



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO INGENIERO AGRÍCOLA**

MODALIDAD: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**RUPTURA DE LA DORMANCIA FÍSICA EN SEMILLAS DE
INTERÉS ECONÓMICO MEDIANTE LA INMERSIÓN EN
NITRÓGENO LÍQUIDO Y SU POSTERIOR CRECIMIENTO
TEMPRANO**

AUTOR:

JOSE HILARION MENDOZA CARRANZA

TUTOR:

ING. FEDERICO DÍAZ TRELLES

CALCETA, FEBRERO 2021

DERECHO DE AUTORÍA

Yo Jose Hilarion Mendoza Carranza, con cédula de ciudadanía 1313776369, declaro bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado: Ruptura de la dormancia física en semillas de interés económico mediante la inmersión en nitrógeno líquido y su posterior crecimiento temprano es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, concedo a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a mi favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación.



JOSE HILARION MENDOZA CARRANZA

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

ING. FEDERICO DÍAZ TRELLES, Mg.Sc, certifico haber tutelado el proyecto **RUPTURA DE LA DORMANCIA FÍSICA EN SEMILLAS DE INTERÉS ECONÓMICO MEDIANTE LA INMERSIÓN EN NITRÓGENO LÍQUIDO Y SU POSTERIOR CRECIMIENTO TEMPRANO**, que ha sido desarrollado por **JOSE HILARION MENDOZA CARRANZA**, previo la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN ESPECIAL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



Firmado electrónicamente por:
**FEDERICO
FERNANDO DIAZ
TRELLES**

ING. FEDERICO DÍAZ TRELLES, M. Sc

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **RUPTURA DE LA DORMANCIA FÍSICA EN SEMILLAS DE INTERÉS ECONÓMICO MEDIANTE LA INMERSIÓN EN NITRÓGENO LÍQUIDO Y SU POSTERIOR CRECIMIENTO TEMPRANO**, que ha sido propuesto, desarrollado por **JOSE HILARION MENDOZA CARRANZA**, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



Firmado electrónicamente por:
**CRISTIAN SERGIO
VALDIVIESO
LOPEZ**

ING. CRISTIAN SERGIO
VALDIVIESO LÓPEZ, Mg.Sc

MIEMBRO



Firmado electrónicamente por:
**SERGIO MIGUEL
VELEZ ZAMBRANO**

ING. SERGIO MIGUEL
VÉLEZ ZAMBRANO, Mg.Sc

MIEMBRO



Firmado electrónicamente por:
**GALO ALEXANDER
CEDENO GARCIA**

ING. GALO ALEXANDER CEDEÑO GARCÍA, Mg.Sc

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día;

A Dios por la bendición de permitir este logro y todos los que me propongo.

A mis padres, José Eduardo Mendoza Ferrín y Gina de Lourdes Carranza Pico por el apoyo incondicional, económico y moral, que sin su apoyo no hubiese sido posible culminar mis estudios universitarios.

Al Ing. Byron Zevallos por su guía inicial en el establecimiento del trabajo.

Al Ing. Federico Díaz, al Ing. Sergio Vélez y a la Ing. Geoconda Alava por impartir sus conocimientos para la ejecución del proyecto.



JOSE HILARION MENDOZA CARRANZA

DEDICATORIA

Quiero dedicar este proyecto en primer lugar a Dios por darme la vida para seguir cumpliendo metas, a mis padres por darme la guía para culminar este camino que día a día he adquirido conocimientos, a mi guía de este proyecto el ING. Byron Zevallos que siempre he tenido su apoyo, a mi tutor el Ing. Federico Díaz y quién dio su apoyo constante el Ing. Sergio Vélez.

De igual manera a mis compañeros que siempre tuve su apoyo tanto moral o físico.



JOSE HILARION MENDOZA CARRANZA

CONTENIDO

DERECHO DE AUTORÍA	II
CERTIFICACIÓN DE TUTOR	III
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	IV
AGRADECIMIENTO	V
DEDICATORIA	VI
CONTENIDO	VII
CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1 PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	2
1.3 OBJETIVOS.....	2
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	2
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
1.4 HIPÓTESIS, PREMISAS Y/O IDEAS A DEFENDER.....	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 SEMILLA.....	4
2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS SEMILLAS.....	5
2.2 DORMANCIA O LATENCIA	6
2.2.1 TIPOS DE LATENCIA.....	7
2.3 MATERIAL VEGETAL A EVALUAR	8
2.3.1 TECA (<i>TECTONA GRANDIS</i> LINN. F.).....	8
2.3.2 TAMARINDO (<i>TAMARINDUS INDICA</i> L.).....	9
2.3.3 MELINA (<i>GMELINA ARBÓREA</i> ROXB.).....	10

