Además, existen dos características únicas de *R. pedunculata*, la inflorescencia corimbosa y la semilla con márgenes ciliados a fimbriados. Es por eso que se decidió crear un nuevo género, por lo que *R. pedunculata* fue catalogado como *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst.) A. Antonelli, el cual es el nombre científico actual de la especie, mientras que los otros nombres son sus sinónimos.

Ahora bien, esta especie se distribuye en el noreste de Sudamérica, en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. En nuestro país se encuentra en las regiones de Loreto, San Martín y Ucayali (Antonelli y Andersson, 2005), lo que vendría a ser el Bosque Tropical Amazónico o Selva Baja (Brack y Mendiola, 2004) por debajo de los 800 m.s.n.m.

Los estudios en torno a esta especie han sido enfocados en sus propiedades farmacológicas y sus estructuras químicas, García (2003) encontró que el extracto hidroalcohólico de *C. pedunculata* mostró actividad antimalárica. Díaz et al. (2004) encontró 5 nuevos alcaloides en sus hojas: Remijinina, Epiremijinina, 5-acetil-apocinchonamina, N-acetil-deoxicinchonicinol y Cinchonicinol, además de volver a encontrar Quinamina, Conquinamina, Cinchonina y Quinidina. Posteriormente, Ruíz-Mesía et al. (2005) aisló de la corteza 2 nuevos alcaloides: Acetilcupreína y N-Etil Quinina, y las ya mencionadas Quinina, Cupreína y Cinchonina. En el 2006 Kvist et al. evidenció inhibición *in vitro* de *Plasmodium* utilizando extracto etanólico de la corteza.

Por último, Vargas-Arana et al. (2011) encontró presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides y taninos en la corteza, asimismo, aisló e identificó tres nuevos alcaloides: Quinina acetato, Quinina alcohol y N-Etil Quinina, y observó los mencionados Quinina y Cinchonina.

Se reportó que para obtener 14.5 mg de Quinina acetato, 10 mg de Cinchonina y 5.2 mg de N-Etil quinina se requirió 1.55 Kg de corteza seca de *C. pedunculata* (Vargas et al. 2011), por lo que se requieren varios kilogramos de corteza seca para obtener los alcaloides, lo que pone a esta especie en un potencial peligro si es que no se toman medidas de conservación y protección con la finalidad de tener un uso sostenible de este recurso.

De manera similar, el método de extracción utilizado para obtener los alcaloides de la corteza de *Cinchona* es pelarla, secarla al sol, pulverizarla y empacarla, después de 7 a 16 años de crecimiento (Hunter, 1988).

Cabe resaltar que en el 1947 Acosta encontró en varias de sus excursiones que la explotación de la *Cinchona* "Cascarilla serrana" se realizaba de manera devastadora, al tumbar los árboles y descortezar los troncos y raíces sin aprovechar la corteza de las ramas. De esta manera se arruina y mata completamente al árbol sin posibilidad de que salgan nuevos brotes. Expresando su preocupación sobre la posible reducción de cascarillales silvestres.

Agregando a lo anterior, otro punto de preocupación es la viabilidad de las semillas de *Cinchona*, Acosta (1947) indicó que cuando las semillas están recién colectadas presentan buena germinación, de preferencia de 11 a 20 días, sin embargo, aquellas semillas almacenadas por un periodo prolongado o que se desconoce su edad, la expectativa de que germinen es reducida.

Así pues, los estudios sobre *Ciliosemina pedunculata* se enfocan en sus propiedades febrífugas contra la malaria e identificación de sus componentes químicos (García (2003), Díaz et al. (2004), Ruíz-Mesía et al. (2005), Kvist (2006) y Vargas-Arana et al. (2011)), faltando estudios histológicos, morfológicos, fisiológicos, genéticos, etc.

2.2. Introducción a *in vitro*

La implementación de estrategias *in vitro*, *in situ* y *ex situ* están orientadas a la sostenibilidad y conservación, y así prevenir la explotación de especies endémicas o nativas. La conservación *in vitro* asegura la continuidad de las especies y reduce la probabilidad de su extinción (Daley, 2017).

Entonces el empleo de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* es una de las opciones para poder reproducir especies vegetales (Espinoza y Ríos, 2014).

El cultivo de tejidos vegetales es la técnica de propagación donde se cultivan células vegetales, tejidos, órganos y plántulas en un medio artificial bajo condiciones asépticas y variables ambientales controladas. Se busca optimizar los criterios físicos, químicos, biológicos y ambientales para alcanzar la tasa de crecimiento esperada. Esto se debe a la capacidad de las plantas de generar plantas completas a partir de células diferenciadas, como el cigoto, denominada totipotencia celular (Bhojwani y Dantu, 2013).

Está técnica tiene varias ventajas como la producción en masa de plantas en cualquier época del año, el espacio reducido que utilizan, producción de plantas fitomejoradas, obtención de plantas libres de plagas, virus, contaminación y enfermedades, elaboración de semillas sintéticas, conservación de germoplasma, germinación de semillas, entre otras (INTAGRI, 2024).

Por otra parte, hay compuestos químicos que están envueltos en la regulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas denominada hormonas vegetales o fitohormonas (Bewley et., 2013).

Hay 6 clases principales de estas hormonas: Acido abscísico, giberelinas, auxinas, citoquininas, etileno y brasinoesteroides. Para este estudio, nos enfocaremos en las giberelinas, ellas cumplen funciones importantes tales como la estimulación de la elongación del tallo promoviendo la división y elongación celular, la interrupción de la dormancia fisiológica para inducir la germinación, la estimulación de la producción de la alfa-amilasa para la movilización de reservas de almidón y el desarrollo del fruto partenocárpico (Bewley et., 2013).

Actualmente no se cuenta con estudios de cultivos de tejidos en *C. pedunculata*, sin embargo, si hay estudios de un género cercano a ella, *Cinchona*. Esta ha tenido varios intentos de propagación utilizando hormonas para su germinación, proliferación de brotes y formación de callos.

Para el caso de la propagación *in vitro* de *C. officinalis* se tienen varios ejemplos: Lima et al. (2018) y Moreno et al. (2019) obtuvieron 74.44% de germinación aplicando 1 mg/L de AG_3 (ácido giberélico) en *Cinchona officinalis* L. en comparación del 50.0% sin ninguna hormona.

2.3. Maduración y germinación de semillas

La maduración de semillas es un proceso que empieza con el óvulo, este atraviesa varias etapas continuas que lo llevan a madurar y convertirse en una semilla en un sentido estricto. Estas etapas son: 1) Histodiferenciación (o morfogénesis inicial), empieza con la fertilización y es seguida por una rápida división celular, resultando en la formación del eje embrionario y tejidos. 2) Maduración o etapa de expansión de la semilla, ocurre un incremento de la masa de la semilla, sucede la expansión celular y los tejidos desarrollados anteriormente empiezan a almacenar reservas. 3) Desecación, se caracteriza por la reducción general del metabolismo y la pérdida de agua. Una vez la semilla se seca, ésta pasa a un estado de reposo y a veces, las semillas pueden presentar dormancia (Kermode et al., 1986) (Figura 1).

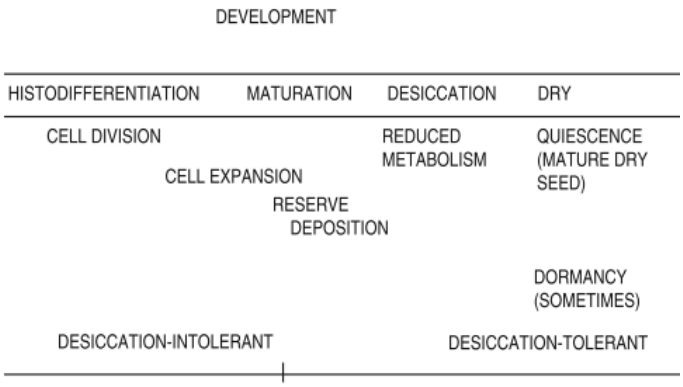


Figura 1. Resumen de las etapas asociadas al desarrollo de maduración de las semillas. 1. Histodiferenciación, 2. Maduración y 3. Desecación. Elaborado por Kermode et al., 1986.

Por otra parte, la germinación es un proceso fisiológico que inicia cuando la semilla absorbe agua (imbibición) y concluye cuando el eje embrionario, ya sea radícula u otro órgano, atraviesa la estructura, que puede ser endospermo, perispermo, testa o pericarpo, que lo rodea (emergencia) (Bewley et al., 2013).

La germinación se divide en fases: 1) Imbibición de agua o hidratación, es un proceso físico donde la semilla absorbe intensamente agua por imbibición causando hinchamiento y ruptura de la testa. 2) Germinación propiamente dicha, la absorción de agua disminuye y se incrementa la actividad metabólica con una importante transcripción de nuevos genes, y la radícula emerge de la cubierta que rodea al embrión. 3) Crecimiento de la radícula, se reestablece la absorción de agua y se consumen las reservas para que la nueva plántula crezca (Bewley et al., 2013).

Esta capacidad de germinar consta de dos resultados, que germine o no lo haga. La germinabilidad, se convierte generalmente en un atributo cuantitativo, expresado la mayoría de veces en porcentaje, también se puede usar proporciones (Ranal y Santana, 2006).

Ahora bien, para que se dé la germinación las semillas deben encontrarse en las condiciones ambientales adecuadas, como: humedad, temperatura y concentración de oxígeno. Sin embargo, hay algunas semillas que a pesar de que se les presenten estas condiciones no germinan, a esto se le conoce como dormancia (Pérez y Pita, 1999).

La presencia de dormancia puede resultar en una estimación baja de la calidad de la semilla, sugiriendo un incorrecto y reducido potencial de germinación de las semillas. Se puede sospechar de dormancia cuando hay una falta de crecimiento de hongos o la ausencia de descomposición asociada a una baja tasa de germinación, además de una irregular tasa de germinación entre lotes de semillas. Entonces para poder conocer el verdadero porcentaje de semillas viables en un lote hay que sumar el porcentaje de semillas germinadas y el porcentaje de semillas que presentan dormancia (Elías et al., 2012).

Entre los tipos de dormancia se pueden establecer dos categorías principales: 1) Dormancia impuesta por las cubiertas seminales, esto se debe a mecanismos físicos o fisiológicos que radican en las cubiertas seminales, como: interferencia con la captación de agua, interferencia con el intercambio gaseoso, presencia de inhibidores en la germinación de cubiertas seminales, interferencia con la salida de inhibidores de la germinación y restricciones mecánicas. 2) Dormancia embrionaria, donde el control de la dormancia reside en el propio embrión, como: embriones inmaduros y la presencia de inhibidores en el embrión (Pérez y Pita, 1999).

Según el tipo de desecación se pueden clasificar a las semillas como ortodoxas y recalcitrantes. Las semillas ortodoxas son capaces de tolerar la pérdida de agua hasta en un 5% de contenido de humedad (peso en húmedo), en consecuencia, pueden ser almacenadas por largos intervalos de tiempo. De manera opuesta, las semillas recalcitrantes no pueden resistir la desecación, por ende, presentan intervalos más cortos de almacenamiento (Roberts, 1973).

Por otro lado, hay otra manera de clasificar a las semillas según su sensibilidad a la luz, llamada fotoblastismo. Aquellas semillas que requieren luz para germinar se denominan fotoblásticas positivas, las semillas que no requieren luz se llaman fotoblásticas negativas y, por último, las semillas no fotoblásticas son las que pueden germinar con o sin luz (Vázquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1993).

2.4. Pruebas de vigor

Como se había mencionado antes, la prueba de germinación se realiza bajo óptimas condiciones, lo cual hace sobreestimar la producción de campo ya que solo te indica si las semillas están vivas más no sobre la calidad ni atributos de estas. Lo que dio como resultado a un nuevo término: vigor, la Asociación de Analistas Oficiales de Semilla (AOSA) lo define como aquellas propiedades de las semillas que determinan su potencial para una rápida y uniforme emergencia, así como desarrollo en una plántula normal bajo un amplio rango de condiciones de campo. La información que se puede obtener de estas pruebas es sobre aspectos físicos, fisiológicos y bioquímicos (Elías et al., 2012).

Entre las pruebas de vigor están:

- Tiempo Medio de Germinación (TMG)

  También conocido como Mean Germination Time (MGT) por sus siglas en inglés o como Tiempo Promedio de Germinación (TPG), fue propuesto por Ellis y Roberts (1980). Se calcula como la sumatoria de la multiplicación del número de semillas germinadas (N_i) en el día contabilizado (T_i) multiplicado por el número de días después de la siembra cuando se contabiliza la germinación (T_i), todo eso dividido entre el número de semillas geminadas en total ($\sum N_i$) (Fig. 2). Los datos se colectan desde el primer día de germinación hasta el último.

$$TMG = \frac{\sum \mathrm{Ni} * \mathrm{Ti}}{\sum \mathrm{Ni}}$$

Figura 2. Fórmula del Tiempo Medio de Germinación propuesta por Ellis y Roberts (1980).

- Índice de Velocidad de Germinación (IVG)

La fórmula fue desarrollada por Maguire (1962), es una de las más conocidas para determinar la velocidad de germinación. También se le conoce como Speed of Germination Index (IGV) por sus siglas en inglés. Se calcula como la sumatoria del número de semillas germinadas dividida entre el número de días cuando se contabiliza la germinación (Fig. 3). Los datos se colectan desde el primer día de germinación hasta el último.

$$IVG = \frac{N° \text{ de semillas germinadas en el } 1er \text{ conteo}}{\text{días del } 1er \text{ conteo}} + \frac{N° \text{ de semillas germinadas hasta el } 2do \text{ conteo}}{\text{días del } 2do \text{ conteo}} + \cdots + \frac{N° \text{ de semillas germinadas hasta el último conteo}}{\text{días del último conteo}}$$

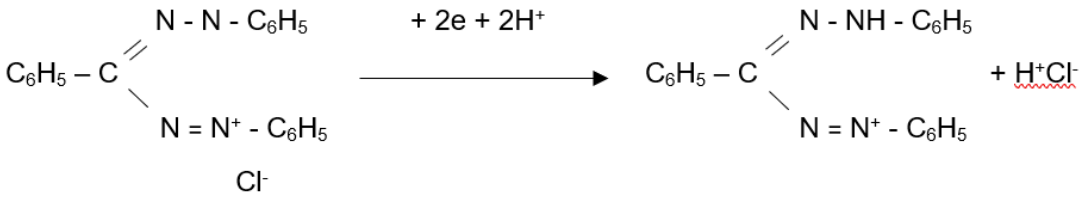
Figura 3. Fórmula del Índice de Velocidad de Germinación propuesta por Maguire (1962).

2.5. Viabilidad de semillas con Tetrazolium

La viabilidad de semillas se entiende como la capacidad de las semillas de germinar bajo condiciones favorables y en ausencia de dormancia debido a que las semillas contienen las estructuras y sustancias necesarias como enzimas para llevar a cabo ese proceso (Elías et al., 2012).

En ese sentido, la industria de las semillas tiene una gran demanda de conocer la calidad de las semillas con las que trabaja en el menor tiempo posible, lo cual se puede lograr con la prueba de Tetrazolium, que brinda una veloz determinación de la viabilidad de las semillas. Este método fue desarrollado por el alemán George Lakon en su obra “Prueba topográfica de Tetrazolium” en 1942 (Elías et al., 2012).

Las semillas viables presentan tejido vivo, y este realiza el proceso de respiración. Durante este proceso las enzimas deshidrogenasas liberan iones de hidrógeno, los cuales son aceptados por la solución incolora 2,3,5 cloruro trifeniltetrazolio y se reduce formando el compuesto rojo 1,3,5 trifenil Formazan (Figura 2). Entonces los tejidos vivos de las semillas viables se teñirán de rojo cuando sean sumergidos en Tetrazolium (Patil y Dadlani, 1985 y Elías et al., 2012).



2,3,5 cloruro trifineltetrazolio (Incoloro)

1,3,5 trifenil Formazan (Rojo)

Figura 4. Reacción química de reducción del Tetrazolium a Formazan (Elías et al., 2012).

La prueba de Tetrazolium es una buena alternativa para ver la viabilidad de las semillas en comparación del test de Germinación estándar, aunque requiere de entrenamiento para poder interpretar los resultados de la tinción, también se precisa de conocimientos básicos sobre las estructuras de las semillas y plántulas (Elías et al., 2012).

Cabe mencionar que si las semillas no germinan es importante que el analista sepa determinar si se debe a una falta de viabilidad o si es por la presencia de dormancia ya que la prueba no hace distinción entre semillas que presentan o no dormancia. Entre las razones para que las semillas no germinen se pueden encontrar a que están muertas, vacías o si a que presentan dormancia (Elías et al., 2012).

Para poder realizar la prueba hay que seguir las siguientes etapas: 1) Hidratación: sumergir las semillas en agua para activar las enzimas del proceso de respiración.

2) Corte o perforación: realizar cortes o perforaciones en la testa de las semillas para que el colorante alcance al embrión. 3) Tinción: embeber la semilla en Tetrazolium (0.1-1.0%) en un tiempo especificado por el Manual de Tetrazolium de la Asociación de Analistas Oficiales de Semilla (AOSA). 4) Evaluación: dependiendo de la intensidad de la tinción y los patrones en los tejidos se interpretarán los resultados (Elías y Garay, 2004).

Con respecto a la viabilidad de semillas con Tetrazolium de *Ciliosemina pedunculata*, no se encuentran estudios de ello, no obstante, de *Cinchona* sí hay. Mejía (2014) realizó experimentos de viabilidad en el 2012 y encontró que *C. officinalis* poseía 35% y 10% de viabilidad en dos diferentes lotes de semillas, las cuales fueron colectadas en el 2005. Además, observó que *C. pubescens* Vahl., *C. nitida* Ruiz & Pav. y *C. krauseana* presentan 20%, 15% y 16.67% de viabilidad respectivamente, las semillas fueron colectadas en el 2011. Atribuyó las diferencias de viabilidad a cómo estaban almacenadas las semillas, las del 2005 se encontraban en bolsas de aluminio herméticamente selladas y en refrigeración.

2.6. Histología de semillas

"La semilla es la unidad básica de reproducción de una planta con flores, es capaz de desarrollar una nueva planta" (Oxford Languages, 2024). "Es una parte del fruto de las plantas que pertenecen a las fanerógamas, esta contiene al embrión de una futura planta que está protegida por la testa" (RAE, 2024).