2.4	NITRÓGENO LÍQUIDO	10
CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO.....		12
3.1	UBICACIÓN	12
3.2	DURACIÓN	12
3.3	MATERIAL VEGETAL	12
3.4	DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTOS	12
3.5	DISEÑO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS DE DATOS.....	13
3.6	VARIABLES RESPUESTAS.....	13
3.6.1	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS	13
3.6.2	ALTURA DE LA PLANTA A LOS 30 - 60 Y 90 DÍAS (CM)	13
3.6.3	NÚMERO DE HOJAS A LOS 30 - 60 Y 90 DÍAS	13
3.6.4	DIÁMETRO DEL TALLO A LOS 30 - 60 Y 90 DÍAS	13
3.6.5	LONGITUD DE LA RAÍZ A LOS 90 DÍAS (CM).....	14
3.6.6	PESO FRESCO Y SECO DE BIOMASA AÉREA.....	14
3.6.7	PESO FRESCO Y SECO DE LA RAÍZ	14
3.7	MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	14
3.7.1	ADQUISICIÓN DE SEMILLAS	14
3.7.2	CONTENIDO DE HUMEDAD.....	14
3.7.3	INMERSIÓN EN NITRÓGENO LÍQUIDO (-196°C)	15
3.7.4	GERMINACIÓN DE SEMILLAS	15
3.7.5	PREPARACIÓN DEL SUSTRATO.....	15
3.7.6	LLENADO DE FUNDAS.....	15
3.7.7	SIEMBRA.....	15
3.7.8	CONTROL DE MALEZAS.....	15
3.7.9	RIEGO.....	16
3.7.10	CONTROL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES	16

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1 RESULTADOS DE VARIABLES AGRONÓMICAS.....	17
4.1.1 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN (%).....	18
4.1.2 ALTURA DE PLANTA (CM)	19
4.1.3 DIÁMETRO DEL TALLO (MM).....	20
4.1.4 NÚMERO DE HOJAS	21
4.1.5 LONGITUD DE RAÍZ (CM)	22
4.1.6 PESO DE BIOMASA AÉREA (G).....	23
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	25
5.1 CONCLUSIONES.....	25
5.2 RECOMENDACIONES	25
BIBLIOGRAFÍA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ANEXOS.....	34

CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 4.1. Altura de planta, diámetro, N° de hojas, longitud de raíz, peso fresco y seco de biomasa aérea con y sin inmersión en NL. Calceta, Manabí, 2020.....	17
Figura 4.1. Porcentaje de germinación de las semillas de <i>Tamarindus indica</i> mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).	19
Figura 4.2. Altura de planta (cm) de las semillas de <i>Tamarindus indica</i> mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).....	20
Figura 4.3. Diámetro del tallo (mm) de las semillas de <i>Tamarindus indica</i> mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).....	21
Figura 4.4. N° de hojas de las semillas de <i>Tamarindus indica</i> mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).	22
Figura 4.5. Longitud de raíz (cm) de las semillas de <i>Tamarindus indica</i> mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).....	23
Figura 4.6. Peso de biomasa aérea (g) de las semillas de <i>Tamarindus indica</i> mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).	24

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de la exposición al nitrógeno líquido en semillas con latencia prolongada y su crecimiento temprano posterior. El experimento se desarrolló en el vivero de la carrera de Ingeniería Agrícola de la ESPAM MFL desde julio a noviembre del 2020. Los tratamientos evaluados fueron: con inmersión de semillas en Nitrógeno líquido (T1) y sin inmersión de semillas en Nitrógeno líquido (T2). Se utilizó la distribución de “*t de Student*”. Cada tratamiento estuvo conformado por 10 réplicas y 20 unidades experimentales. Las principales variables registradas fueron Altura de planta (cm), Diámetro del tallo (mm), N° de hojas, longitud de raíz (cm) y Peso de biomasa aérea (g). Los resultados en esta investigación determinaron que las semillas con el tratamiento de inmersión en Nitrógeno líquido (NL) incrementó el porcentaje de germinación de semillas de Tamarindo y mostraron diferencias significativas mayores ($p < 0,05$) en longitud de raíz y peso de biomasa aérea. Así mismo, este tratamiento en semillas de tamarindo con NL promovió un aumento en la tasa de crecimiento a los 30 días después de la germinación (DDG) y el diámetro del tallo y el N° de hojas a los 90 DDG. Por otro lado, la inmersión en NL no ayudó a romper la dormancia de las semillas de Teca y de Melina, por ese motivo no germinaron. La inmersión influye en la germinación en semillas de Tamarindo, esto valida la utilidad del NL en el cultivo de Tamarindo.

Palabras clave:

Dormancia física, *Tamarindus indica*, Nitrógeno líquido.