Sus partes son: el embrión, el endospermo y la cubierta seminal (NYBG, 2021). La cubierta o epispermo se divide en testa y tegmen (Megía et al., 2023).

Por otro lado, para poder visualizar y diferenciar los tejidos de las plantas en los cortes histológicos se necesitan colorantes.

Los colorantes son compuestos que se pueden unir a sustratos por lo que pueden colorear componentes de los tejidos o microorganismos.

Habitualmente presentan dos partes, un cromóforo que es un conjunto de átomos capaz de absorber la luz, por lo que aporta el color al tejido, y un auxocromo que modifica la longitud de onda de máxima absorción en el espectro UV, infrarrojo y visible, y permite la unión del colorante a los tejidos (Kiernan, 2015).

Los colorantes se dividen en básicos, ácidos, mordantes y solventes. Los básicos tiñen los núcleos y los principales compuestos aniónicos en el citoplasma y estructuras extracelulares. Los cationes se unen por fuerzas electrostáticas a los grupos aniónicos. La safranina es un colorante catiónico rojo usado en plantas para teñir lignina y núcleos (Kiernan, 2015). También tiñe paredes cutinizadas, lignificadas y suberificadas (D' Ambrogio, 1986 y Pérez et al., 2016).

Otra manera de poder estudiar a los tejidos vegetales es mediante el reactivo de Lugol, puede teñir núcleos de células y hacerlo más visible, también se utiliza como indicador de la presencia de almidón: amilosa y amilopectina, almidón vegetal y glucógeno animal. Esto se debe a que el almidón absorbe al yodo produciendo una coloración intensa azul (Martín-Sánchez et al., 2013).

Para finalizar, *C. pedunculata* tampoco presenta estudios histológicos ni morfológicos de sus frutos ni semillas. No obstante, sí hay estudios en el género cercano de *Cinchona*. Romero-Saritama (2015) describe a los frutos de *Cinchona officinalis* como cápsulas septicidas secas dehiscentes con varias semillas. Presenta ranuras carpelares desde la base hasta el ápice originando 2 valvas o lóculos.

Sus semillas son de forma fusiforme con testa blanda de superficie membranosa y alada que terminan en pequeños tricomas de color café amarillento. Hay presencia de endospermo, y el embrión es espatulado y pequeño (Romero-Saritama, 2015).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Las semillas de *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli. presentan características fisiológicas y anatómicas, el estudio morfo fisiológico de estas permitirán seleccionar el medio adecuado para su germinación en condiciones *in vitro* y así se poder conservar la especie.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

- Contribuir a generar información sobre la morfo fisiología y germinación *in vitro* de las semillas de *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli

3.2.2. Objetivos específicos

- Identificar el medio adecuado para introducir a condiciones *in vitro* a las semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli.
- Conocer sobre la germinabilidad, el Tiempo Medio de Germinación de las semillas y el Índice de Velocidad de Germinación de las semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli. en condiciones *in vitro*.
- Explorar la viabilidad de las semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli. con Tetrazolium.
- Caracterizar las semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli. en función a su tolerancia a la desecación.
- Observar la histología y morfología de las semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Material biológico

Se trabajó con semillas de *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli las cuales fueron colectadas en el Arboretum el Huayo del Centro de Investigación y Enseñanza Forestal – CIEFOR, Puerto Almendra, ubicado en el Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Región de Loreto (Figura 3). Coordenadas: 3º49'49''S 73º22'27'' W a 108 m.s.n.m. Se realizaron dos colectas, la primera fue en septiembre del 2021 (Lote 1) y la segunda fue en septiembre del 2022 (Lote 2).



Figura 5. Ubicación de colecta en un mapa satelital de Google Earth.

Para realizar está colecta se solicitó un permiso a la Gerencia Regional de Desarrollo Forestal y Fauna Silvestre del Gobierno Regional de Loreto, la cual se nos dio mediante la Resolución Gerencial Regional N°078-2021 (Anexo 2).

4.1.2. Material de laboratorio y campo

Reactivos

- Para el medio de cultivo: Medio basal Murashige & Skoog (MS) Salt Mixture, agua destilada, sacarosa, Ácido giberélico (AG_3), mio-inositol, Clorhidrato de Tiamina, Carbón activado y Agar agar; para el ajuste de pH: Ácido clorhídrico (HCl), Hidróxido de Sodio (NAOH), Kit de buffer; para la desinfección: alcohol etílico de 70° y 96°, Hipoclorito de sodio al 50% (NaOCl); para la viabilidad de las semillas: Tetrazolium (2,3,5 cloruro trifeniltetrazolio); para la coloración de tejidos: safranina y lugol.

Material de vidrio

- Bagueta de vidrio, beaker de 250 y 500 ml, láminas y laminillas, pipetas de 10 ml, placas Petri, probeta de 100 ml, tubos de ensayo, vasos precipitados de 100 ml, 500 ml, 1 L y 2 L.

Equipos

- Balanza analítica (precisión 0.0001 g), balanza digital (precisión 0.01g), cámara de flujo laminar, cámara de germinación con fotoperiodo y temperatura ajustable, estereoscopio, microscopio, olla a presión, pipeta y micropipeta, potenciómetro y refrigeradora.

Material de campo

- Bolsas ziploc, cinta métrica, espátula, libreta de campo, marcadores, pala, tijera telescópica y papel de aluminio.

Material de escritorio

- Cuaderno de apuntes, lapiceros, marcadores, memoria externa y tijera.

Material de laboratorio

- Algodón, encendedor, hojas de bisturí, mango de bisturí, mechero de alcohol, pabilo, paños de limpieza, papel de aluminio, papel Kraft, papel toalla, Parafilm, pinzas y stickers.

4.2. Métodos

4.2.1. Métodos de colecta en campo

Las semillas se obtuvieron a partir de los frutos secos presentes en las ramas reproductoras, que fueron cortadas con ayuda de una tijera telescópica, de 3 árboles de *Ciliosemina pedunculata*, que se encontraban en un área de 5 m^2.

Se realizaron dos colectas: La primera colecta fue realizada el 27 de septiembre del 2021 (lote 1), las semillas fueron almacenadas en un envase de vidrio y guardados en la refrigeradora a 4°C. La segunda colecta fue realizada el 23 de septiembre del 2022 (lote 2), las semillas fueron almacenadas en papel aluminio dentro de una bolsa de ziploc para evitar la pérdida de humedad. Fueron guardadas dentro de la refrigeradora a 4°C.

Las ramas vegetativas y reproductoras de la primera colecta (Lote 1) fueron llevados al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su identificación y certificación. La cual fue realizada por el Mg. Hamilton Beltrán Santiago el 09 de febrero del 2022 (Anexo 3).

4.2.2. Germinación *in vitro* de semillas de *C. pedunculata (H. Karst) A*. Antonelli

Para evaluar la germinación *in vitro* de las semillas de *C. pedunculata* se utilizaron las colectadas del Arboretum el Huayo del CIEFOR en la provincia de Maynas, Iquitos. Las semillas del Lote 2 fueron empleadas en este experimento. Primero las semillas fueron preseleccionadas antes de ser sembradas, discriminando aquellas que carecían de embrión, ya que se observó que no todas las semillas presentaban embrión (Anexo 4). Cabe resaltar que en el test de germinación se emplearon 30 semillas por tratamiento, distribuido en 10 placas (3 semillas por placa), cada placa es una réplica.

Segundo, se prepararon los dos medios líquidos, y agregaron los aditivos correspondientes a cada tratamiento (Medio basal Murashige & Skoog (MS) Salt Mixture (0.43 g/L) y Ácido giberélico (AG_3) a 1.0 mg/L). Se agregó el medio a las placas, estás fueron rotuladas y llevadas a la olla a presión para su esterilización.

Posteriormente, las semillas fueron desinfectadas con etanol 70° durante un minuto, se enjuagaron 3 veces en agua destilada estéril, luego fueron sumergidas en hipoclorito de sodio al 50% por 5 min, se enjuagaron 3 veces en agua destilada estéril en una cámara de flujo.

Las semillas fueron disectadas con el bisturí y con ayuda de un estereoscopio, antes de ser sembradas en las placas, quitando el epispermo y cortando el endospermo para permitir el ingreso del medio. Luego de sembrar las semillas se sellaron las placas. Esto se desarrolló dentro de una cámara de flujo.

Finalmente, las placas Petri fueron llevadas a la cámara de germinación e incubadas a 23 ± 2 °C de temperatura y a 12 horas luz / 12 horas oscuridad.

La intensidad lumínica fue de 2500 lx (30-40 µmol/m^2/s según fabricante). El pH del medio fue de 5.8 y se ajustó usando ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH).

Se trabajaron 2 tratamientos líquidos: el primer tratamiento, sólo agua destilada (control negativo) y el segundo, agua destilada más Medio basal Murashige & Skoog (MS) Salt Mixture (0.43 g/L) más Ácido giberélico (AG_3) 1.0 mg/L de concentración.

La Unidad experimental es cada placa con su respectivo medio líquido junto a las semillas. El experimento se repitió dos veces, el primero con semillas de 266 días y el segundo con 396 días de edad (de almacenamiento). Las evaluaciones fueron realizadas cada 5 días por un periodo de 40 días.

Para la tabulación de datos del porcentaje de germinación se utilizó el programa de Excel (Anexo 18), la tabla muestra los siguientes datos: la edad de las semillas (tiempo de almacenadas), los días después de la siembra (DDS), el número de réplica de placa, los tratamientos (H_2O y H_2O + MS+ AG_3), la cantidad de semillas sembradas, la cantidad de semillas germinadas, el porcentaje de germinación calculado mediante la división de las semillas germinadas entre las sembradas y multiplicado por 100, y la transformación de los datos de porcentaje. Para la tabulación de datos del Tiempo Medio de Germinación (TMG) y el Índice de Velocidad de Germinación (IVG) también se utilizó Excel (Anexo 19), la tabla muestra los datos de edad de las semillas, número de réplica de placa, los tratamientos (H_2O y H_2O + MS+ AG_3) y los datos de TMG e IVG. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) por cada repetición que se realizó, y para el análisis estadístico de los datos se usó el programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2020). Cabe resaltar que algunas semillas fueron dañadas con el bisturí y otras se contaminaron, es por eso que en el conteo final de las semillas no hay 30, sino de 26 a 29.

Para la estadística inferencial se realizó la transformación arcoseno (Wayne, 2002) o también conocida como transformación angular de Bliss (Figura 6) para trabajar los datos de porcentaje de germinación.

$$Y = \operatorname{arcsen} \frac{\sqrt{y}}{100}$$

Donde y es un valor entre 0% y 100%

Figura 6. Fórmula de la Transformación Angular de Bliss.

Se evaluó la normalidad, homogeneidad y análisis de varianza del porcentaje de germinación, el Tiempo Medio de Germinación y el Índice de Velocidad de Germinación.

En cuanto a la cantidad de semillas en los test de germinación, ISTA (2008) indica que 200 semillas es lo recomendable, aunque FAO (2014) recomienda que si no hay suficientes semillas las muestras de 100 semillas pueden ser validas, y para las pequeñas accesiones podrían admitirse 50 semillas.

Es importante resaltar que para poder germinar las semillas de *Ciliosemina* se realizaron experimentos previos, primero se sembró directamente la semilla en un medio *in vitro* sólido, al no observarse germinación se repitió el experimento quitando la testa, tampoco hubo germinación alguna, por lo que se decidió liberar al embrión, a pesar de eso no germinaron las semillas. Por último, se modificó el experimento utilizando un medio *in vitro* líquido, y cuando se liberó el embrión recién se observó germinación.

4.2.3. Prueba de viabilidad de semillas de *C. pedunculata (H. Karst) A.* Antonelli con Tetrazolium

Para la prueba de Tetrazolium primero se hizo una preselección de las semillas bajo el estereoscopio, se verificó que tuvieran embriones (pre selección).

Se realizaron 4 repeticiones con 20 semillas cada una. Se trabajó con semillas del Lote 1, tenían 595 días después de haber sido colectadas.

La prueba se basó en embeber las semillas en agua destilada por 24 horas, luego se realizó un corte al epispermo y se sumergió en Tetrazolium en oscuridad por 24 horas. Posteriormente, bajo el microscopio, se extrajeron las semillas y retiraron los embriones.

Se percibió la coloración del embrión, si estaba teñido de rojo era considerado viable, pero si estaba incoloro, se consideró como no viable (Elías et al., 2012).

Elías et al. (2012) indica que se deben hacer de tres a cuatro réplicas de 100 semillas cada una en la prueba de viabilidad con Tetrazolium, sin embargo, debido a la poca cantidad y disponibilidad de semillas se realizaron cuatro réplicas de 20 semillas cada una.

4.2.4. Histología y morfología de semillas de *C. pedunculata (H. Karst) A*. Antonelli

Se le realizó cortes transversales a una semilla, del Lote 1, y se le añadió safranina para ser visualizadas en el microscopio a 400 X.

Por otro lado, a otra semilla se le retiró totalmente el epispermo liberando el endospermo junto al embrión y se le agregó una gota del reactivo de Lugol para ver su reacción bajo el estereoscopio y microscopio.

Los frutos y semillas del Lote 1 fueron observadas bajo el estereoscopio para poder ser descritas. Además, con una pinza se separó y abrió una cápsula de *C. pedunculata* para observar sus partes y las semillas, las cuales se visualizaron bajo un estereoscopio a 0.8X, al lado de cada cápsula y semilla se colocó una regla para visualizar su tamaño.

5. RESULTADOS

5.1. Germinación *in vitro* de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli

En la germinación se pusieron a prueba dos tratamientos: el primero fue solo con agua destilada y el segundo fue agua destilada más el Medio Murashige y Skoog (MS) y AG_3 al 1.0 mg/L. Las semillas en el primer experimento tenían 266 días y en el segundo, 396 días de haber sido colectadas al momento de ser sembradas.

La prueba de Normalidad (Shapiro-Wilks) y homogeneidad (Levene) para todas las variables indicaron que ninguna cumple con los supuestos de anova, por lo que se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis para analizar las varianzas.

Al analizar la germinabilidad de las semillas de *Ciliosemina pedunculata* se observa que las semillas de 266 días de edad presentan mayor porcentaje de germinación (73.33% y 60.00%) que las de 396 días (21.67% y 10.00%) en ambos tratamientos (Figura 7).

La prueba Kruskal-Wallis y análisis Post-Hoc a nivel de edades entre las semillas de 266 y 396 días para el tratamiento de H_2O dieron un valor de p = 0,007 (Anexo 5) y para el tratamiento de H_2O + MS + AG_3 fue un valor de p= 0,0122 (Anexo 6), indicando una diferencia significativa entre ambas edades.

Por otro lado, la prueba Kruskal-Wallis a nivel de tratamientos entre los tratamientos de H_2O versus H_2O + MS + AG_3 en las semillas de 266 días tuvo un valor p = 0.8101 (Anexo 7) y para las semillas de 396 días de edad el valor p = 0.2117(Anexo 8), evidenciando que no hay diferencia significativa entre los tratamientos.

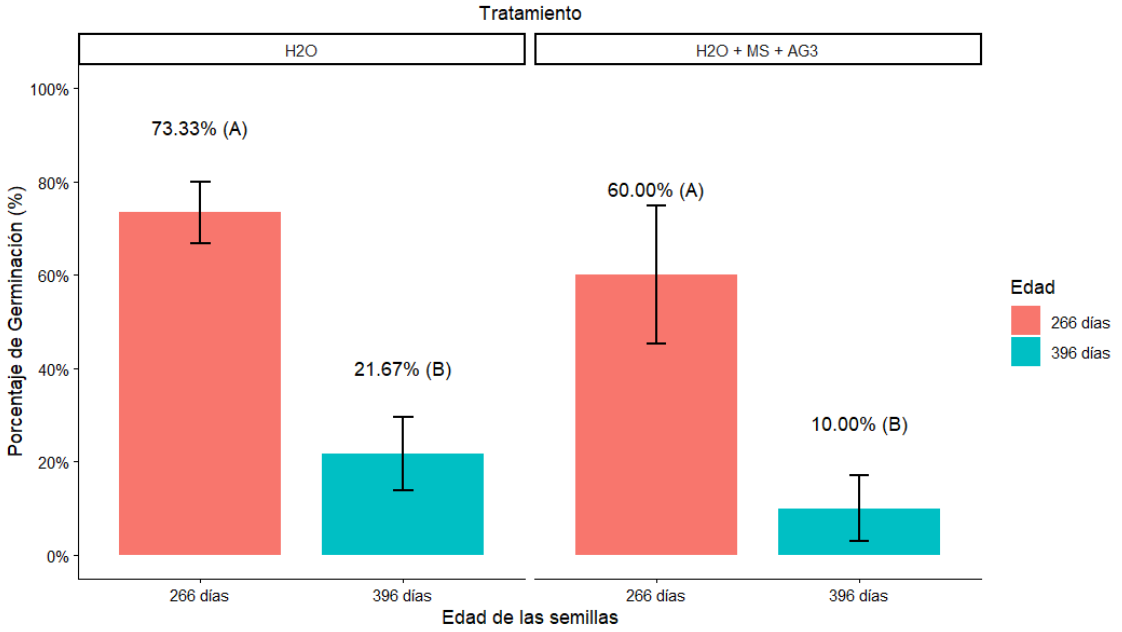


Figura 7. Porcentaje de germinación total según los tratamientos y edades de las semillas en valores porcentuales (promedio ± E.E.).

Además, se analizó el incremento de la germinabilidad a través del tiempo y también se evidencia que hay mayor porcentaje de germinación en las semillas de 266 días en comparación a las de 396 días en ambos tratamientos, desde el inicio de registro de los datos hasta el último día. Igualmente se puede apreciar una germinación exponencial desde el inicio de la siembra hasta el día 25, luego este mantiene hasta el último día de evaluación (Figura 8).

Las pruebas Kruskal-Wallis y análisis Post-Hoc a nivel de edades entre las semillas de 266 versus 396 días para los tratamientos de H_2O y de H_2O + MS + AG_3 obtuvieron un valor p menor a 0.05 cuando se compararon los porcentajes de germinación de cada día de evaluación (DDS) (Anexo 9). Excepto para el día 5 después de siembra entre los tratamientos de H_2O y de H_2O + MS + AG_3 cuyo valor p > a 0.05 (Anexo 10).

Por otro lado, la prueba Kruskal-Wallis a nivel de tratamientos entre los tratamientos H_2O versus H_2O + MS + AG_3 en las semillas de 266 días (Anexo 11) y en las semillas de 396 días de edad (Anexo 12) obtuvieron un valor p > 0.05 para cada día de evaluación (DDS).

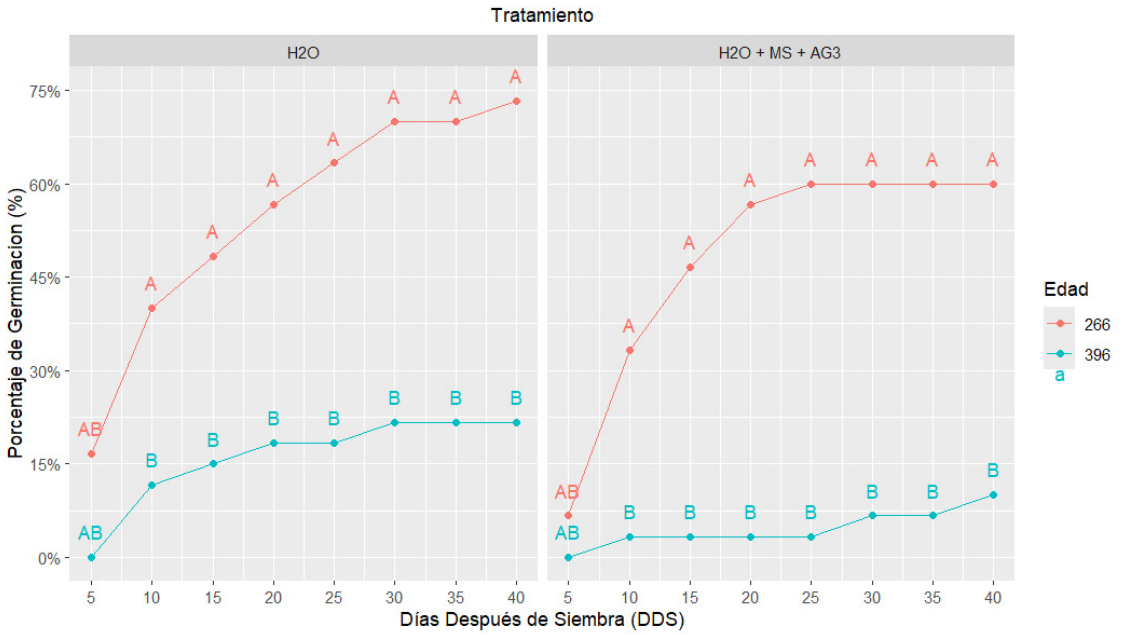


Figura 8. Evolución en el tiempo del porcentaje de germinación en valores porcentuales (promedio) según los tratamientos y edades de las semillas.

Continuando con la evaluación de las semillas, se calculó el Tiempo Medio de Germinación (TMG) donde se observa que las semillas de 266 días de edad germinan a los 15.55 días en el tratamiento H_2O y a los 16.67 días en el de H_2O + MS + AG_3. En cambio, las semillas de 396 días germinan a los 15.75 días para el tratamiento H_2O y para el tratamiento de H_2O + MS + AG_3 germinan ligeramente antes a los 10.67 días (Figura *9*).

La prueba Kruskal-Wallis a nivel de edades indica entre las semillas de 266 y 396 días del tratamiento de H_2O con un valor de p = 0,9999 y del tratamiento de H_2O + MS + AG_3 con un valor de p = 0,1364 (Anexo 13).

Además, la prueba Kruskal-Wallis a nivel de tratamientos entre los tratamientos de H_2O versus H_2O + MS + AG_3 en las semillas de 266 días con un valor de p = 0.5197, y en las semillas de 396 días de edad con un valor de p = 0.3741 (Anexo 14).

Indicando que no hay diferencias entre los tiempos de germinación a nivel de edades ni tratamientos.

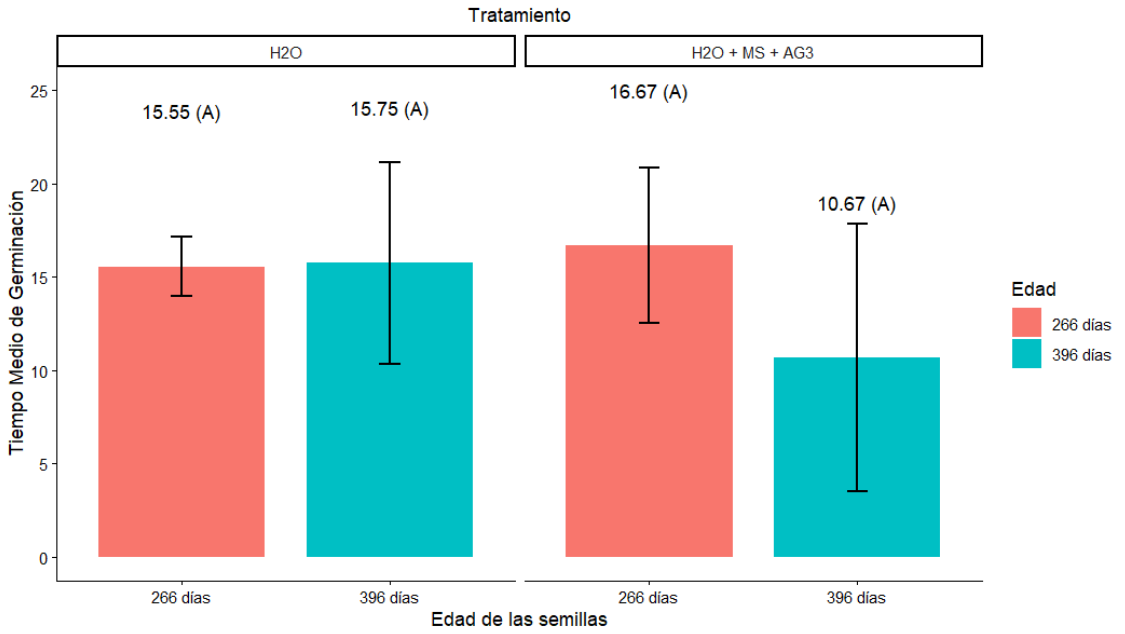


Figura 9. Tiempo Medio de Germinación (TMG) según los tratamientos y edades de las semillas (promedio ± E.E.).

En cuanto al Índice de Velocidad de Germinación se aprecia que las semillas de 266 días para el tratamiento de H_2O tuvieron un índice de 0.64 y para el tratamiento de H_2O + MS + AG_3 fue de 0.55. Las semillas de 396 días tuvieron un índice más bajo a comparación de las semillas de 266 días, para el tratamiento de H_2O fue de 0.15 y para el tratamiento de H_2O + MS + AG_3 fue de 0.04 (Figura 10).

La prueba Kruskal-Wallis y análisis Post-Hoc a nivel de edades entre las semillas de 266 y 396 días del tratamiento de H_2O tuvo un p = 0.0005 y para el tratamiento de H_2O + MS + AG_3 el valor p = 0.0103 (Anexo 15), mostrando diferencia significativa en la velocidad de germinación entre las semillas de 266 y las de 396 días.

Por otro lado, la prueba Kruskal-Wallis a nivel de los tratamientos H_2O versus H_2O + MS + AG_3 en las semillas de 266 días tuvieron un valor de p = 0.8203 y en las semillas de 396 días de edad el valor de p = 0.1412 (Anexo 16), indicando que no hay diferencia significativa entre los tratamientos.

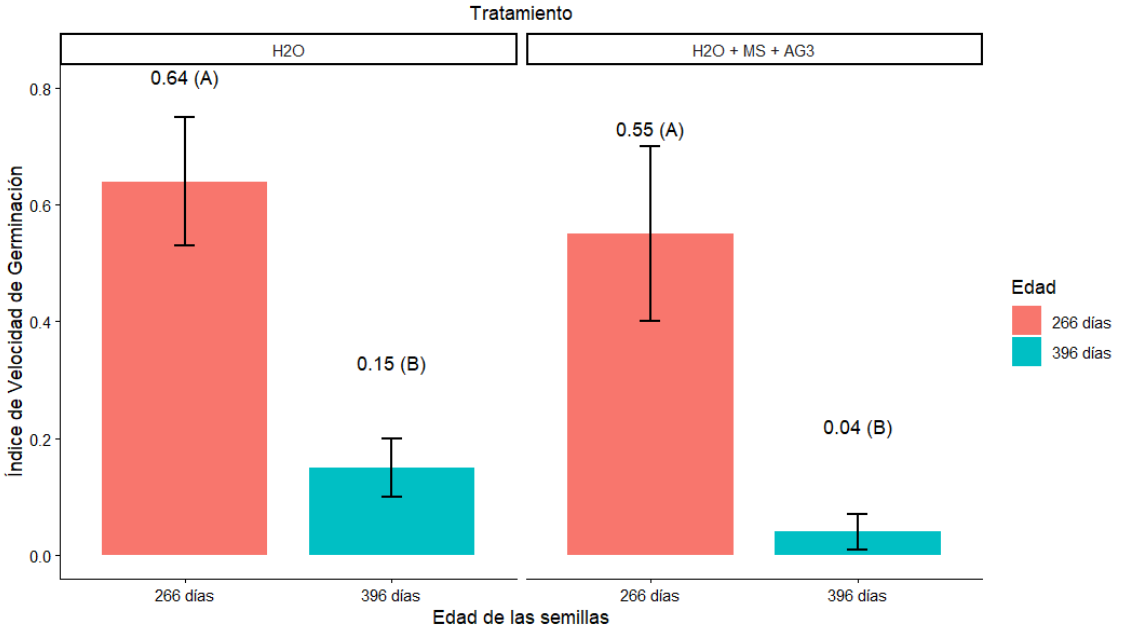


Figura 10. Índice de Velocidad de Germinación (IVG) según los tratamientos y edades de las semillas (promedio ± E.E.).

Las semillas que germinaron se desarrollaron en plántulas (Figura 11A), mientras que las que no lo hicieron solo se quedaron en embrión (Figura 11B).

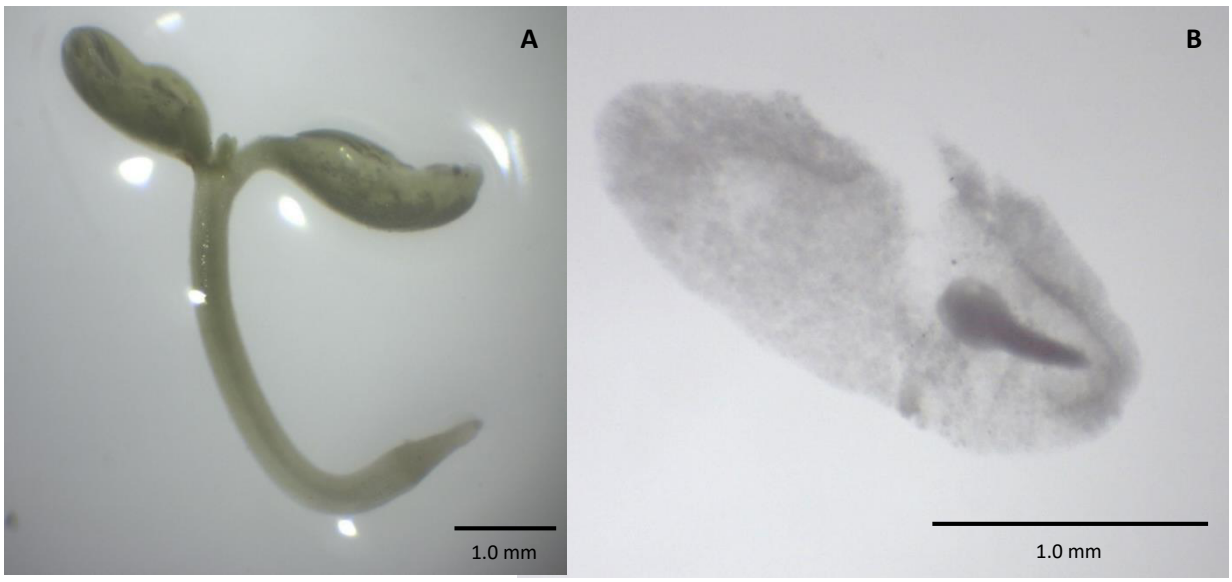


Figura 11. Germinación de semillas de *C. pedunculata*. **A.** Semilla germinada y desarrollada en plántula a 4X. **B.** Semilla no germinada a 4X.

Cabe resaltar que también se observó que las semillas germinaron bajo un régimen de 12 horas luz, además durante la germinación de los embriones se apreció que el endospermo ofreció una restricción mecánica para la emergencia de la radícula y cotiledones (Anexo 17).

5.2. Prueba de viabilidad de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli con Tetrazolium

Las cuatro pruebas de viabilidad con Tetrazolium se realizaron en una sola fecha, se trabajaron con 4 frascos diferentes. Todas las semillas eran del Lote 1, por lo que tenían la misma edad, 595 días. De las 80 semillas evaluadas solo 2 resultaron ser viables (Tabla 1), donde una sola semilla en 2 repeticiones se tiñó de rosado (Figura 12A) mientras que el resto resultó incoloro (Figura 12B).

Tabla 1. Resultados de la prueba de Tetrazolium de las semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli

Repetición	Semillas sembradas	Semillas viables	Semillas no viables
1	20	1	19
2	20	1	19
3	20	0	20
4	20	0	20

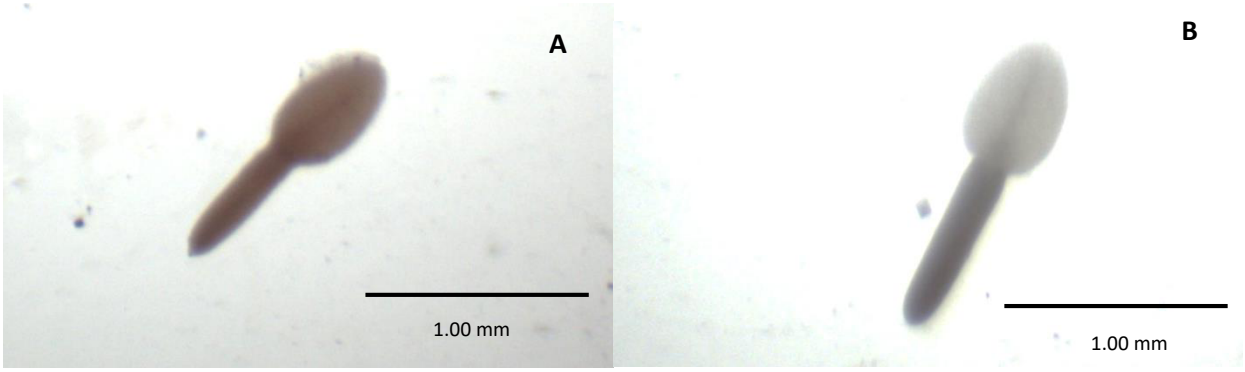


Figura 12. Coloración de embriones de *Ciliosemina pedunculata* como resultado de la prueba de viabilidad con Tetrazolium. **A.** Embrión teñido de rosado a 40X. **B.** Embrión incoloro a 40X.

5.3. Histología y morfología de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli

Las semillas de *C. pedunculata* fueron cortadas transversalmente, luego se tiñeron con safranina y al ser observadas al microscopio se distinguió una capa delgada muy teñida de fucsia oscuro correspondiente a la testa de la semilla. Además, se aprecia una capa de células epidérmicas coloreada de fucsia claro con un borde grueso, estas capas rodean al endospermo de reserva, el cual no está coloreado, con gránulos de reserva visibles. Por último, se contempla el tejido del embrión (Figura 13).

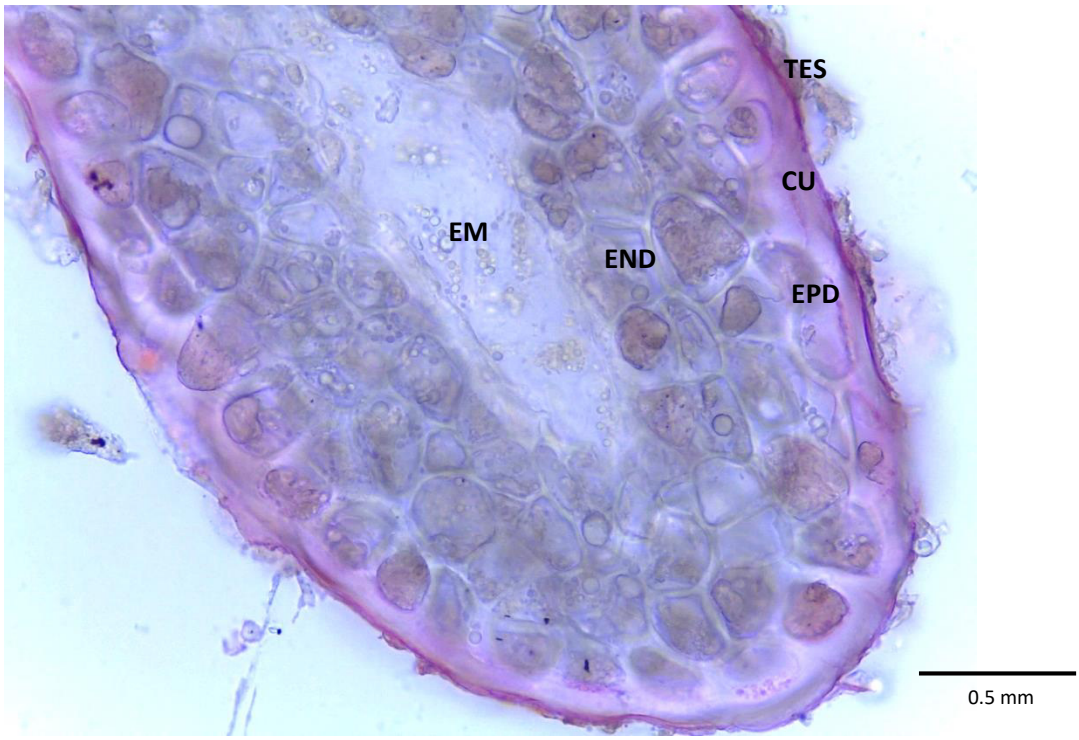


Figura 13. Corte transversal de semilla de *Ciliosemina pedunculata* teñida con safranina a 400X. **TES:** Testa, **CU:** Cutina, **EPD:** Epidermis, **END:** Endospermo de reserva y **EM:** Embrión.