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the effect of exposure to liquid nitrogen on seeds with long dormancy and their subsequent early growth. The experiment was developed in the nursery of the Agricultural Engineering career of ESPAM MFL from July to November 2020. The treatments evaluated were: with immersion of seeds in liquid Nitrogen (T1) and without immersion of seeds in liquid Nitrogen (T2). The "Student's t" distribution was used. Each treatment consisted of 10 replicates and 20 experimental units. The main variables recorded were Plant height (cm), Stem diameter (mm), Number of leaves, root length (cm) and Weight of aerial biomass (g). The results of this research determined that the seeds immersed in liquid nitrogen (LN) increased the percentage of germination of Tamarind seeds and showed greater significant differences ($p < 0.05$) in root length and weight of aerial biomass in the treatment. with seed immersion in (LN). Likewise, this treatment in tamarind seeds with LN promoted an increase in the growth rate at 30 days after germination (DAG) and the diameter of the stem and the number of leaves at 90 DAG. On the other hand, the immersion in LN did not help to break the dormancy of the Teak and Melina seeds, for that reason they did not germinate. Immersion influences germination in Tamarindo seeds, this validates the usefulness of LN in the cultivation of Tamarindo.

Keywords:

Physical dormancy, *Tamarindus indica*, Liquid nitrogen.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 Planteamiento y formulación del problema

La deforestación de bosques nativos en el Ecuador se ha incrementado en los últimos años, según el Ministerio del Ambiente (2017) el Ecuador tiene alrededor de 12 631 198 hectáreas de bosque nativos y aproximadamente la mitad están bajo algún tipo de protección, sin embargo, la tasa de deforestación anual neta es de un estimado de 61 112 hectáreas desde el período 2014-2016, la que presenta un incremento del 28.7% a comparación del periodo 2008-2014.

En el mundo se han realizado programas para recuperar los bosques de manera natural, pero Robertson (2002) nos manifiesta que, la recuperación natural de los bosques en algunas especies es complicada ya que casi todas las semillas presentan algún grado de reposo, lo que hace difícil una adecuada germinación debido a la latencia física como uno de los problemas primordiales. La principal causa que evita la germinación de la semilla es un pericarpio grueso y duro que limita la absorción de agua y oxígeno para permitir el desarrollo de las células del embrión (Masilamani y Dharmalingam, 1998).

Entre las técnicas utilizadas para el aumento de la germinación existen varias como alternancia de temperaturas, imbibición en agua, escarificación física y química y tratamientos con otras sustancias como ácido giberélico y ácido sulfúrico, las cuales demuestran un limitado porcentaje de germinación y no permiten aplicarlo en grandes volúmenes en el caso de la escarificación física. Casualmente, la latencia física se ha roto en muestras de control en crioconservación según Zevallos *et al.* (2014), y Arguedas *et al.* (2018), ambos investigadores manifiestan que la exposición a Nitrógeno líquido (-196°C) puede alterar la germinación y el crecimiento temprano de plántulas en especies de cultivos como en el tomate silvestre y el maíz.

Por lo anteriormente descrito se plantea la siguiente interrogante:

¿El efecto de la exposición al nitrógeno líquido influirá en la germinación y su posterior crecimiento temprano en semillas de teca, melina y tamarindo?

1.2 Justificación

Para potenciar los programas de reforestación en el Ecuador es preciso implementar nuevas técnicas que involucren mejorar la germinación y crecimiento de las plantas sembradas a partir de semillas que poseen dificultades en su germinación debido a que poseen un alto grado de dormancia. Para mejorar el proceso se considera aplicar una técnica para acelerar la ruptura de la testa y por esa vía romper la dormancia física de las semillas, facilitando la emergencia de las plántulas. En anteriores investigaciones se describe en detalle que semillas con vistas a su crioconservación en nitrógeno líquido (-196°C) mejoran la productividad de planta en términos de crecimiento (Acosta *et al.*, 2019). Sin embargo, debido a no haber estudios publicados sobre los efectos de la germinación, y el crecimiento estimulado por el nitrógeno líquido para las especies propuestas y de testa dura, se imposibilita establecer si existen beneficios que permitan incrementar los aspectos positivos que la inmersión y la técnica permiten. En este sentido, se propone el siguiente experimento con la finalidad de evaluar el comportamiento de las semillas expuesta a nitrógeno líquido.

1.3 Objetivos

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la exposición al nitrógeno líquido en semillas con latencia prolongada y su crecimiento temprano posterior.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el efecto que ejerce el nitrógeno líquido sobre la dormancia física de las semillas.
- Determinar el efecto que ejerce el nitrógeno líquido sobre el crecimiento temprano posterior a la inmersión.

1.4 Hipótesis, premisas y/o ideas a defender

La exposición de las semillas al nitrógeno líquido acelera el proceso de germinación y el posterior crecimiento temprano de las especies forestales evaluadas.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 SEMILLA

Las semillas son la unidad de reproducción sexual de las plantas y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen, siendo uno de los elementos más eficaces para que esta se disperse en tiempo y espacio, constituyen el mecanismo de perennización por el que las plantas perduran generación tras generación (Doria, 2010).

La diversidad de formas, tamaños, estructura anatómica e histológica y manifestaciones de los procesos fisiológicos es enorme, por lo que también lo es la variabilidad en la longevidad potencial y ecológica que estas características determinan.

Según Vázquez *et al.* (1997) a pesar de la gran diversidad y complejidad de estructuras y funcionamientos es posible concebir algunas generalizaciones y señalar cuáles son las características de las semillas que más directamente afectan su longevidad potencial, ya que la longevidad ecológica, o sea la que se da en la comunidad natural, no solamente depende de la estructura de las semillas, sino de factores externos que pueden variar de un lugar a otro y afectar de diferente manera a una misma especie de semillas.