Para poder ver la reacción con el reactivo de Lugol, se quitó la exotesta de la semilla y se dejó el endospermo junto con el embrión. Después de agregarle el reactivo se observó que todo el endospermo se tiñó de azul (Figura 14A), por lo tanto tuvo una reacción positiva al reactivo.

Al observarlo al microscopio, a mayor aumento (400X), se pudieron visualizar los gránulos de almidón perfectamente coloreados y definidos dentro de las células del endospermo (Figura 14B).

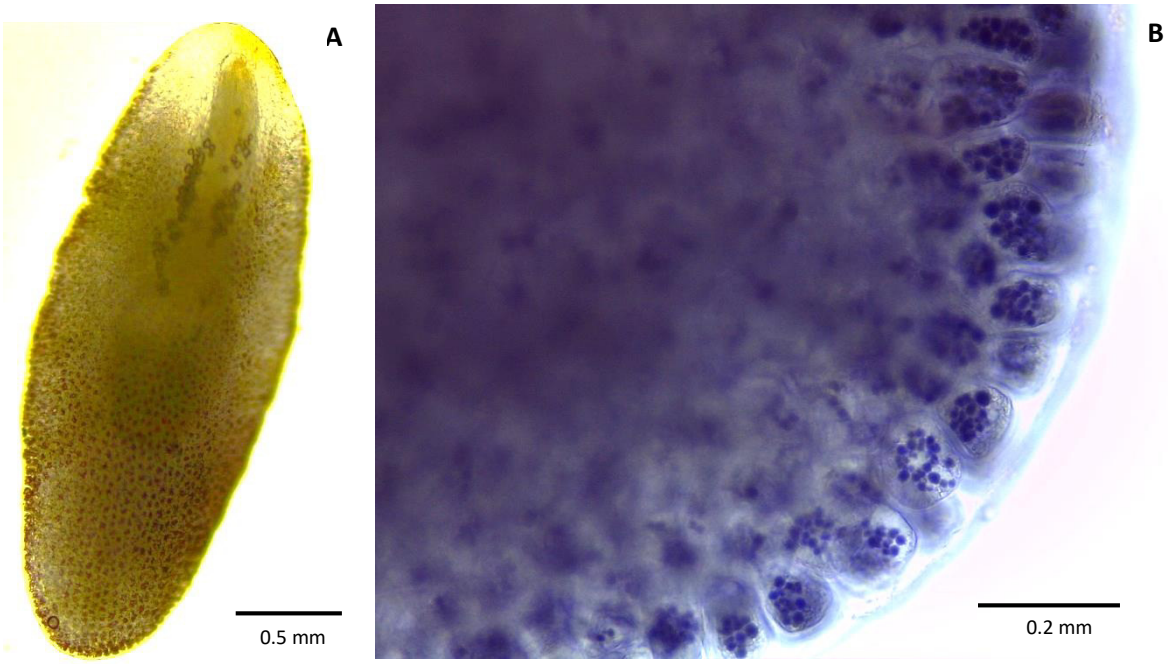


Figura 14. Prueba con el reactivo de Lugol de la semilla de *Ciliosemina pedunculata*. **A.** Tinción positiva a almidón en el endospermo (100 X). **B.** Gránulos de almidón teñidos de azul dentro del endospermo (400 X).

Por otro lado, al examinar los frutos y semillas colectadas se encontró que los frutos son secos, y estos se abren al madurar, la apertura es por las juntas entre los carpelos, por lo que son cápsulas septicidas dehiscentes (Figura 15A).

Las cápsulas contienen dos valvas que se abren, dentro hay dos lóculos divididos por una ranura carpelar, estás valvas se abren desde el ápice hasta la base (15B), se aprecia que las cápsulas miden aproximadamente 1 cm. Dentro contienen un tabique a la cual las semillas están adheridas (Figura 15C) donde se visualiza que las semillas miden menos de 0.5 cm, asimismo, se aprecia la presencia de varias semillas.

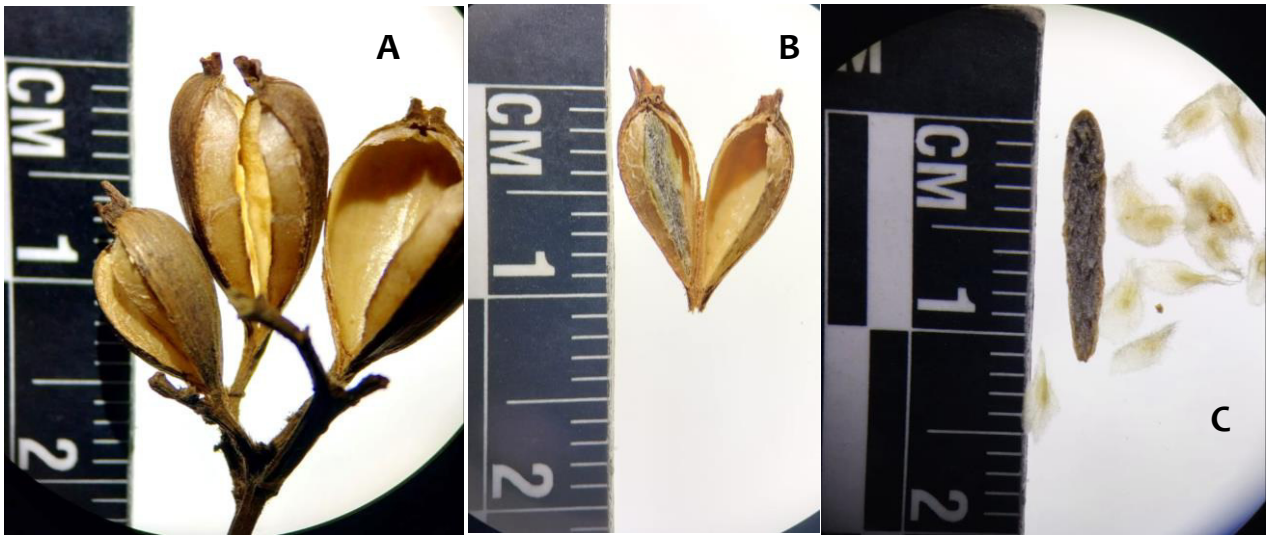


Figura 15. Fruto de *Ciliosemina pedunculata* con sus valvas abiertas. **A.** Tres cápsulas abiertas. **B.** Una cápsula abierta mostrando un tabique al cuál las semillas están adheridas. **C.** Tabique con semillas de *C. pedunculata*.

Asimismo se aprecia que las semillas son planas por un lado y convexas por el otro (Figura 16A). Presentan forma fusiforme con una testa (epispermo) membranosa y dos alas muy marcadas en un extremo, además poseen tricomas pequeños en todo su borde (Figura 16B). El embrión es incoloro y muy pequeño, de forma espatulada con dos cotiledones, rodeada por el endospermo (Figuras 16C y 16D).

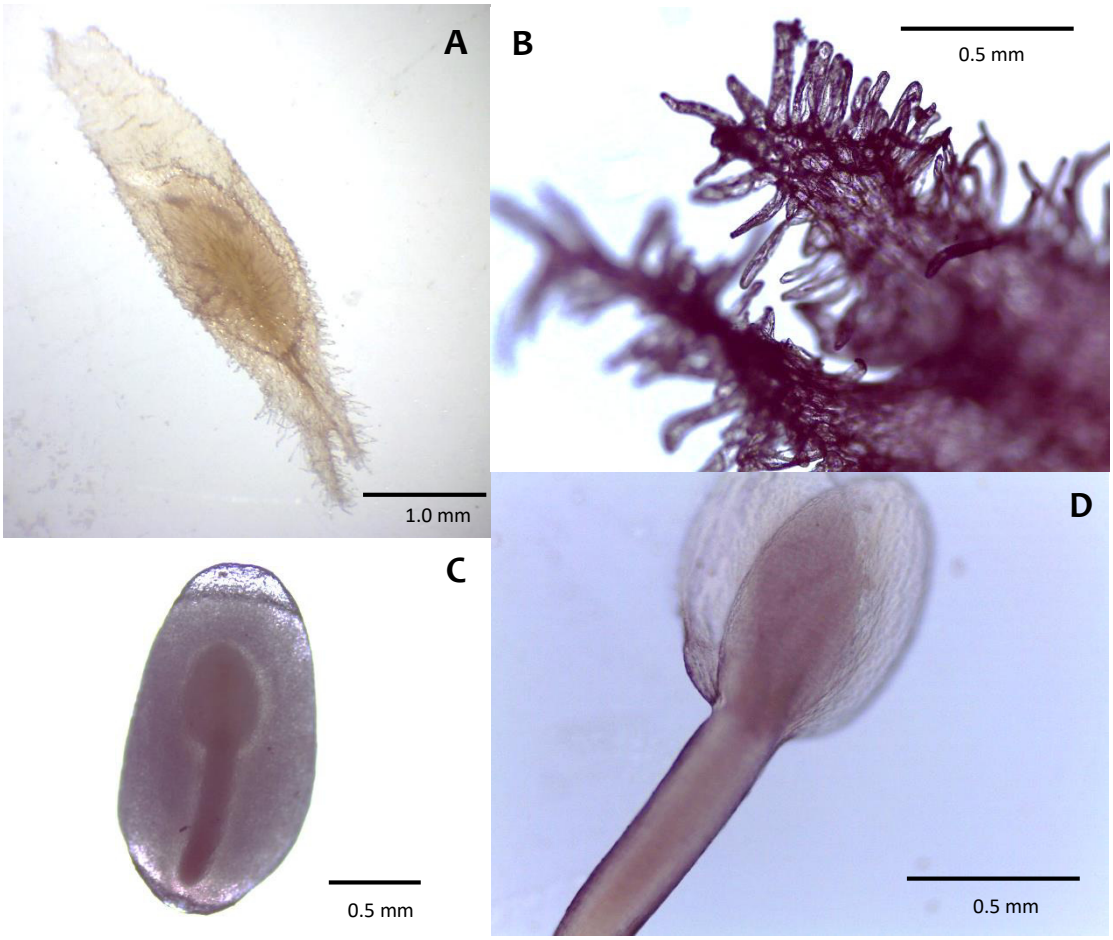


Figura 16. Semilla y embrión de *C. pedunculata.* **A.** Semilla a 40X. **B.** Tricomas de las alas de la semilla a 100X. **C.** Endospermo cubriendo al embrión a 100X. **D.** Embrión espatulado con sus dos cotiledones a 400X.

5.4. Cuidados post germinación de las semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli

El primer paso que se realizó fue germinarlas (Figura 17A), observar su crecimiento (Figuras 17 B y C) hasta que desarrollaron sus cotiledones. Luego las trasladamos a frascos de vidrio con carbón activado (para evitar su oxidación) y puedan enraizar y generen hojas verdaderas (Figura 17D). El siguiente paso, sería aclimatarlas con tierra de su lugar de colecta (Figura 17E) para finalmente introducirlas a su hábitat natural con el procedimiento adecuado.

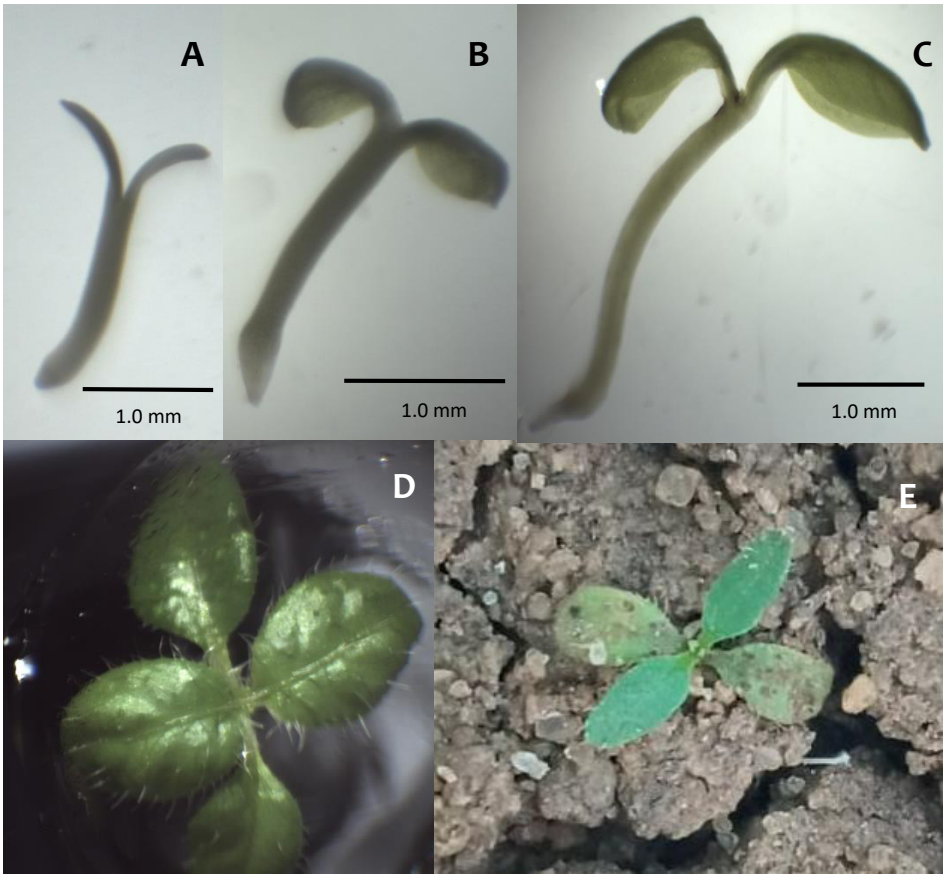


Figura 17. Proceso de crecimiento in vitro de una plántula de *Ciliosemina pedunculata*.

A. Embrión germinado a los 6 días. **B.** Plántula a los 12 días. **C.** Plántula a los 24 días.

D. Plántula a los 78 días. **E.** Plántula de *C. pedunculata* en tierra a los 60 días.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Germinación *in vitro* de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli

En esta investigación se sometieron a las semillas de *C. pedunculata* a dos tratamientos líquidos *in vitro*, con los datos obtenidos se evaluaron tres variables: germinabilidad, tiempo medio de germinación e índice de velocidad de germinación. El experimento se repitió dos veces con semillas de edades diferentes, de 266 y 396 días.

La primera variable evaluada fue la germinabilidad. En el experimento 1 (266 días) el tratamiento de solo agua destilada (H_2O) logró un porcentaje de germinación del 73.33%, en comparación del 60.00% del tratamiento de agua destilada con medio MS y ácido giberélico (H_2O + MS + AG_3). En el experimento 2 (396 días) se obtuvo un porcentaje de 21.67% para las semillas germinadas con H_2O y de 10.00% para aquellas que tenían agua con MS y AG_3 (Figura 7). No se evidenció diferencias estadísticas entre los porcentajes de germinación a nivel de tratamientos en ambas edades (Anexo 7 y 8). A pesar de que se les haya agregado sales y minerales al tratamiento de agua con MS y ácido giberélico no hubo mayor germinación en comparación del tratamiento con solo agua, concluyendo de que las semillas pueden germinar en agua y no es necesario ningún aditivo.

El motivo por el cual el medio de agua presentaría mayor porcentaje de germinados en comparación con el otro medio (Figura 7) se debería a que este contiene sales que impedirían el ingreso de agua a la semilla, como lo reporta Mejía (2014) cuando comparó la germinación entre seis especies de *Cinchona* y observó que las sumergidas en agua destilada presentaban mayor tasa de germinación a comparación del medio MS. Agregando a lo anterior, Cordero y Di Stefano (1991) encontraron que a medida que el potencial osmótico decrecía alrededor de la semilla, se reducía la tasa de germinación en semillas de *Tecoma stans*.

En consecuencia, podemos decir que un potencial hídrico muy negativo en el entorno de la semilla impide la germinación, ya que cuando la cantidad de sales alrededor de la semilla es mayor a su interior, se obstaculiza el ingreso de agua y no se dan las condiciones necesarias para la germinación.

Además, se puede apreciar que el porcentaje de semillas germinadas en el día 266 es mayor a las del día 369 (Figura 7) en ambos tratamientos, resultando en la diferencia estadística significativa (Anexo 5 y 6) entre los porcentajes de germinación de las semillas de 266 vs 396 días en cada tratamiento, indicando que conforme pasa el tiempo las semillas reducen su tasa de germinación.

En la figura 8 está observación es más visible, en las semillas de 266 días para ambos tratamientos se percibe una curva que crece exponencialmente hasta el día 25 después de siembra, en cambio, para las semillas de 396 días la curva es más plana en ambos tratamientos. Además, se encontró que hay diferencia estadística significativa (Anexo 9) entre los porcentajes de germinación en todos los días de evaluación a excepción del día 5 después de siembra (Anexo 10) entre las semillas de 266 días vs 396 días para cada tratamiento, evidenciando la reducción del porcentaje de germinación. Esto también se aprecia en *Cinchona*, Acosta (1947) observó que semillas de 11 a 20 días presentan mayor germinación y prefiere usar semillas jóvenes para producción ya que hay mayor probabilidad que germinen, asimismo, Aguirre y Madsen (2002) reportaron que el género *Cinchona* presenta una baja tasa de germinación natural, debido a la cercanía de *Ciliosemina* con este género, se puede esperar el mismo comportamiento.

La segunda variable evaluada fue el tiempo medio de germinación, se observó que, para el tratamiento de agua, se obtuvo un tiempo de 15.55 días para las semillas de 266 días, de edad y aumentó ligeramente a 15.75 días para las semillas de 396 días. En el tratamiento de agua con MS y AG_3, ocurrió lo opuesto, las semillas de 266 días obtuvieron un tiempo de 16.67 días y disminuyó a 10.67 días en las semillas de 396 días de edad (Figura 9).

La prueba de Kruskal – Wallis indicó que no hay diferencias estadísticas significativas entre los 4 tiempos medios de germinación, por lo que técnicamente todos germinan al mismo tiempo, entonces ni el medio ni la edad de la semilla influencian el tiempo de germinación (Anexos 13 y 14).

En cuanto a la tercera variable, el índice de velocidad de germinación, se aprecia que para el tratamiento agua las semillas de 266 días germinan en un rango de 0.64 semillas por día y las semillas de 396 días, germinan en menor cantidad, 0.10 semillas por día. Respecto a el tratamiento de agua con MS y AG_3, las semillas de 266 días germinan 0.55 semillas por día, mientras que las de 396 días, germinan 0.04 semillas por día (Figura 10). La prueba de Kruskal-Wallis indica que hay diferencia estadística significativa a nivel de edades (Anexo 15), mas no a nivel de tratamientos (Anexo 16). Por lo que se evidencia que la edad de las semillas si afectó la velocidad en la que germinan las semillas para los tratamientos de agua y agua con MS y AG_3, siendo las semillas más jóvenes aquellas que germinan más rápido.

Adicionalmente, Mesía (2014) experimentó con semillas de *Cinchona* bajo luz (12h) y completa oscuridad (24h) por lo que concluyó que son fotoblásticas positivas, es decir, necesitan luz para germinar. En este experimento solo se experimentó bajo un régimen de 12 horas luz, y se observó que las semillas de *C. pedunculata* si germinaron, por lo que inferimos que estas semillas si pueden germinar con luz.

6.2. Prueba de viabilidad de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli con Tetrazolium

Solo dos de las ochenta semillas testeadas resultaron ser viables (Tabla 1), coloreándose de rosado (Figura 4A), mientras el resto permaneció incoloro (Figura 4B), lo que indica que, de esa muestra de semillas, cuya edad era de 595 días, la viabilidad fue del 2.5%. Esto se ve reflejado en el decrecimiento de la tasa de germinación a través del tiempo que se pudo apreciar en el test de germinación *in vitro* (Figura 9), a mayor edad de las semillas, menor viabilidad presentan.

Este es el primer estudio de viabilidad en esta especie, sin embargo, hay varios trabajos realizados en el género *Cinchona* como en Mejía (2014), Armijos-González (2016), Caraguay (2016), Cancho (2017), Lima et al. (2018), Suárez (2018) y Moreno et al. (2019).

En el 2010, Nair sugirió que las semillas de *Cinchona pubescens* Vahl serían recalcitrantes debido a la pérdida de viabilidad que obtuvo al cabo de un año en semillas almacenadas. Mejía, en el 2014, realizó la prueba de Predicting desiccation sensitivity in woody species (Gold y Hay, 2008) hallando que las semillas de *Cinchona* eran ortodoxas y además presentaban bajo contenido de humedad. Sin embargo, Caraguay (2016) ejecutó otra prueba de contenido de humedad (ISTA, 2007) en donde encontró que las semillas de *Cinchona officinalis* L. presentaban alto contenido de humedad que hacía que estas pierdan fácilmente su viabilidad, por lo que eran recalcitrantes. Esta discordancia de resultados se debe a diferentes factores como la forma de almacenamiento de las semillas, donde Mejía (2014) observó que las semillas de *Cinchona* almacenadas en papel de aluminio dentro de una bolsa ziploc tenían mayor humedad en comparación de aquellas en bolsas de papel, además otro factor sería la variación de madurez de las semillas como indica Suárez (2018).

Otra característica de las semillas recalcitrantes es que tienen una testa más delgada, mientras las ortodoxas presentan testas gruesas que les ayudan a protegerlas de los daños ocasionados por la desecación, además las recalcitrantes se encuentran en hábitats húmedos como bosques tropicales (Daws et al., 2006).

Entonces, la pérdida de viabilidad de las semillas de *Ciliosemina pedunculata*, junto a la delgada testa y el hábitat donde crece esta especie nos sugieren que podrían ser recalcitrantes, ya que estás no pueden resistir la desecación, por lo que presentan intervalos más cortos de almacenamiento (Roberts, 1973). Si tuvieran un comportamiento ortodoxo, las semillas presentarían periodos de almacenamiento más prolongados.

Ahora bien, por otro lado, hay que resaltar que la prueba de Tetrazolium mide la viabilidad de las semillas más no hace diferencia entre las que presentan dormancia o no (Elías et al., 2012).

La dormancia es un estado fisiológico en donde la germinación no sucede a pesar de estar presente en un ambiente con las condiciones ambientales de temperatura, humedad y concentración de oxígeno favorables (Pérez y Pita, 1999).

Hay varios mecanismos que influyen en la dormancia de las semillas, y estás se agrupan en dos categorías: Dormancia embrionaria y Dormancia impuesta por cubiertas seminales. En la dormancia embrionaria el embrión es quien controla la dormancia, por ejemplo, con embriones inmaduros o inhibidores químicos y en la dormancia impuesta por cubiertas seminales, hay restricciones mecánicas o fisiológicas que imponen las cubiertas seminales (Bewley, 2013).

El ácido giberélico (AG_3) se puede usar para contrarrestar el efecto de los inhibidores químicos y levantar el estado de dormancia (Pérez y Pita, 1999), sin embargo, en el tratamiento de agua más MS más AG_3 no se observa incremento de germinación en las semillas de *Ciliosemina* (Figura 9) eliminando la posibilidad de la dormancia embrionaria.

Entonces, en el test de germinación *in vitro* de semillas (Figura 9) se aprecia que estás germinan a pesar de su baja viabilidad observado en la prueba de Tetrazolium, además, no hay alguna indicación de que las semillas están en mal estado, tampoco presentan degeneración, ni están contaminadas. Por lo que, debido a este antagonismo de resultados, se considera la posibilidad de presencia de dormancia en las semillas de *C. pedunculata*, conforme a lo expuesto por Elías et al., (2012) en donde indica que se puede sospechar de dormancia cuando hay ausencia de descomposición con una baja tasa de germinación.

El tipo de dormancia en las semillas de *Ciliosemina pedunculata* sería a aquella impuesta por cubiertas seminales, esta idea se refuerza con la observación del endospermo ofreciendo una restricción mecánica a la emergencia de los cotiledones y raíces (Anexo 17), ya que dificulta la expansión del embrión, se puede inferir que el endospermo bloquea de alguna forma el ingreso de agua o el intercambio gaseoso.

Se observa que la viabilidad de las semillas de *C. pedunculata* decrece con el tiempo, atributo observado de la misma manera en semillas de Cinchona (Mejía, 2014).

6.3. Histología y morfología de semillas de *C. pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli

Al realizar el corte transversal de la semilla de *Ciliosemina pedunculata* se observaron sus tejidos (Figura 5): primero se visualiza la testa, cubriendo al endospermo, que se compone de una capa de células delgada y teñidas de fucsia oscuro en forma reticulada.

Esto coincide con lo que encontró, él observó que en *Cinchona* la cubierta seminal es reticulada, y eso también se aprecia en *C. pedunculata*.

Luego se visualiza células epidérmicas con un borde grueso coloreado de fucsia claro que están rodeando al endospermo de reserva con gránulos de almidón y a su vez rodean al embrión. Según D' Ambrogio (1986) y Pérez et al. (2016), las estructuras que se tiñen de fucsia se deben a que la safranina colorea paredes cutinizadas, lignificadas y suberificadas, debido a que el color no es tan intenso, se infiere que el borde grueso de las células epidérmicas sería cutina. Además, cuando Corner (1976) describe las capas celulares de las semillas de Rubiaceae, indica que esta capa del endospermo actúa como una estructura mecánica, lo cual podría pasar en *C. pedunculata* por el grosor del borde de las células epidérmicas.

Además, las semillas reaccionaron positivamente al reactivo de Lugol lo que indicaría presencia de almidón (Martín-Sánchez et al., 2013) y lo cual se puede observar

claramente en las Figuras 6 A y B donde se aprecian los gránulos de almidón dentro de las células del endospermo, clasificando a las semillas como farináceas.

Asimismo, se observaron morfológicamente los frutos y semillas de *C. pedunculata*. Los frutos son cápsulas septicidas dehiscentes con muchas semillas (Figuras 7A y B). En cuanto a las semillas, estas resultaron presentar una testa membranosa alada (Figuras 8A y B) lo cual favorece su dispersión aérea, por lo que su principal método de reproducción es por anemofilia, tal como lo encontró Nair (2010) en *Cinchona*. También se observó la presencia de tricomas en los bordes de las semillas. Corner (1976) visualizó que las semillas de *Rubiaceae* pueden ser diminutas, albuminosas y con un embrión pequeño, tal como lo es *C. pedunculata*. Además el embrión presenta forma espatulada, de la misma manera que Romero-Saritama (2015) aprecio en *Cinchona*.

7. CONCLUSIONES

- El uso de agua destilada es suficiente para promover la germinación de Las semillas de *Ciliosemina pedunculata* (H. Karst) A. Antonelli sin necesidad de medios suplementados con sales u hormonas.
- A mayor edad de las semillas de *C. pedunculata*, hay una reducción en su tasa de germinación.
- Ni la edad, ni la adición de medios suplementados influyen en el tiempo medio de germinación en las semillas de *C. pedunculata*.
- A mayor edad de las semillas de *C. pedunculata*, hay una reducción en la velocidad de germinación
- Las semillas de *C. pedunculata* pueden germinar bajo la luz.
- La viabilidad de las semillas de *Ciliosemina pedunculata* se pierde a través del tiempo.
- Las semillas de *C. pedunculata* exhiben dormancia impuesta por cubiertas seminales.
- Las semillas de *C. pedunculata* serían recalcitrantes.
- Las semillas de *C. pedunculata* son farináceas, almacenan almidón en su endospermo.
- La dispersión de la semilla de *C. pedunculata* es aérea y su método de reproducción es por anemofilia.

8. RECOMENDACIONES

- Utilizar semillas jóvenes de *C. pedunculata* ya que es más probable que tengan mayor viabilidad.
- Cuando se trabajen con un banco de germoplasma de *C. pedunculata* se recomienda cambiar las semillas en un plazo no mayor a 9 meses para asegurar su viabilidad.
- Seleccionar las semillas basándose en su tamaño, color y presencia de embrión.
- Para la siembra de las semillas de preferencia liberar el embrión para que este entre en contacto con el agua y tenga mayor probabilidad de germinación.
- Cuando se trabaja con semillas forestales cuyo objetivo es su conservación, es necesario conocer sus características como saber si las semillas son recalcitrantes u ortodoxas, si presentan dormancia o no, la tasa de germinación de las semillas y la tasa de viabilidad de las mismas.
- Se plantea hacer un experimento comparando la presencia y ausencia de luz para verificar si son semillas fotoblásticas o no.
- Se propone realizar el método de Predicting desiccation sensitivity in woody species para darle mayor precisión a los resultados obtenidos sobre la recalcitrancia de *C. pedunculata*, y de preferencia utilizar semillas jóvenes.

9. REFERENCIAS BILBIOGRÁFICAS

ACOSTA SOLIS, M., 1947. *Cinchonas del Ecuador* (1st ed.). Quito, Ecuador: Publicaciones Científicas MAS.

AGUIRRE Z. y MADSEN J. 2002. *Botánica Austroecuatoriana: Estudios sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora-Chinchipe*. Quito, Ecuador: Ediciones Abya Yala.

ANDERSSON, L. y ANTONELLI, A., 2005. Phylogeny of the tribe Cinchoneae (Rubiaceae), its position in Cinchonoideae, and description of a new genus, *Ciliosemina*. *Taxon*, vol. 54, no. 1, pp. 17-28. ISSN 00400262. DOI 10.2307/25065299.

ARMIJOS-GONZÁLEZ, R. y PÉREZ-RUIZ, C., 2016. In vitro germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L (Rubiaceae). *Journal of Forestry Research*, vol. 27, no. 6, pp. 1229-1236. ISSN 19930607. DOI 10.1007/s11676-016-0272-8.

BEWLEY, J.D., BRADFORD, K.J., HILHORST, H.W.M. y NONOGAKI, H., 2013. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. 3rd Edition. New York: Springer. DOI 10.1007/978-1-4614-4693-4.

BHOJWANI, S.S. y DANTU, P.K., 2013. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. New Dehli: Springer. ISBN 978-81-322-1025-2. DOI 10.1007/978-81-322-1026-9.

BRACK EGG, A. y MENDIOLA VARGAS, C., 2004. *Ecología del Perú*. 2da Edición. Lima, Perú: Bruño. ISBN: 9972-1-0327-7.

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). Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

CARAGUAY YAGUANA, K.A., 2016. Potencial reproductivo y análisis de calidad de semillas de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos en la provincia de Loja. Loja, Ecuador: Universidad Nacional de Loja.

CHASE, M.W., CHRISTENHUSZ, M.J.M., FAY, M.F., BYNG, J.W., JUDD, W.S., SOLTIS, D.E., MABBERLEY, D.J., SENNIKOV, A.N., SOLTIS, P.S. y STEVENS, P.F., 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 181, no. 1, pp. 1-20. ISSN 10958339. DOI 10.1111/boj.12385.

CORDERO, R.A. y DI ESTÉFANO, J. F., 1991. Efecto del estrés osmótico sobre la germinación de semillas de *Tecoma stans* (Bignoniaceae). *Rev. Biol. Trop*, vol. 39, no. 1, pp. 107-110.

CORNER, E.J.H., 1976. *The Seeds of Dicotyledons*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 311.

DALEY, D.K., 2017. Plant Crude Drugs. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. Boston: Academic Press, pp. 81-89. ISBN 9780128020999.

DAWS, M.I., GARWOOD, N.C. y PRITCHARD, H.W., 2006. Prediction of desiccation sensitivity in seeds of woody species: A probabilistic model based on two seed traits and 104 species. Annals of Botany, vol. 97, no. 4, pp. 667-674. ISSN 03057364. DOI 10.1093/aob/mcl022.

DÍAZ, J.G., GAVIN SAZATORNIL, J., LÓPEZ RODRÍGUEZ, M., RUIZ-MESÍA, L. y VARGAS ARANA, G., 2004. Five new alkaloids from the leaves of *Remijia*

peruviana. *Journal of Natural Products*, vol. 67, pp. 1667-1671. ISSN 01633864. DOI 10.1021/np040053k.

D'AMBROGIO DE ARGUESO, A., 1986. *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Hemisferio Sur S.A. ISBN 950-504-360-0.

ELIAS, S.G., COPELAND, L.O., MCDONALD, M.B. y BAALBAKI, R.Z., 2012. *Seed Testing: Principles and Practices*. Michigan, United States: Michigan State University Press.

ELLIS, R.H. y ROBERTS, E.H., 1980. Towards a rational basis for testing seed quality. En: P.D. HEBBLETHWAITE (ed.), *Seed Production*. London: pp. 605-635.

ESPINOSA, C.I. y RÍOS, G., 2014. Patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis* in vitro y ex vitro; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, vol. 35, pp. 73-82.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2014. *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura* [en línea]. Edición revisada. Roma: s.n. ISBN 9789253082629. Disponible en: www.fao.org/publications.

FLÜCKIGER, F.A., 1883. *Die Chinarinden: in pharmakognostischer Hinsicht dargestellt*. Berlin: Wellcome Collection. Disponible en: https://wellcomecollection.org/works/sata5kwj.

GARCÍA BARRIGA, H., 1992. *Flora medicinal de Colombia*. 2da Edición. Bogotá: Tercer Mundo. ISBN 968-601-366-9.

GARCÍA SÁNCHEZ, R., 2003. *Actividad antimalárica de los extractos de 10 especies vegetales amazónicas*. Iquitos, Perú. Universidad Nacional de Amazonía Peruana.

GOLD, K. y HAY, F., 2008. Identifying desiccation-sensitive seeds. Millennium Seed Bank Project KEW.

GOLD, K. y HAY, F., 2022. Identifying desiccation-sensitive seeds. [en línea]. London: [Consulta: 30 mayo 2025]. Disponible en: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/10-Desiccation-tolerance.pdf.

HUNTER, C.S., 1988. *Cinchona spp.*: Micropropagation, and the In Vitro Production of Quinine and Quinidine. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 4. pp. 367-387.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

INTAGRI, 2024. Cultivo In Vitro de Células y Tejidos Vegetal. [en línea]. Disponible en: https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 2007. *International rules for seed testing*. Edition 2007. Glattbrugg/Zurich: International Seed Testing Association. 288 p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 2008. *International rules for seed testing*. Edition 2008. Bassersdorf, Suiza: International Seed Testing Association.

KACPRZAK, K.M., 2013. Chemistry and biology of cinchona alkaloids. *Natural Products*. Germany: Springer Berlin/Heidelberg, pp. 605-641. ISBN 9783642221446. DOI 10.1007/978-3-642-22144-6_22.

KARSTEN, G.K.W.H., 1859. *Florae Columbiae*. Berlín: Apud Fernandini Duemmleri Successores.

KERMODE, A.R., BEWLEY, J.D., DASGUPTA, J. y MISRA, S., 1986. The Transition from Seed Development to Germination: A Key Role for Desiccation? *HortScience*, vol. 21, no. 5, pp. 1113-1118.

KIERNAN, J.A., 2015. *Histological and Histochemical Methods: Theory and practice*. 5th Edition. United Kingdom: Scion Publishing Ltd. ISBN 978-1-907904-32-5.

KVIST, L.P., CHRISTENSEN, S.B., RASMUSSEN, H.B., MEJIA, K. y GONZALEZ, A., 2006. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 106, no. 3, pp. 390-402. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2006.01.020.

MAGUIRE, J.D., 1962. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, vol. 2, pp. 176-177.

MARTÍN-SÁNCHEZ, M., MARTÍN-SÁNCHEZ, M.T. y PINTO, G., 2013. Reactivo Lugol: Historia de su descubrimiento y aplicaciones didácticas. *Educación Química*, vol. 24, no. 1, pp. 31-36. ISSN 18708404. DOI 10.1016/s0187-893x(13)73192-6.

MARTIUS, K., 1889. *Flora Brasiliensis, enumeratio plantarum in Brasilia hactenus detectarum :quas suis aliorumque botanicorum studiis descriptas et methodo naturali digestas partim icone illustratas.* Munich: R. Olderbourg. vol, VI, no. VI. https://doi.org/10.5962/bhl.title.454.

MEGÍA, M., MOLIST, P. y POMBAL, M.A., 2023. Atlas de histología vegetal y animal. [en línea]. [Consulta: 25 marzo 2024]. Disponible en: https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-v/guiada_o_v_semilla.php.