Estas características intrínsecas son: la dureza e impermeabilidad de la testa o cubiertas de la semilla; el contenido de agua inicial con el que se disemina la semilla y el que se puede lograr disminuir por deshidratación sin matarla; la tolerancia a la temperatura de congelación del agua, ya que los cristales de hielo de ésta pueden alterar las células de la semilla; la naturaleza de la latencia, la tasa metabólica o respiración mínima o interrumpida que se pueda alcanzar sin matarla; el tipo de reservas y su propensión al deterioro químico; el tipo de compuestos secundarios (sustancias que produce la semilla que pueden evitar la depredación o el parasitismo de éstas) y su ubicación dentro de las células de la semilla; la

disposición del agua subcelular, o sea la que está unida a macromoléculas como proteínas, que forman las células; la composición de los lípidos (grasas) de las membranas celulares; la resistencia a la invasión de microorganismos y la resistencia al deterioro del material genético (Vázquez *et al.*, 1997).

2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS SEMILLAS

Iriondo (2001) clasifica a las semillas en función de su tolerancia a la desecación en:

- **Ortodoxas o tolerantes a la desecación:** Según Méndez *et al.* (2013) las semillas ortodoxas son más tolerantes que las recalcitrantes, siendo capaces de ser almacenadas y permanecer viables por años, los mecanismos de tolerancia a la desecación permiten a las plantas sobrevivir a cambios ambientales poco favorables, pueden ser almacenadas a bajos contenidos de humedad (3-5%) y temperatura (-20°C). A lo largo de la evolución, esta tolerancia fue adquirida durante el desarrollo de las semillas y es considerada necesaria para completar el ciclo de vida de las plantas ortodoxas. La adquisición de la tolerancia a la desecación implica procesos celulares como la acumulación de disacáridos y oligosacáridos, biosíntesis de proteínas (LEA y de choque térmico “heat-shock”), la activación de defensas antioxidantes, cambios en la estructura física de la célula y un incremento gradual en la densidad (Angelovici *et al.*, 2010)
- **Recalcitrantes o sensibles a la desecación:** Las semillas recalcitrantes son altamente susceptibles al daño por desecación y bajas temperaturas y por lo tanto no pueden almacenarse en las mismas condiciones que las ortodoxas, estas no toleran deshidrataciones por debajo de un contenido de humedad relativamente alto (12-31%). Las semillas recalcitrantes tolerantes a la desecación y al frío son las que cuentan con elementos de protección anteriormente mencionados (LEA, sHSP, azúcares, etc.) y en presencia de un contenido hídrico óptimo, estos elementos no son

pertinentes para el desarrollo y germinación de las semillas recalcitrantes (Méndez *et al.*, 2013).

- **Intermedias:** Según González y Engelmann (2013) Presentan conductas de almacenamiento entre las ortodoxas y las recalcitrantes. Pueden ser desecadas a contenidos de humedad similares a los de las semillas ortodoxas. Sin embargo, las semillas, una vez desecadas, se dañan al someterlas a bajas temperaturas y su viabilidad desciende rápidamente durante el almacenamiento. Estas toleran la disminución del contenido de agua hasta valores relativamente bajos, pero el proceso de congelación les causa daños irreversibles. Así, estas especies que poseen semillas recalcitrantes o clasificadas como intermedias solo pueden ser almacenadas a corto plazo y su conservación a largo plazo es todavía un gran desafío.

2.2 DORMANCIA O LATENCIA

Varela y Arana (2010) mencionan que la palabra latencia proviene del latín “*latensis*” y significa oculto, escondido o aparentemente inactivo para referirse a esta incapacidad de la semilla a germinar.

La latencia, dormancia o letargo, es un estado natural que se genera en las semillas durante sus procesos evolutivos y que sucede con un fin específico: servir como mecanismo de supervivencia o adaptación frente a ciertas condiciones ambientales o de sitio que se dan en la naturaleza, las semillas pueden mantenerse en este estado durante mucho tiempo, en algunas especies durante muchos años. Una combinación de factores externos como luz, agua, temperatura y sustancias químicas pueden terminar el periodo de dormancia. La dormancia, o más bien, la salida de la dormancia puede estar controlada por el embrión, por el endospermo, por la cubierta o por una combinación de estos (Portales, 2015).