MEJÍA, F., 2014. *Factores que influyen en la germinación de semillas de 6 especies del género Cinchona (Rubiaceae) en el Perú*. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

MORENO SERRANO, J.A., PÉREZ RUÍZ, C., MORENO FIERRO, I. y MORENO FIERRO, J., 2019. Effect of culture medium on morphogenic processes in vitro in *Cinchona officinalis* L. *Rev. FCA UNCUYO*, vol. 51, no. 1, pp. 55-68. ISSN 1853-8665.

NAIR, K.P.P., 2010. *The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World*. Burlington: Elsevier. 368 p. ISBN 9780123846785.

NEW YORK BOTANICAL GARDEN, 2021. What is a seed? [en línea]. [Consulta: 25 marzo 2024]. Disponible en: https://www.nybg.org/planttalk/what-is-a-seed/.

LIMA JIMÉNEZ, N.R. y MORENO SERRANO, J.A., 2018. Propagación in vitro de *Cinchona officinalis* L. a partir de semillas. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research* [en línea], vol. 20, no. 2, pp. 169-178. ISSN 23068582. DOI 10.18271/ria.2018.361. Disponible en: https://huajsapata.unap.edu.pe/index.php/ria/article/view/44.

OXFORD LANGUAGES, 2024. Seed. [en línea]. [Consulta: 25 marzo 2024].

PÉREZ TUESTA, E., MARÍN BRAVO, M. y LA ROSA LOLI, R., 2016. *Guía de Prácticas: Anatomía Vegetal*. Lima, Perú: s.n.

PÉREZ GARCÍA, F. y PITA VILLAMIL, J.M., 1999. Dormición de semillas. Hojas divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. no. 2103.

RANAL, M.A. y SANTANA, D.G., 2006. How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*, vol. 29, no. 1, pp. 1-11.

REAL ACADEMIA ESPAÑOLA, 2024. *Diccionario de la lengua española*. [en línea]. [Consulta: 25 marzo 2024]. Disponible en: https://dle.rae.es/semilla.

ROBERTS, E.H. (1973): Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, vol. 1, no. 3, pp. 499–514.

ROMERO-SARITAMA, J.M., 2015. Rasgos morfológicos de frutos, semillas y embriones de *Cinchona officinalis* L. (RUBIACEAE) en el sur del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, vol. 36, no. 2, pp. 27-35.

RUIZ-MESÍA, L., RUIZ-MESÍA, W., REINA, M., MARTÍNEZ-DIAZ, R., DE INÉS, C., GUADAÑO, A. y GONZÁLEZ-COLOMA, A., 2005. Bioactive *Cinchona* alkaloids from *Remijia peruviana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 6, pp. 1921-1926. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf048880e.

STANDLEY, P., 1930. *Studies of American Plants IV*. Chicago, U.S.A.: Field Museum of Natural History. Botanical Series, vol. VIII, no. 3.

VARGAS ARANA, G., RUIZ MESÍA, L., RUIZ MESÍA, W. y REINA, M., 2011. Estudio químico de la corteza de *Remijia peruviana* “Cascarilla”. *Ciencia Amazónica (Iquitos)*, vol. 1, no. 1, pp. 41-50. ISSN 2221-5948. DOI 10.22386/ca.v1i1.4.

VÁZQUEZ-YANES, C. y OROZCO-SEGOVIA, A., 1993. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. *Annual Review of Ecology and Systematics*, vol. 24, no. 1, pp. 69-87. ISSN 00664162. DOI 10.1146/annurev.es.24.110193.000441.

WAYNE, D., 2002. *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud* [en línea]. 4th. D.F. México: pp. 668. LIMUSA - WILEY. Disponible en: www.FreeLibros.me.

WIJNSMA, R. y VERPOORTE, R., 1988. Quinoline Alkaloids of *Cinchona*. En: F. CONSTABEL y I.K. VASIL (eds.), *Phytochemicals in Plant Cell Cultures* [en línea]. Leiden, Netherlands: Academic Press, pp. 335-355. ISBN 978-0-12-715005-5.

10. ANEXOS

Anexo 1. Primer dibujo de *Cinchona pedunculata* Krst. realizado por H. Karsten en 1859.



Anexo 2. Identificación de C. pedunculata (H. Karst) A. Antonelli del Museo de Historia Natural.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

CONSTANCIA Nº-005-2022-USM-HN

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (muestra estéril), recibida de **María Milagros Judith SANCHEZ BARBACHAN**; tesista de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Ciliosemina pedunculata*** (H.Karst.) Antonelli sinónimo: ***Remijia peruviana*** (Standl) y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de APG IV (2016).

ORDEN: RUBALES

FAMILIA: RUBIACEAE

GENERO: *Ciliosemina*

ESPECIE: *Ciliosemina pedunculata* (H.Karst.)Antonelli
Sinónimo: **Remijia peruviana** (Standl)

Nombre vulgar: "cascarilla"
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 09 de febrero de 2022

MUSEO DE HISTORIA NATURAL – JEFE – USM

Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS

JAC/ddb

Anexo 3. Permiso de colecta del Gobierno Regional de Loreto con la Resolución Gerencial Regional N°078-2021.

CARGO DE NOTIFICACIÓN Nº 106-2021-GRL-GGR-GRDFFS

INFORME	: **Se Resuelve: Artículo 1ºAutorizar al señor Rafael Simón Oswaldo La Rosa Loli, investigador principal del proyecto titulado "Uso de la biotecnología en la "Cascarilla" Remijia Peruana Standley especie promisoria para ser usada como antimalarico".**
MATERIA	: **PROCEDIMIENTO ADMINISTRATIVO**
ORGANO ENCARGADO	:
DESTINATARIO (a) (s)	: **UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN MARCOS**
REPRESENTANTE	: **Sr. Rafael Simón Oswaldo La Rosa Loli**
Nº CIP, CE Y/O RUC; C. E., DNI Y OTROS	:
DIRECCION	:
TELEFONO	:
DOCUMENTO ENTREGADO	: **RESOLUCION GERENCIAL REGIONAL Nº 078-2021- de fecha 10 de JUNIO del 2021**
ATENDIO AL NOTIFICADOR	: _____
DOCUMENTO DE IDENTIDAD	: _____
TITULAR O VINCULO	: TITULAR FAMILIAR..... (Padre, Hermano, Etc.)

EMPLEADO / REPRESENTANTE LEGAL
OTROS..... (Indicar)

OBSERVACIONES:
.....
.....
.....
.....

ENTREGUE CONFORME : _____ (Firma)
FECHA: 11/06/2021
HORA: 11.03 a.m. _____ (Nombre y Apellido)
_____ (Cargo que desempeña)

RECIBÍ CONFORME : _____ (Firma)
FECHA: 11/06/2021
HORA: 11:05
Lastenia Ruiz Murrieta (Nombre y apellidos)
DNI/CE: 05274098
TELEFONO: 951599535
Vínculo con el destinatario CO-Investigador

RESOLUCION GERENCIAL REGIONAL N°078 -2021-GRL-GGR-GRDFFS

BELEN, 11 JUN 2021

VISTO;

El expediente N° 08154, de fecha 15 de abril de 2021, mediante el cual el señor **RAFAEL SIMÓN OSWALDO LA ROSA LOLI**, representante del proyecto titulado "Uso de la biotecnología en la "Cascarilla" Remijia peruviana Standley especie promisoria para ser usada como antimalárico", solicita autorización para realizar investigación científica, fuera de áreas naturales protegidas; el Informe Técnico N°001-2021-GRL-GGR-GDFFFS-SGGFFS/TJTB, y el Informe Legal N° 032-2021-GRL-GGR-GRDFFS/E.L.- OAJ;

CONSIDERANDO;

Que, estando a lo dispuesto por el Artículo 66° de nuestra **Constitución Política,** los recursos naturales renovables, como el caso de los recursos forestales y de fauna silvestre, son patrimonio de la Nación, siendo el Estado soberano de su aprovechamiento;

El artículo 9° de la **Ley N° 26821** Ley Orgánica para el Aprovechamiento Sostenible de los Recursos Naturales, establece que el Estado promueve la investigación científica y tecnológica sobre la diversidad, calidad, composición, potencialidad y gestión de los recursos naturales. Promueve, asimismo, la información y el conocimiento de los recursos naturales. Para estos efectos podrán otorgarse permisos para la investigación en materia de recursos naturales incluso sobre recursos materia de aprovechamiento, siempre que no perturben el ejercicio de los derechos concedidos por los títulos anteriores;

Que, la Ley de Bases de la Descentralización - **Ley N° 27483**, en el numeral 9.2 del artículo 9° –Dimensiones de las autonomías políticas, administrativas y económicas de los Gobiernos Regionales – indica *"la autonomía administrativa es la facultad de organizar internamente, determinar y reglamentar los servicios públicos de su responsabilidad";*

Que, la Ley Orgánica de los Gobiernos Regionales – **Ley N° 27867**, y su modificatoria establece y norma la estructura, organización, competencia y funciones de los Gobiernos Regionales, quienes tienen por finalidad esencial fomentar el desarrollo regional integral sostenible, promoviendo la inversión privada, el empleo y garantizar el ejercicio pleno de sus derechos y la igualdad

LORETO
GOBIERNO REGIONAL

GOBIERNO REGIONAL DE LORETO
GERENCIA GENERAL REGIONAL
GERENCIA REGIONAL DE DESARROLLO
FORESTAL Y FAUNA SILVESTRE

Río Amazonas

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

RESOLUCION GERENCIAL REGIONAL N°078 -2021-GRL-GGR-GRDFFS

de oportunidades de sus habitantes, de acuerdo con los planes y programas nacionales, regionales y locales de desarrollo;

Que, el artículo 19° de la **Ley N° 29763** – Ley Forestal y de Fauna Silvestre, dispone sobre la competencia regional forestal y de fauna silvestre, indicando que "El Gobierno Regional es la Autoridad Regional Forestal y de Fauna Silvestre, siendo la Gerencia Regional de Desarrollo Forestal y de Fauna Silvestre, la que se constituye como la Autoridad Regional Forestal y de Fauna Silvestre, conforme lo establece la Ordenanza Regional N° 014-20018-GRL-CR, de fecha 10 de mayo del 2018;

Que, el artículo 137° de la **Ley N° 29763** – Ley Forestal y de Fauna Silvestre, declara de interés nacional la investigación, el desarrollo tecnológico, la mejora del conocimiento y el monitoreo del estado de conservación del patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación; el artículo 138° señala que el estado a través de las entidades educativas de investigación o mediante iniciativas privadas, prioriza, promueve y coordina la investigación básica y aplicada y el artículo 140° de la precitada Ley, señala que la Autoridad Regional Forestal y de Fauna Silvestre, otorga autorizaciones para extracción de recursos forestales y de fauna silvestre con fines de investigación científica, salvo cuando se trate de especies categorizadas como amenazadas, especies consideradas en los Apéndices de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres – CITES o cuando la investigación científica involucre acceso a recursos genéticos, en cuyo caso la autorización es otorgada por el SERFOR;

Que, la Gerencia Regional de Desarrollo Forestal y de Fauna Silvestre, conforme al artículo 183° inciso a) del **Reglamento de Organización y Funciones del Gobierno Regional de Loreto**, tiene las funciones siguientes: Proponer, formular y ejecutar políticas, estrategias, planes y/o normas técnicas y administrativas para el cumplimiento de las funciones en materia de su competencia.

Que, el **artículo 154°** del Reglamento para la gestión forestal, aprobado mediante Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI, establece que la investigación científica del patrimonio forestal se aprueba mediante autorizaciones, salvaguardando los derechos del país respecto a su patrimonio genético nativo. Dichas autorizaciones no requieren del pago de derecho de

trámite. Asimismo, el **artículo 158°** del citado reglamento regula las **obligaciones** materia de cumplimiento por parte del titular de la autorización.

Que, mediante **Resolución de Dirección Ejecutiva N°060-2016-SERFOR/DE**, se aprobó los "Lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre", en cuyo artículo 6.8 dispone lo relacionado a las obligaciones.

6.8 De las obligaciones

Toda persona natural o jurídica que cuente con una autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre, para el cumplimiento de las obligaciones previstas en los Reglamentos de la Ley 29763, debe observar lo siguiente:

a. Contar con la autorización expresa de la comunidad, mediante acta de asamblea comunal, en caso requiera realizar la investigación científica dentro de tierras de comunidades campesinas o comunidades nativas. En caso requiera el ingreso a predios privados, necesita el consentimiento por escrito del propietario.
b. La constancia de depósito del material colectado en una Institución Científica Nacional Depositaria de Material Biológico, debe ser entregada a la autoridad que otorgó la autorización.
c. El reconocimiento al investigador nacional, en las publicaciones, se realiza de acuerdo a la participación que este ha tenido en el desarrollo de la investigación.
d. En caso se requiera enviar al extranjero parte del material colectado, debe contar con el respectivo permiso de exportación otorgado por el SERFOR[1]

Las obligaciones señaladas deben mencionarse en la Resolución que otorga la autorización, a fin que el titular de se encuentre plenamente informado de su cumplimiento.

Que, mediante **Escrito de solicitud S/N,** de fecha 08 de abril de 2021, suscrito por el señor RAFAEL SIMÓN OSWALDO LA ROSA LOLI, identificado con DNI N° 06134564, de nacionalidad peruana, en calidad de Investigador Principal de

[1] Artículo 178 del Reglamento para la Gestión Forestal, aprobado por Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI, y artículo 157 del Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre, aprobado por Decreto Supremo N° 019-2015-MINAGRI.

LORETO GOBIERNO REGIONAL
GOBIERNO REGIONAL DE LORETO
GERENCIA GENERAL REGIONAL
GERENCIA REGIONAL DE DESARROLLO FORESTAL Y FAUNA SILVESTRE
Río Amazonas
"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

RESOLUCION GERENCIAL REGIONAL N° 078 -2021-GRL-GGR-GRDFFS

la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y representante del Proyecto, solicita ante el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre – SERFOR, autorización para realizar investigación científica, fuera de áreas naturales protegidas, con colecta de flora, en el Jardín Botánico Arboretum el Huayo del Centro de Investigación y Enseñanza Forestal (CIEFOR), Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Puerto Almendra, Río Nanay, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, como parte del Proyecto o Estudio titulado "Uso de la biotecnología en la "Cascarilla" Remijia Peruviana Standley especie promisoria para ser usada como antimalárico", por el periodo comprendido entre mayo de 2021 hasta mayo de 2022, para lo cual cumple con adjuntar toda la documentación exigida para este efecto.

Que, mediante **Oficio N° D000032-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF,** con Registro N° 08154, de fecha 15 de abril de 2021, el Ing. ALBERTO MAMANI CAHUANA, Director (e) de la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal – SERFOR, remite a la Gerencia Regional de Desarrollo Forestal y de Fauna Silvestre - GRDFFS, el expediente de solicitud N° 2021-0011272 registrada el 09 de abril de 2021, mediante el cual el señor **Rafael Simón Oswaldo La Rosa Loli,** ha solicitado autorización con fines de investigación científica de flora silvestre, fuera de áreas naturales protegidas, como parte del proyecto de investigación titulado "Uso de la biotecnología en la "Cascarilla" Remijia Peruviana Standley especie promisoria para ser usada como antimalárico", a realizarse en el departamento de Loreto.

Que, mediante **Informe Técnico N° 001-2021-GRL-GGR-GDFFFS-SGGFFS/TJTB**, de fecha 04 de mayo de 2021, emitido por el señor Teddy Jesús Trigozo Barbaran, especialista SGGFFS-GRDFFS se efectúa una evaluación a los documentos presentados por el administrado, concluyendo entre otras, en lo siguiente:

> De la evaluación a la solicitud presentada por el señor Rafael Simón Oswaldo La Rosa Loli, identificado con DNI N° 06134564, de nacionalidad Peruana, en calidad de investigador principal del proyecto denominado *"Uso de la biotecnología en la "Cascarilla" Remijia Peruviana Standley especie promisoria para ser usada como antimalárico"*, en la cual solicita el procedimiento administrativo de otorgamiento de autorización para realizar estudios de investigación científica de flora silvestre incluyendo colecta de muestras de especies forestales, sin contrato de acceso a recursos genéticos, fuera de áreas naturales protegidas, ubicado en el Arboretum el Huayo del Centro de Investigación y Enseñanza Forestal - CIEFOR, Puerto Almendra, ubicado en el Distrito de San Juan Bautista,

Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, donde se concluye lo siguiente:

- Se considera procedente la emisión de la autorización de investigación *"Uso de la biotecnología en la Cascarilla Remijia peruviana Standley especie promisoria para ser usada como antimalárico"* por no presentar superposición, la misma que se encuentran ubicada en el Arboretum el Huayo del Centro de Investigación y Enseñanza Forestal – CIEFOR Puerto Almendra en el distrito San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, debido a que contribuye al conocimiento de los aspectos relacionados a la investigación sobre biotecnología en la Cascarilla Remijia peruviana Standley para ser usada como antimalárico, la cual servirá para el conocimiento académico y científico en la región Loreto y el Perú. El periodo comprendido según el cronograma de actividades del estudio de la investigación científica de flora corresponde desde la fecha de aprobación, extendiéndose hasta el mes de mayo del 2022, donde se observa que cumple con los requisitos solicitados, además que la información presentada esta acorde al desarrollo de la investigación

Asimismo, en relación a los **compromisos adquiridos**, el **citado Informe Técnico**, entre otras, recomienda lo siguiente:

El titular de la investigación y los investigadores considerados en la presente autorización de investigación científica, se comprometen a:

a) Solo en los casos que por razones científicas acotadas se requiera enviar al extranjero parte del material colectado, el titular deberá gestionar el correspondiente permiso de exportación ante el SERFOR, así como proceder al control respectivo. Los ejemplares únicos u holotipos de los grupos taxonómicos colectados, sólo podrán ser exportados en calidad de préstamo.
b) Comunicar a la Autoridad Regional Forestal y de Fauna Silvestre la entrada y salida del campo del personal científico autorizado, así como informar brevemente las acciones ejecutadas y los datos de las colecciones realizadas.
c) Entregar a la Autoridad Regional Forestal y de Fauna Silvestre, un informe anual (incluyendo una versión digital), como resultado de la autorización otorgada, copias del material producido y otros que pueden ser utilizados para difusión del patrimonio forestal.