2.2.1 TIPOS DE LATENCIA

Según Willan (1991) la latencia puede ser de varios tipos distintos, y a veces la misma semilla presenta más de un tipo. La clasificación más sencilla distingue entre:

a) Latencia exógena o del pericarpo/cubierta seminal

- Latencia física. Característica de un gran número de especies de plantas, en las cuales la cubierta seminal o secciones endurecidas de otras cubiertas de la semilla son impermeables. El embrión está encerrado dentro de una cubierta impermeable que puede preservar las semillas con bajo contenido de humedad durante varios años, aún con temperaturas elevadas.
- Latencia mecánica. En esta categoría las cubiertas de las semillas son demasiadas duras para permitir que el embrión se expanda durante la germinación. Probablemente este factor no es la única causa de la latencia, ya en la mayoría de los casos se combina con otros tipos para retardar la germinación.
- Latencia química. Corresponde a la producción y acumulación de sustancias químicas que inhiben la germinación, ya sea en el fruto o en las cubiertas de las semillas.

b) Latencia endógena o del embrión

Se presenta en aquellas familias de plantas, cuyas semillas, de manera característica en el embrión, no se han desarrollado por completo en la época de maduración. Como regla general, el crecimiento del embrión es favorecido por temperaturas cálidas, pero la respuesta puede ser complicada por la presencia de otros mecanismos de letargo. Dentro de esta categoría hay dos grupos:

- Embriones rudimentarios. Se presenta en semillas cuyo embrión es apenas algo más que un proembrión embebido en un endosperma, al momento de la maduración del fruto. También en el endosperma existen inhibidores

químicos de la germinación, que se vuelven en particular activos con altas temperaturas.

- Embriones no desarrollados. Algunas semillas, en la madurez del fruto tienen embriones poco desarrollados, con forma de torpedos, que pueden alcanzar un tamaño de hasta la mitad de la cavidad de la semilla. El crecimiento posterior del embrión se efectúa antes de la germinación.

c) Latencia endógena fisiológica

El periodo se presenta en el interior de los tejidos, por dos fenómenos principalmente, el primero, ocasionado por la semipermeabilidad en las cubiertas de las semillas, y el segundo, por la dormancia del embrión. Específicamente, este grupo se divide en cuatro categorías dependiendo de la debilidad o fuerza del mecanismo inhibitor.

Latencia fisiológica: mecanismo fisiológico inhibitor que impide la germinación.

- Latencia superficial: mecanismo inhibitor débil.
- Latencia intermedia: mecanismo inhibitor intermedio.
- Latencia profunda: mecanismo inhibitor fuerte.

2.3 MATERIAL VEGETAL A EVALUAR

Se eligieron las siguientes semillas por su interés económico que tienen actualmente, por otra parte, también fueron seleccionadas ya que presentan latencia física, lo cual es una de las interrogantes por las que se realiza el trabajo, a continuación, se presentan generalidades de las semillas a evaluar:

2.3.1 TECA (*Tectona grandis* Linn. f.)

Según Robertson (2002) manifiesta que todas las semillas de teca muestran un cierto grado de latencia lo que hace difícil una adecuada germinación. Los bajos porcentajes de germinación se han atribuido a diferentes factores: un pericarpo grueso que limita la absorción de agua y oxígeno que no se ablanda lo suficiente

para permitir el desarrollo de las células del embrión por parte de la semilla, inmadurez fisiológica de la semilla, inhibidores químicos presentes en el pericarpo y desbalances hormonales después de la maduración (Monge, 2011). Chaves y Fonseca (1991) manifiestan que la semilla de teca presenta latencia pronunciada y según Ramírez *et al.* (2003) mencionan que el grueso y duro pericarpio de la semilla obstaculiza la germinación y una parte considerable de las semillas frescas permanecen latentes durante el primer año.

Abdelnour *et al.* (2007) manifiestan que los porcentajes de germinación mostrados por esta especie después del congelamiento en NL fueron muy cercanos al 50% mientras las que no fueron sometidas a NL tuvieron del 20% al 40% de germinación, la cual fue inferior a las congeladas con NL por Hine *et al.* (2013) que obtuvieron resultados en el porcentaje de germinación para las semillas congeladas con NL del 84% y para las no congeladas de 92% el cual es mayor al de las congeladas con NL.

2.3.2 TAMARINDO (*Tamarindus indica* L.)

Las semillas de tamarindo presentan latencia exógena de tipo física, específicamente en el pericarpo o parte externa de la semilla, la testa de la semilla es dura e impermeable al agua; lo que les confiere una dificultad para embeberse e inducir rápidamente la germinación (Pérez, 2016). Según Vílchez (1986), las semillas son grandes, ovaladas, aplanadas, de color café y de casi un centímetro de longitud, unidas entre sí por fibras que se encuentran en la pulpa que rodea la testa. Dicha testa es extremadamente dura e impermeable, lo que impide la germinación, hasta que una modificación estructural permita la hidratación del embrión. La cubierta de la semilla, suele ser generalmente una envoltura dura, con una cutícula lipídica o cética, que junto con una o varias capas de células protectoras, le confiere un mayor o menor grado de impermeabilidad al agua y los gases, que hace de ésta una estructura muy importante en el control de la germinación.

Arguedas (2014) menciona que el porcentaje de germinación de las semillas de soja, de la familia Fabaceae igual que el tamarindo, no presentaron diferencias significativas para la germinación bajo el almacenamiento en NL, pero si hubo cambios en pérdida de electrolitos, en los niveles de pigmentos de clorofila, malondialdehídos, compuestos fenólicos y actividad peroxidasa.

2.3.3 MELINA (*Gmelina arborea* Roxb.)

La semilla de la melina se considera ortodoxa (Ramirez *et al.*, 2007). Su semilla es de 12 a 25 mm de largo, de testa dura (Simbaña, 2016). La semilla de esta especie se encuentra formando parte del endocarpio del fruto, son de forma elipsoidal, comprimidas, de 7- 9 mm de largo; testa color café, lisa, opaca, membranosa, muy delgada; el embrión es recto comprimido de color amarillo crema que ocupa toda la cavidad de la semilla; los cotiledones son dos, grandes, planos, carnosos, y elipsoidales; la radícula es inferior corta (Ramos, 2015).

Arrieta (2010), en los resultados obtenidos en el porcentaje de germinación de las semillas utilizando el método de inmersión directa a nitrógeno líquido (NL) (-196°C) manifestaron que afectó tanto como a la germinación como a su viabilidad. Abdelnour *et al.* (2007) en estudios de crioconservación manifiestan en sus resultados que la emergencia de semillas en NL a comparación del testigo mostró menor porcentaje de germinación después de su emergencia.

2.4 NITRÓGENO LÍQUIDO

Según Melendres (2012) el nitrógeno puro en estado líquido a una temperatura igual o menor a su temperatura de ebullición, que es de -195,8 °C a una presión de una atmósfera. El nitrógeno líquido es incoloro e inodoro. Su densidad en el punto triple es de 0,707 g/ml.

Según Sucuytana (2019) el nitrógeno líquido es una fuente de fácil transporte y su capacidad para mantener temperaturas muy por debajo del punto de congelación

del agua hace que sea muy útil en una amplia gama de aplicaciones, principalmente como un ciclo abierto de refrigerante, incluyendo:

- Para almacenar células de muestra en un laboratorio.
- En criogenia.
- Para preservar muestras de tejido de extirpaciones quirúrgicas para futuros estudios.
- Para conservación de sangre, esperma, ovarios u otra clase de muestras.

En la crioconservación según González y Engelmann (2013) impone una serie de condiciones de estrés en el material vegetal, que podrían inducir modificaciones en los cultivos crioconservados y en las nuevas plantas regeneradas. En una investigación se observaron efectos altamente significativos debido a la exposición al nitrógeno líquido, en las hojas encontraron mayores niveles de actividades enzimáticas y específicas de peroxidasa y fenólicos ligados a la pared celular, también registraron efectos muy notables, en las raíces como la disminución del contenido de clorofilas y fenólicos ligados a la pared celular (Zevallos *et al.*, 2014), lo cual hace mucho más atractivo esta investigación.

CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 UBICACIÓN

La investigación se desarrolló en el vivero de la carrera de Ingeniería Agrícola de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, situada en el sitio El Limón, parroquia Calceta, cantón Bolívar, provincia de Manabí, ubicado geográficamente en las coordenadas 0° 49' 11" de Latitud Sur y 80° 10' 45" de Longitud Oeste con una elevación de 16 m.s.n.m.

3.2 DURACIÓN

El experimento se desarrolló en el periodo de julio del 2020 a noviembre del 2020 con una duración de 5 meses.

3.3 MATERIAL VEGETAL

Semilla de Teca (*Tectona grandis* Linn. f.)

Semilla de Tamarindo (*Tamarindus indica* L.)

Semilla de Melina (*Gmelina arborea* Roxb.)

3.4 DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTOS

Con cada especie vegetal (Teca, Tamarindo y Melina) se desarrolló un experimento separado, donde se probó el efecto de dos tratamientos

T1: Con inmersión de semillas en Nitrógeno líquido

T2: Sin inmersión de semillas en Nitrógeno líquido

3.5 DISEÑO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS DE DATOS

Para comparar el efecto de los tratamientos se utilizó la distribución de “*t* de Student” para muestras pareadas donde se probó la hipótesis nula $H_0: T_1=T_2$ y la alternativa $H_1: T_1 \neq T_2$, a un nivel de significancia del 5% de probabilidad de error. El cálculo del estadístico de *t* se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$T \text{ calculada} = \frac{\bar{d}}{S_{\bar{d}}} \quad \text{Donde:}$$

T= Estadística

\bar{d} = Media de las diferencias

$S_{\bar{d}}$ = Error estándar de las diferencias

Cada tratamiento estuvo conformado por 10 réplicas ($n=10$), por lo que en total se obtuvieron 20 unidades experimentales. Cada unidad experimental se conformó de 20 plantas.

3.6 VARIABLES RESPUESTAS

3.6.1 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS

El porcentaje de germinación se determinó con la fórmula:

$$\% \text{ de germinación} = \frac{\text{número de semillas germinadas}}{\text{número total de semillas}} * 100$$

3.6.2 ALTURA DE LA PLANTA A LOS 30 - 60 Y 90 DÍAS (cm)

Este dato se tomó cada 30 días, se midió la altura de la planta con una cinta métrica desde la base del tallo hasta el extremo de la última hoja.