LORETO GOBIERNO REGIONAL
GOBIERNO REGIONAL DE LORETO
GERENCIA GENERAL REGIONAL
GERENCIA REGIONAL DE DESARROLLO FORESTAL Y FAUNA SILVESTRE
Río Amazonas
"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

RESOLUCION GERENCIAL REGIONAL N°078 -2021-GRL-GGR-GRDFFS

d) Entregar a la Autoridad Regional Forestal y de Fauna Silvestre en un plazo máximo de seis (06) meses de culminada la presente autorización, con copia al SERFOR un ejemplar del informe final en idioma español e idioma original de ser el caso, en versión impresa y digital, producto de la investigación realizada, de acuerdo al ANEXO 1 adjunto a la presente, deberá contener una lista taxonómica de las especies colectadas, en formato Excel y contar con la respectivas coordenadas UTM. Asimismo debe entregar una (01) copia de las publicaciones producto de la investigación científica en formato impreso y digital.
e) Señalar en las publicaciones generadas a partir de la investigación el número de Resolución y el código asignado a la autorización otorgada.
f) Comunicar el ingreso y salida del personal científico a campo, a la Autoridad en materia forestal y de fauna silvestre jurisdiccional correspondiente, en este caso Oficina Desconcentrada Provincial de Maynas.
g) Solicitar de forma anticipada y dentro del plazo de vigencia de la autorización, ante la Autoridad Regional Forestal y de Fauna Silvestre, cualquier cambio en las características de la investigación aprobada y que demanden la modificación de la resolución correspondiente.
h) Retirar todo el material empleado para la ejecución de la investigación autorizada, una vez culminadas las actividades de campo y levantamiento de información.

Que, mediante **Informe Legal N° 032-2021-GRL-GGR-GRDFFS/E.L.-OAJ**, de fecha 04 de junio del 2021, concluye en lo siguiente:

De la evaluación a la solicitud de fecha 08 de abril de 2021, presentado por el señor **RAFAEL SIMÓN OSWALDO LA ROSA LOLI**, identificado con DNI N° 06134564, de nacionalidad peruano, en calidad de investigador principal y responsable del Proyecto titulado "Uso de la biotecnología en la "Cascarilla" Remijia peruviana Standley especie promisoria para ser usada como antimalárico", de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – UNMSM y con lo expuesto en el Informe Técnico N°001-2021-GRL-GGR-GDFFFS-SGGFFS/TJTB, se determina que el referido administrado ha cumplido con presentar todos los requisitos **exigidos** por la Ley Forestal y de Fauna Silvestre N° 29763, el Reglamento para la Gestión Forestal aprobado mediante Decreto Supremo N°018-2015-MINAGRI, y los Lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna

RESOLUCION GERENCIAL REGIONAL N° 078 -2021-GRL-GGR-GRDFFS

silvestre, aprobado mediante Resolución de Dirección Ejecutiva N°060-2016-SERFOR/DE; por lo que corresponde **DECLARAR PROCEDENTE** dicha solicitud, por no presentar superposición, el mismo que se encuentran ubicado en el Jardín Botánico Arboretum el Huayo del Centro de Investigación y Enseñanza Forestal (CIEFOR), Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Puerto Almendra, Río Nanay, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, y emitir la Resolución Gerencial Regional correspondiente, teniendo presente las respectivas recomendaciones

De conformidad con la **Ley N° 29763** - Ley Forestal y de Fauna Silvestre, y sus respectivos **reglamentos**; y en uso de las atribuciones conferidas por la **Ordenanza Regional N° 014-20018-GRL-CR**, y visado por la Oficina de Asesoría Jurídica;

SE RESUELVE:

ARTÍCULO 1°.- AUTORIZAR, al señor **RAFAEL SIMÓN OSWALDO LA ROSA LOLI,** Investigador Principal y Jefe del Proyecto titulado **"Uso de la biotecnología en la "Cascarilla" Remijia peruviana Standley especie promisoria para ser usada como antimalárico"** de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para realizar estudios de investigación científica de flora silvestre con colecta de muestras botánicas (semillas, ramas vegetativas y ramas reproductoras) de especies forestales NO CITES, sin contrato de acceso a recursos genéticos, fuera de áreas naturales protegidas, a desarrollarse en el Jardín Botánico Arboretum el Huayo del Centro de Investigación y Enseñanza Forestal (CIEFOR), Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Puerto Almendra, Río Nanay, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, por el periodo comprendido desde la fecha de aprobación – junio del 2021, extendiéndose hasta el 30 de junio del 2022, **correspondiéndole el Código N°16-LOR-AUT-IFL-2021-001.**

ARTÍCULO 2°.- AUTORIZAR A LOS INVESTIGADORES señalados a continuación a participar del Proyecto de Investigación Científico, titulado "Uso de la biotecnología en la "Cascarilla" Remijia peruviana Standley especie promisoria para ser usada como antimalárico" los mismos que se detalla en el siguiente cuadro:

LORETO
GOBIERNO REGIONAL
GOBIERNO REGIONAL DE LORETO
GERENCIA GENERAL REGIONAL
GERENCIA REGIONAL DE DESARROLLO
FORESTAL Y FAUNA SILVESTRE
Amazonas
"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

RESOLUCION GERENCIAL REGIONAL N° -2021-GRL-GGR-GRDFFS

NOMBRE Y APELLIDOS	NACIONALIDAD	DNI/CE	INSTITUCIÓN
Rafael Simón Oswaldo La Rosa Loli	Peruana	06134564	UNMSM
María Milagros Judith Sánchez Barbachan	Peruana	70424497	UNMSM
Lastenia Ruiz Mesia	Peruana	05274098	UNAP
Camilo Díaz Santibañez	Peruana	06151261	Universidad Peruana Cayetano Heredia - UPCH
Elizabeth Irene Anaya Ramírez	Peruana	07074382	Instituto Nacional de Salud

ARTÍCULO 3°.- La presente autorización, **permite la colección de semillas, ramas vegetativas y ramas reproductoras** que se realizará para evaluar la *Cascarilla Remijia peruviana Standley especie promisoria para ser usada como antimalárico*, las mismas que se detallan a continuación:

ITEM	COLECTA	ESPECIES	CANTIDAD	PARTE DE LA PLANTA
1	Flora	Cascarilla Remijia peruviana Standley	8 kg	Semillas, ramas vegetativas y ramas reproductoras.

ARTÍCULO 4°.- El Titular de la investigación y los investigadores participantes del proyecto "Uso de la biotecnología en la "Cascarilla" Remijia peruviana Standley especie promisoria para ser usada como antimalárico" *en el marco de la normatividad vigente*, **se comprometen a cumplir con las obligaciones** considerados en el artículo 158 del Decreto Supremo N° 018-2915-MINAGRI, en el artículo 6.8 de la Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE y los compromisos que se derivan del Informe Técnico Nº 001-2021-GRL-GGR-GDFFFS-SGGFFS/TJTB, de fecha 04 de mayo de 2021, emitido por el señor Teddy Jesús Trigozo Barbaran, especialista SGGFFS-GRDFFS, las mismas que forman parte de la presente resolución.

ARTÍCULO 5.- La Gerencia Regional de Desarrollo Forestal y de Fauna Silvestre del Gobierno Regional de Loreto, **no se responsabiliza** por accidentes o daños sufridos por el investigador principal y los investigadores participantes durante la ejecución de la investigación, asimismo se reserva el derecho de demandar al titular e investigadores participantes de la autorización sobre los cambios no informados ni consentidos a que hubiese lugar, en caso se formulen ajustes sobre la presente autorización esta deberá ser comunicado a la Gerencia Regional de Desarrollo Forestal y de Fauna Silvestre por escrito y antes de que se ejecuten dichos cambio.

LORETO
GOBIERNO REGIONAL

GOBIERNO REGIONAL DE LORETO
GERENCIA GENERAL REGIONAL
GERENCIA REGIONAL DE DESARROLLO
FORESTAL Y FAUNA SILVESTRE

Río Amazonas

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

RESOLUCION GERENCIAL REGIONAL N° 078 -2021-GRL-GGR-GRDFFS

ARTÍCULO 6.- El incumplimiento de las obligaciones y los compromisos adquiridos por el administrado, podrá ser causal para denegar futuras autorizaciones a nivel institucional.

ARTÍCULO 7°.- Notificar la presente Resolución Gerencial Regional al señor **RAFAEL SIMÓN OSWALDO LA ROSA LOLI**, a la Sub Gerencia de Gestión Forestal y Fauna Silvestre, al Jefe de la Oficina Desconcentrada Provincial de Maynas, así como al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR, para conocimiento y demás fines pertinentes.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y CÚMPLASE

GOBIERNO REGIONAL DE LORETO
Ing. Manuel Angel Tang Rojas
Gerente Regional
Gerencia Regional de Desarrollo Forestal y Fauna Silvestre

Anexo 4. Siembra de las semillas de *Ciliosemina pedunculata* en la cámara de flujo laminar.



Anexo 5. Prueba de Kruskal - Wallis y análisis Post-Hoc de la germinabilidad a nivel de edades 266 vs. 396 para el tratamiento de H_2O con el valor de p=0.0007 para el día 40 después de la siembra.

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
40	H2O	Porcentaje	266	10	73.34	21.08	66.67	10.81	0.0007
40	H2O	Porcentaje	396	10	21.67	24.91	16.67		

Treat.	Ranks	
396	6.15	A
266	14.85	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

Anexo 6. Prueba de Kruskal - Wallis y análisis Post-Hoc de la germinabilidad a nivel de edades 266 vs. 396 para el tratamiento de H_2O + MS + AG_3 con el valor de p=0.0122 para el día 40 después de la siembra.

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
40	H2O + MS + AG3	Porcentaje	266	10	60.00	46.61	83.34	5.14	0.0122
40	H2O + MS + AG3	Porcentaje	396	10	10.00	22.50	0.00		

Treat.	Ranks	
396	7.50	A
266	13.50	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

Anexo 7. Prueba de Kruskal - Wallis de la germinabilidad a nivel de tratamientos H_2O vs. H_2O + MS + AG_3 para las semillas de 266 días de edad con el valor de p=0.8101 para el día 40 después de la siembra.

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
266	40	Porcentaje	H2O	10	73.34	21.08	66.67	0.05	0.8101
266	40	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	60.00	46.61	83.34		

Anexo 8. Prueba de Kruskal - Wallis de la germinabilidad de los tratamientos de H_2O versus H_2O + MS + AG_3 para las semillas de 396 días de edad con el valor de p=0.2117 para el día 40 después de la siembra.

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
396	40	Porcentaje	H2O	10	21.67	24.91	16.67	1.12	0.2117
396	40	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	10.00	22.50	0.00		

Anexo 9. Prueba Kruskal – Wallis de la germinabilidad a nivel de edades 266 vs. 396 para cada uno de los tratamientos: H_2O y H_2O + MS + AG_3, por cada día de evaluación del 10 al 40 DDS, con un valor de p menor a 0.05.

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
10	H2O	Porcentaje	266	10	40.00	30.63	33.33	4.17	0.0284
10	H2O	Porcentaje	396	10	11.67	19.32	0.00		

Treat.	Ranks	
396	7.80	A
266	13.20	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
10	H2O + MS + AG3	Porcentaje	266	10	33.33	35.14	33.33	4.01	0.0181
10	H2O + MS + AG3	Porcentaje	396	10	3.33	10.54	0.00		

Treat.	Ranks	
396	7.85	A
266	13.15	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
15	H2O	Porcentaje	266	10	48.33	22.84	33.33	6.80	0.0055
15	H2O	Porcentaje	396	10	15.00	19.95	0.00		

Treat.	Ranks	
396	7.05	A
266	13.95	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
15	H2O + MS + AG3	Porcentaje	266	10	46.67	45.00	50.00	4.32	0.0144
15	H2O + MS + AG3	Porcentaje	396	10	3.33	10.54	0.00		

Treat.	Ranks	
396	7.75	A
266	13.25	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
20	H2O	Porcentaje	266	10	56.67	27.44	50.00	7.00	0.0051
20	H2O	Porcentaje	396	10	18.33	19.95	16.67		

Treat.	Ranks	
396	7.00	A
266	14.00	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
20	H2O + MS + AG3	Porcentaje	266	10	56.67	44.58	66.67	6.22	0.0046
20	H2O + MS + AG3	Porcentaje	396	10	3.33	10.54	0.00		

Treat.	Ranks	
396	7.20	A
266	13.80	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
25	H2O	Porcentaje	266	10	63.33	24.60	66.67	9.61	0.0013
25	H2O	Porcentaje	396	10	18.33	19.95	16.67		

Treat.	Ranks	
396	6.40	A
266	14.60	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
25	H2O + MS + AG3	Porcentaje	266	10	60.00	46.61	83.34	6.22	0.0045
25	H2O + MS + AG3	Porcentaje	396	10	3.33	10.54	0.00		

Treat.	Ranks	
396	7.20	A
266	13.80	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
30	H2O	Porcentaje	266	10	70.00	24.60	66.67	9.37	0.0016
30	H2O	Porcentaje	396	10	21.67	24.91	16.67		

Treat.	Ranks	
396	6.45	A
266	14.55	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
30	H2O + MS + AG3	Porcentaje	266	10	60.00	46.61	83.34	5.49	0.0095
30	H2O + MS + AG3	Porcentaje	396	10	6.67	14.05	0.00		

Treat.	Ranks	
396	7.40	A
266	13.60	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
35	H2O	Porcentaje	266	10	70.00	24.60	66.67	9.37	0.0016
35	H2O	Porcentaje	396	10	21.67	24.91	16.67		

Treat.	Ranks	
396	6.45	A
266	14.55	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
35	H2O + MS + AG3	Porcentaje	266	10	60.00	46.61	83.34	5.49	0.0095
35	H2O + MS + AG3	Porcentaje	396	10	6.67	14.05	0.00		

Treat.	Ranks	
396	7.40	A
266	13.60	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
40	H2O	Porcentaje	266	10	73.34	21.08	66.67	10.81	0.0007
40	H2O	Porcentaje	396	10	21.67	24.91	16.67		

Treat.	Ranks	
396	6.15	A
266	14.85	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
40	H2O + MS + AG3	Porcentaje	266	10	60.00	46.61	83.34	5.14	0.0122
40	H2O + MS + AG3	Porcentaje	396	10	10.00	22.50	0.00		

Treat.	Ranks	
396	7.50	A
266	13.50	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

Anexo 10. Prueba Kruskal - Wallis de la germinabilidad a nivel de edades 266 vs. 396 para cada uno de los tratamientos: H_2O y H_2O + MS + AG_3, para el día 05 DDS.

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
5	H2O	Porcentaje	266	10	16.67	23.57	0.00	2.29	0.0301
5	H2O	Porcentaje	396	10	0.00	0.00	0.00		

Treat.	Ranks	
396	8.50	A
266	12.50	A

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

DDS	Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
5	H2O + MS + AG3	Porcentaje	266	10	6.67	14.05	0.00	0.57	0.1462
5	H2O + MS + AG3	Porcentaje	396	10	0.00	0.00	0.00		

Anexo 11. Prueba de Kruskal - Wallis de la germinabilidad a nivel de los tratamientos H_2O versus H_2O + MS + AG_3 de las semillas de 266 días de edad con p mayor a 0.05.

Kruskal Wallis Test

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
266	5	Porcentaje	H2O	10	16.67	23.57	0.00	0.69	0.2997
266	5	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	6.67	14.05	0.00		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
266	10	Porcentaje	H2O	10	40.00	30.63	33.33	0.28	0.5775
266	10	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	33.33	35.14	33.33		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
266	15	Porcentaje	H2O	10	48.33	22.84	33.33	0.04	0.8451
266	15	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	46.67	45.00	50.00		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
266	20	Porcentaje	H2O	10	56.67	27.44	50.00	0.01	0.9064
266	20	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	56.67	44.58	66.67		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
266	25	Porcentaje	H2O	10	63.33	24.60	66.67	0.02	0.8748
266	25	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	60.00	46.61	83.34		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
266	30	Porcentaje	H2O	10	70.00	24.60	66.67	0.02	0.8737
266	30	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	60.00	46.61	83.34		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
266	35	Porcentaje	H2O	10	70.00	24.60	66.67	0.02	0.8737
266	35	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	60.00	46.61	83.34		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
266	40	Porcentaje	H2O	10	73.34	21.08	66.67	0.05	0.8101
266	40	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	60.00	46.61	83.34		

Anexo 12. Prueba de Kruskal - Wallis a nivel de los tratamientos H_2O versus H_2O + MS + AG_3 de las semillas de 396 días de edad con p mayor a 0.05.

Kruskal Wallis Test

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
396	5	Porcentaje	H2O	10	0.00	0.00	0.00	0.00	nd
396	5	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	0.00	0.00	0.00		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
396	10	Porcentaje	H2O	10	11.67	19.32	0.00	0.63	0.2548
396	10	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	3.33	10.54	0.00		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
396	15	Porcentaje	H2O	10	15.00	19.95	0.00	1.37	0.1211
396	15	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	3.33	10.54	0.00		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
396	20	Porcentaje	H2O	10	18.33	19.95	16.67	2.40	0.0533
396	20	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	3.33	10.54	0.00		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
396	25	Porcentaje	H2O	10	18.33	19.95	16.67	2.40	0.0533
396	25	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	3.33	10.54	0.00		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
396	30	Porcentaje	H2O	10	21.67	24.91	16.67	1.65	0.1276
396	30	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	6.67	14.05	0.00		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
396	35	Porcentaje	H2O	10	21.67	24.91	16.67	1.65	0.1276
396	35	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	6.67	14.05	0.00		

Edad	DDS	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
396	40	Porcentaje	H2O	10	21.67	24.91	16.67	1.12	0.2117
396	40	Porcentaje	H2O + MS + AG3	10	10.00	22.50	0.00		

Anexo 13. Prueba de Kruskal - Wallis del Tiempo Medio de Germinación a nivel de edades 266 vs. 396 para cada uno de los tratamientos: H_2O y H_2O + MS + AG_3 con el valor de p>0.9999 y p=0.1364 respectivamente.

Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
H2O	MGT	266 días	10	15.55	5.06	14.88	0.00	>0.9999
H2O	MGT	396 días	10	15.75	17.11	13.75		

Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
H2O + MS + AG3	MGT	266 días	10	16.67	13.15	22.50	1.85	0.1364
H2O + MS + AG3	MGT	396 días	10	10.67	22.61	0.00		

Anexo 14. Prueba de Kruskal – Wallis del Tiempo Medio de Germinación a nivel de tratamientos H_2O vs H_2O + MS + AG_3 para cada uno de las edades: 266 y 396 con el valor de p=0.5197 y p=0.3741 respectivamente.

Edad	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
266 días	MGT	H2O	10	15.55	5.06	14.88	0.41	0.5197
266 días	MGT	H2O + MS + AG3	10	16.67	13.15	22.50		

Edad	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
396 días	MGT	H2O	10	15.75	17.11	13.75	0.57	0.3741
396 días	MGT	H2O + MS + AG3	10	10.67	22.61	0.00		

Anexo 15. Prueba de Kruskal - Wallis y análisis Post-Hoc del Índice de Velocidad de Germinación a nivel de edades 266 vs. 396 para cada uno de los tratamientos: H_2O y H_2O + MS + AG_3 con el valor de p=0.0005 y p=0.0103 respectivamente.

Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
H2O	SGI	266 días	10	0.64	0.34	0.57	11.83	0.0005
H2O	SGI	396 días	10	0.15	0.16	0.12		

Treat.	Ranks	
396 días	5.95	A
266 días	15.05	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

Tratamiento	Variable	Edad	N	Means	S.D.	Medians	H	p
H2O + MS + AG3	SGI	266 días	10	0.55	0.47	0.64	5.49	0.0103
H2O + MS + AG3	SGI	396 días	10	0.05	0.11	0.00		

Treat.	Ranks	
396 días	7.40	A
266 días	13.60	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

Anexo 16. Prueba de Kruskal - Wallis del Tiempo Medio de Germinación a nivel de tratamientos H_2O vs H_2O + MS + AG_3 para cada uno de las edades: 266 y 396 con el valor de p=0.8203 y p=0.1412 respectivamente.

Edad	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
266 días	SGI	H2O	10	0.64	0.34	0.57	0.05	0.8203
266 días	SGI	H2O + MS + AG3	10	0.55	0.47	0.64		

Edad	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	H	p
396 días	SGI	H2O	10	0.15	0.16	0.12	1.56	0.1412
396 días	SGI	H2O + MS + AG3	10	0.05	0.11	0.00		

Anexo 17. Restricción mecánica del endospermo a la emergencia de los cotiledones



Anexo 18. Base de datos generada en Excel a partir de los resultados obtenidos

Edad	DDS	Placa	Tratamiento	Sembrados	Germinados	Porcentaje	Transformación
266	5	1	H2O	3	0	0.00	0.00
266	5	2	H2O	3	2	66.67	0.96
266	5	3	H2O	2	0	0.00	0.00
266	5	4	H2O	3	0	0.00	0.00
266	5	5	H2O	3	0	0.00	0.00
266	5	6	H2O	3	0	0.00	0.00
266	5	7	H2O	3	1	33.33	0.62
266	5	8	H2O	3	0	0.00	0.00
266	5	9	H2O	3	1	33.33	0.62
266	5	10	H2O	3	1	33.33	0.62
266	5	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
266	5	2	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
266	5	3	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	5	4	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	5	5	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	5	6	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	5	7	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	5	8	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
266	5	9	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	5	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	5	1	H2O	3	0	0.00	0.00
396	5	2	H2O	2	0	0.00	0.00
396	5	3	H2O	3	0	0.00	0.00
396	5	4	H2O	2	0	0.00	0.00
396	5	5	H2O	2	0	0.00	0.00
396	5	6	H2O	3	0	0.00	0.00
396	5	7	H2O	2	0	0.00	0.00
396	5	8	H2O	3	0	0.00	0.00
396	5	9	H2O	3	0	0.00	0.00
396	5	10	H2O	3	0	0.00	0.00

Edad	DDS	Placa	Tratamiento	Sembrados	Germinados	Porcentaje	Transformación
396	5	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	5	2	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	5	3	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	5	4	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	5	5	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	5	6	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	5	7	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	5	8	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	5	9	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	5	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	10	1	H2O	3	1	33.33	0.62
266	10	2	H2O	3	3	100.00	1.57
266	10	3	H2O	2	0	0.00	0.00
266	10	4	H2O	3	0	0.00	0.00
266	10	5	H2O	3	1	33.33	0.62
266	10	6	H2O	3	2	66.67	0.96
266	10	7	H2O	3	1	33.33	0.62
266	10	8	H2O	3	1	33.33	0.62
266	10	9	H2O	3	1	33.33	0.62
266	10	10	H2O	3	2	66.67	0.96
266	10	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
266	10	2	H2O + MS + AG3	3	2	66.67	0.96
266	10	3	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
266	10	4	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
266	10	5	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	10	6	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	10	7	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
266	10	8	H2O + MS + AG3	3	2	66.67	0.96
266	10	9	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	10	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	10	1	H2O	3	1	33.33	0.62
396	10	2	H2O	2	0	0.00	0.00
396	10	3	H2O	3	0	0.00	0.00
396	10	4	H2O	2	1	50.00	0.79
396	10	5	H2O	2	0	0.00	0.00
396	10	6	H2O	3	0	0.00	0.00
396	10	7	H2O	2	0	0.00	0.00
396	10	8	H2O	3	0	0.00	0.00
396	10	9	H2O	3	0	0.00	0.00
396	10	10	H2O	3	1	33.33	0.62
396	10	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	10	2	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	10	3	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	10	4	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	10	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62

Edad	DDS	Placa	Tratamiento	Sembrados	Germinados	Porcentaje	Transformación
396	10	6	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	10	7	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	10	8	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	10	9	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	10	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	15	1	H2O	3	1	33.33	0.62
266	15	2	H2O	3	3	100.00	1.57
266	15	3	H2O	2	1	50.00	0.79
266	15	4	H2O	3	1	33.33	0.62
266	15	5	H2O	3	1	33.33	0.62
266	15	6	H2O	3	2	66.67	0.96
266	15	7	H2O	3	1	33.33	0.62
266	15	8	H2O	3	1	33.33	0.62
266	15	9	H2O	3	1	33.33	0.62
266	15	10	H2O	3	2	66.67	0.96
266	15	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
266	15	2	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	15	3	H2O + MS + AG3	3	2	66.67	0.96
266	15	4	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	15	5	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	15	6	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	15	7	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
266	15	8	H2O + MS + AG3	3	2	66.67	0.96
266	15	9	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	15	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	15	1	H2O	3	1	33.33	0.62
396	15	2	H2O	2	0	0.00	0.00
396	15	3	H2O	3	0	0.00	0.00
396	15	4	H2O	2	1	50.00	0.79
396	15	5	H2O	2	0	0.00	0.00
396	15	6	H2O	3	0	0.00	0.00
396	15	7	H2O	2	0	0.00	0.00
396	15	8	H2O	3	1	33.33	0.62
396	15	9	H2O	3	0	0.00	0.00
396	15	10	H2O	3	1	33.33	0.62
396	15	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	15	2	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	15	3	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	15	4	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	15	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
396	15	6	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	15	7	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	15	8	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	15	9	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	15	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00

Edad	DDS	Placa	Tratamiento	Sembrados	Germinados	Porcentaje	Transformación
266	20	1	H2O	3	1	33.33	0.62
266	20	2	H2O	3	3	100.00	1.57
266	20	3	H2O	2	2	100.00	1.57
266	20	4	H2O	3	1	33.33	0.62
266	20	5	H2O	3	1	33.33	0.62
266	20	6	H2O	3	2	66.67	0.96
266	20	7	H2O	3	2	66.67	0.96
266	20	8	H2O	3	1	33.33	0.62
266	20	9	H2O	3	1	33.33	0.62
266	20	10	H2O	3	2	66.67	0.96
266	20	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
266	20	2	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	20	3	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	20	4	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	20	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
266	20	6	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	20	7	H2O + MS + AG3	3	2	66.67	0.96
266	20	8	H2O + MS + AG3	3	2	66.67	0.96
266	20	9	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	20	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	20	1	H2O	3	1	33.33	0.62
396	20	2	H2O	2	0	0.00	0.00
396	20	3	H2O	3	1	33.33	0.62
396	20	4	H2O	2	1	50.00	0.79
396	20	5	H2O	2	0	0.00	0.00
396	20	6	H2O	3	0	0.00	0.00
396	20	7	H2O	2	0	0.00	0.00
396	20	8	H2O	3	1	33.33	0.62
396	20	9	H2O	3	0	0.00	0.00
396	20	10	H2O	3	1	33.33	0.62
396	20	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	20	2	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	20	3	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	20	4	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	20	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
396	20	6	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	20	7	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	20	8	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	20	9	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	20	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	25	1	H2O	3	1	33.33	0.62
266	25	2	H2O	3	3	100.00	1.57
266	25	3	H2O	2	2	100.00	1.57
266	25	4	H2O	3	1	33.33	0.62
266	25	5	H2O	3	1	33.33	0.62

Edad	DDS	Placa	Tratamiento	Sembrados	Germinados	Porcentaje	Transformación
266	25	6	H2O	3	2	66.67	0.96
266	25	7	H2O	3	2	66.67	0.96
266	25	8	H2O	3	2	66.67	0.96
266	25	9	H2O	3	2	66.67	0.96
266	25	10	H2O	3	2	66.67	0.96
266	25	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
266	25	2	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	25	3	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	25	4	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	25	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
266	25	6	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	25	7	H2O + MS + AG3	3	2	66.67	0.96
266	25	8	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	25	9	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	25	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	25	1	H2O	3	1	33.33	0.62
396	25	2	H2O	2	0	0.00	0.00
396	25	3	H2O	3	1	33.33	0.62
396	25	4	H2O	2	1	50.00	0.79
396	25	5	H2O	2	0	0.00	0.00
396	25	6	H2O	3	0	0.00	0.00
396	25	7	H2O	2	0	0.00	0.00
396	25	8	H2O	3	1	33.33	0.62
396	25	9	H2O	3	0	0.00	0.00
396	25	10	H2O	3	1	33.33	0.62
396	25	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	25	2	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	25	3	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	25	4	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	25	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
396	25	6	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	25	7	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	25	8	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	25	9	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	25	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	30	1	H2O	3	1	33.33	0.62
266	30	2	H2O	3	3	100.00	1.57
266	30	3	H2O	2	2	100.00	1.57
266	30	4	H2O	3	1	33.33	0.62
266	30	5	H2O	3	2	66.67	0.96
266	30	6	H2O	3	3	100.00	1.57
266	30	7	H2O	3	2	66.67	0.96
266	30	8	H2O	3	2	66.67	0.96
266	30	9	H2O	3	2	66.67	0.96
266	30	10	H2O	3	2	66.67	0.96

Edad	DDS	Placa	Tratamiento	Sembrados	Germinados	Porcentaje	Transformación
266	30	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
266	30	2	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	30	3	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	30	4	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	30	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
266	30	6	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	30	7	H2O + MS + AG3	3	2	66.67	0.96
266	30	8	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	30	9	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	30	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	30	1	H2O	3	1	33.33	0.62
396	30	2	H2O	2	0	0.00	0.00
396	30	3	H2O	3	2	66.67	0.96
396	30	4	H2O	2	1	50.00	0.79
396	30	5	H2O	2	0	0.00	0.00
396	30	6	H2O	3	0	0.00	0.00
396	30	7	H2O	2	0	0.00	0.00
396	30	8	H2O	3	1	33.33	0.62
396	30	9	H2O	3	0	0.00	0.00
396	30	10	H2O	3	1	33.33	0.62
396	30	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	30	2	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	30	3	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	30	4	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	30	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
396	30	6	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	30	7	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
396	30	8	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	30	9	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	30	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	35	1	H2O	3	1	33.33	0.62
266	35	2	H2O	3	3	100.00	1.57
266	35	3	H2O	2	2	100.00	1.57
266	35	4	H2O	3	1	33.33	0.62
266	35	5	H2O	3	2	66.67	0.96
266	35	6	H2O	3	3	100.00	1.57
266	35	7	H2O	3	2	66.67	0.96
266	35	8	H2O	3	2	66.67	0.96
266	35	9	H2O	3	2	66.67	0.96
266	35	10	H2O	3	2	66.67	0.96
266	35	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
266	35	2	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	35	3	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	35	4	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	35	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62

Edad	DDS	Placa	Tratamiento	Sembrados	Germinados	Porcentaje	Transformación
266	35	6	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	35	7	H2O + MS + AG3	3	2	66.67	0.96
266	35	8	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	35	9	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	35	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	35	1	H2O	3	1	33.33	0.62
396	35	2	H2O	2	0	0.00	0.00
396	35	3	H2O	3	2	66.67	0.96
396	35	4	H2O	2	1	50.00	0.79
396	35	5	H2O	2	0	0.00	0.00
396	35	6	H2O	3	0	0.00	0.00
396	35	7	H2O	2	0	0.00	0.00
396	35	8	H2O	3	1	33.33	0.62
396	35	9	H2O	3	0	0.00	0.00
396	35	10	H2O	3	1	33.33	0.62
396	35	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	35	2	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	35	3	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	35	4	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	35	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
396	35	6	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	35	7	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
396	35	8	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	35	9	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	35	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	40	1	H2O	3	1	33.33	0.62
266	40	2	H2O	3	3	100.00	1.57
266	40	3	H2O	2	2	100.00	1.57
266	40	4	H2O	3	2	66.67	0.96
266	40	5	H2O	3	2	66.67	0.96
266	40	6	H2O	3	3	100.00	1.57
266	40	7	H2O	3	2	66.67	0.96
266	40	8	H2O	3	2	66.67	0.96
266	40	9	H2O	3	2	66.67	0.96
266	40	10	H2O	3	2	66.67	0.96
266	40	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
266	40	2	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	40	3	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	40	4	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	40	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
266	40	6	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
266	40	7	H2O + MS + AG3	3	2	66.67	0.96
266	40	8	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	40	9	H2O + MS + AG3	3	3	100.00	1.57
266	40	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00

Edad	DDS	Placa	Tratamiento	Sembrados	Germinados	Porcentaje	Transformación
396	40	1	H2O	3	1	33.33	0.62
396	40	2	H2O	2	0	0.00	0.00
396	40	3	H2O	3	2	66.67	0.96
396	40	4	H2O	2	1	50.00	0.79
396	40	5	H2O	2	0	0.00	0.00
396	40	6	H2O	3	0	0.00	0.00
396	40	7	H2O	2	0	0.00	0.00
396	40	8	H2O	3	1	33.33	0.62
396	40	9	H2O	3	0	0.00	0.00
396	40	10	H2O	3	1	33.33	0.62
396	40	1	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	40	2	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	40	3	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	40	4	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00
396	40	5	H2O + MS + AG3	3	1	33.33	0.62
396	40	6	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	40	7	H2O + MS + AG3	3	2	66.67	0.96
396	40	8	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	40	9	H2O + MS + AG3	2	0	0.00	0.00
396	40	10	H2O + MS + AG3	3	0	0.00	0.00

Leyenda: Edad: Tiempo de almacenamiento de las semillas, **DDS:** Días después de la siembra, **Placa:** número de réplica de placa, **Tratamiento:** H_2O - Solo agua destilada y H_2O + MS + AG_3 - Agua destilada más Medio Murashige & Skoog, **Sembrados:** Cantidad de semillas sembradas, **Germinados:** Cantidad de semillas germinadas, **Porcentaje:** Porcentaje de germinación y **Transformación:** Transformación angular de Bliss de los datos de porcentaje.

Anexo 19. Tabla del Tiempo Medio de Germinación (TMG) y el Índice de Velocidad de Germinación (IVG)

Edad	Placa	Tratamiento	TMG	IVG
266 días	1	H2O	8.33	0.34
266 días	2	H2O	25.48	1.43
266 días	3	H2O	15.00	0.42
266 días	4	H2O	9.76	0.27
266 días	5	H2O	13.33	0.43
266 días	6	H2O	21.67	0.77
4266 días	7	H2O	15.71	0.72
266 días	8	H2O	14.52	0.47
266 días	9	H2O	14.76	0.67
266 días	10	H2O	16.90	0.89
266 días	1	H2O + MS + AG3	0.00	0.00
266 días	2	H2O + MS + AG3	28.89	1.13

Edad	Placa	Tratamiento	TMG	IVG
266 días	3	H2O + MS + AG3	27.22	0.76
266 días	4	H2O + MS + AG3	28.06	0.83
266 días	5	H2O + MS + AG3	8.33	0.18
266 días	6	H2O + MS + AG3	0.00	0.00
266 días	7	H2O + MS + AG3	18.06	0.52
266 días	8	H2O + MS + AG3	26.94	1.01
266 días	9	H2O + MS + AG3	29.17	1.03
266 días	10	H2O + MS + AG3	0.00	0.00
396 días	1	H2O	29.17	0.34
396 días	2	H2O	0.00	0.00
396 días	3	H2O	42.50	0.26
396 días	4	H2O	29.17	0.34
396 días	5	H2O	0.00	0.00
396 días	6	H2O	0.00	0.00
396 días	7	H2O	0.00	0.00
396 días	8	H2O	27.50	0.24
396 días	9	H2O	0.00	0.00
396 días	10	H2O	29.17	0.34
396 días	1	H2O + MS + AG3	0.00	0.00
396 días	2	H2O + MS + AG3	0.00	0.00
396 días	3	H2O + MS + AG3	0.00	0.00
396 días	4	H2O + MS + AG3	0.00	0.00
396 días	5	H2O + MS + AG3	58.33	0.34
396 días	6	H2O + MS + AG3	0.00	0.00
396 días	7	H2O + MS + AG3	48.33	0.11
396 días	8	H2O + MS + AG3	0.00	0.00
396 días	9	H2O + MS + AG3	0.00	0.00
396 días	10	H2O + MS + AG3	0.00	0.00

Leyenda: Edad: Tiempo de almacenamiento de las semillas, **Placa:** número de réplica de placa, **Tratamiento:** H_2O - Solo agua destilada y H_2O + MS + AG_3 - Agua destilada más Medio Murashige & Skoog, **TMG:** Tiempo Medio de Germinación e **IVG:** Índice de Velocidad de Germinación.