3.6.3 NÚMERO DE HOJAS A LOS 30 - 60 Y 90 DÍAS

Se contabilizó el número de hojas cada 30 días a partir del día de siembra.

3.6.4 DIÁMETRO DEL TALLO A LOS 30 - 60 Y 90 DÍAS

Se midió el diámetro del tallo en milímetros (mm) cada 30 días utilizando un calibrador.

3.6.5 LONGITUD DE LA RAÍZ A LOS 90 DÍAS (cm)

Se midió la longitud en centímetros (cm), desde el cuello (unión de la raíz y el tallo) hasta el extremo más largo a los 90 días.

3.6.6 PESO FRESCO Y SECO DE BIOMASA AÉREA

Se obtuvo el peso fresco de la biomasa aérea (BA) separando la parte aérea de la planta de las raíces, luego para el peso seco de la materia verde fue colocado en una estufa a 70°C por 48 horas hasta alcanzar peso constante, se registrará el peso de ambas en gramos (g) por medio de una balanza de precisión.

3.6.7 PESO FRESCO Y SECO DE LA RAÍZ

Se obtuvo el peso fresco de las raíces separando las raíces de la parte aérea de la planta, luego para el peso seco de la raíz fue colocado en una estufa a 70°C por 48 horas hasta alcanzar peso constante, se registrará el peso de ambas en gramos (g) por medio de una balanza de precisión.

3.7 MANEJO DEL EXPERIMENTO

3.7.1 ADQUISICIÓN DE SEMILLAS

Se obtuvieron las semillas de las especies a utilizar considerando que provengan de plantaciones de similar edad y tiempo de cosecha, se las recolectó limpiando el suelo alrededor de los árboles y eliminando toda semilla vieja.

3.7.2 CONTENIDO DE HUMEDAD

Se obtuvieron 3 muestras de 10 semillas cada una, las cuales fueron tomadas y se deshidrataron dentro de una estufa, que se mantuvo a una temperatura de 130°C durante 2 horas. El contenido de humedad de las semillas se calculó a través de la fórmula

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} * 100$$

3.7.3 INMERSIÓN EN NITRÓGENO LÍQUIDO (-196°C)

Para las semillas de Melina y Tamarindo se despulparon, y se las lavó con agua para retirar la pulpa y el mucílago, unas veces con un contenido de humedad adecuado, incluyendo la teca, se colocaron las semillas en Nitrógeno líquido durante 10 minutos, posteriormente a su inmersión se dejó a temperatura ambiente y se procedió a instalar el ensayo.

3.7.4 GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Se utilizaron 10 semillas de cada especie en estudio, luego se procedió a colocarlas en papel toalla humedecido con agua destilada y fueron envueltas y sujetadas con una liga como menciona el Manual para manejo de semillas en banco de germoplasmas (Rao *et al.*, 2007). Germinado el 51% de las semillas, se realizó un conteo manual para determinación de las semillas germinadas por cada una de las muestras. El momento de germinación fue la emisión de la radícula.

3.7.5 PREPARACIÓN DEL SUSTRATO

En la preparación se realizó un mezclado de sustrato el cual estuvo compuesto por tierra en un 40%, 40% de humus y 20% de cascarilla de arroz proporción 2:2:1.

3.7.6 LLENADO DE FUNDAS

Esta actividad se la realizó utilizando fundas negras de polietileno de medidas 6x8 cm con perforaciones para el drenaje y una capacidad de sustrato de 2 libras.

3.7.7 SIEMBRA

Se realizó de forma manual, donde se colocó una semilla por funda, a una profundidad de 2cm.

3.7.8 CONTROL DE MALEZAS

Se controló manualmente, donde dependió de la agresividad y del tamaño de las mismas.

3.7.9 RIEGO

El riego se lo realizó de acuerdo a las necesidades hídricas del vivero.

3.7.10 CONTROL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES

El control de plagas y enfermedades se realizó en base a los umbrales críticos en vivero.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS DE VARIABLES AGRONÓMICAS

Para semillas de Teca (*Tectona grandis* Linn.) y Melina (*Gmelina arborea* Roxb.) no manifestaron niveles germinativos para ninguno de los tratamientos (con la inmersión en NL y sin la inmersión en NL). Los datos discrepan con los de Mendez *et al.* (2008) que obtuvieron una germinación mínima de 76.8% en semillas de algodón, entre las variables enrollado y sin enrollar el papel toallín.

López (2016) recomienda someter las semillas de teca a tratamientos pregerminativos antes de sembrarlas, ya que, si no se tratan la germinación es muy errátil. A su vez, Doria (2010) menciona que las semillas endógenas con latencia embrionaria son incapaces de germinar incluso si es aislado el embrión de la semilla y colocando en condiciones favorables.

En el cuadro 4.1. para semillas de tamarindo se representa el análisis estadístico para la prueba de T de student de las variables altura, diámetro, número de hojas, longitud de raíz, peso de biomasa fresca y seca presentó diferencias estadísticas, mientras que las variables altura de planta a los 60 y 90 DDG, diámetro del tallo y número de hojas a los 30 y 60 DDG, peso fresco y seco de raíz a los 90 DDG no se obtuvo diferencias.

Cuadro 4.1. Altura de planta, diámetro, N° de hojas, longitud de raíz, peso fresco y seco de biomasa aérea con y sin inmersión en NL. Calceta, Manabí, 2020.

Variables	DDG	Medias de tratamiento		\bar{d}	T estadístico	Valores críticos de t		p-valor
		Con NL	Sin NL			T0.05	T0.01	
Altura (cm)	30	10.10	8.34	1.76	4.08	1.68	2.02	0.0002
	60	23.41	24.41	-1.00	-0.99	1.68	2.02	0.3270
	90	42.38	40.75	1.63	0.98	1.68	2.02	0.3313
Diámetro (mm)	30	2.07	2.09	-0.02	-0.23	1.68	2.02	0.8194
	60	2.66	2.89	-0.23	-1.90	1.68	2.02	0.0647
	90	4.12	3.57	0.55	2.96	1.68	2.02	0.0052

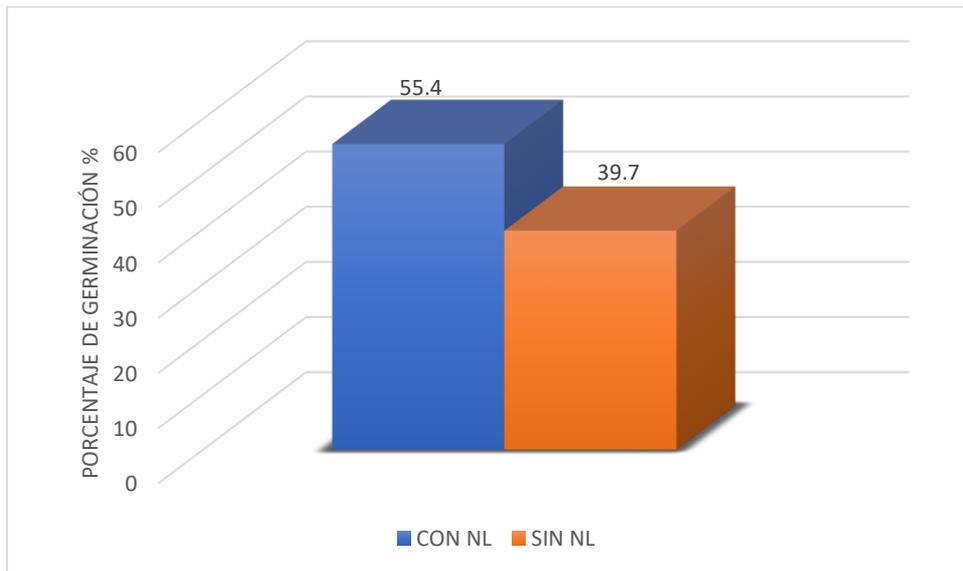
Variables	DDG	Medias de tratamiento		\bar{d}	T estadístico	Valores críticos de t		p-valor
		Con NL	Sin NL			T0.05	T0.01	
Nº de hojas	30	5.15	4.88	0.27	1.20	1.68	2.02	0.2375
	60	10.95	10.88	0.07	0.16	1.68	2.02	0.8718
	90	23.80	19.48	4.32	3.16	1.68	2.02	0.0030
Longitud de raíz (cm)	90	25.50	23.35	2.15	3.18	1.68	2.02	0.0028
Peso fresco de BA (g)	90	8.42	7.04	1.38	2.34	1.68	2.02	0.0245
Peso seco de BA (g)	90	2.70	2.06	0.64	3.04	1.68	2.02	0.0042

DDG (Días después de la germinación)

4.1.1 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN (%)

La variable porcentaje de germinación de semillas de tamarindo presentó diferencias significativas entre los dos tratamientos bajo estudio ya que se aumentó con la inmersión al NL, como se puede observar en el Figura 4.1. que el tratamiento con NL obtuvo 55.4% de germinación en relación al tratamiento sin NL que obtuvo 39.7%. Los datos concuerdan con Acosta *et al.* (2019) que indican que la inmersión de semillas de *Teramnus labialis* (L.F.) en nitrógeno líquido rompe la latencia física y aumenta la tasa de emergencia de las plántulas, de la misma forma, coincide con Mira *et al.* (2017) que obtuvieron altos porcentajes de germinación después de un pretratamiento a -20°C durante 24 horas en NL, y con González *et al.* (1997) que al realizar criopreservación durante 30 días, se observó un incremento significativo en la germinación de las semillas de *Medicago sativa* incluso aumentó en *Helonias bullata* L (Perullo *et al.*, 2015) y también mejoró en *Xyris tennesseensis* Kral (Johnson *et al.*, 2012). En contraste con lo descrito Cardoso *et al.* (2000) discrepan al no reportar diferencias significativas en la germinación de 19 leguminosas ya que fue heterogénea y en otras 6 especies fue más bajo el porcentaje de germinación.

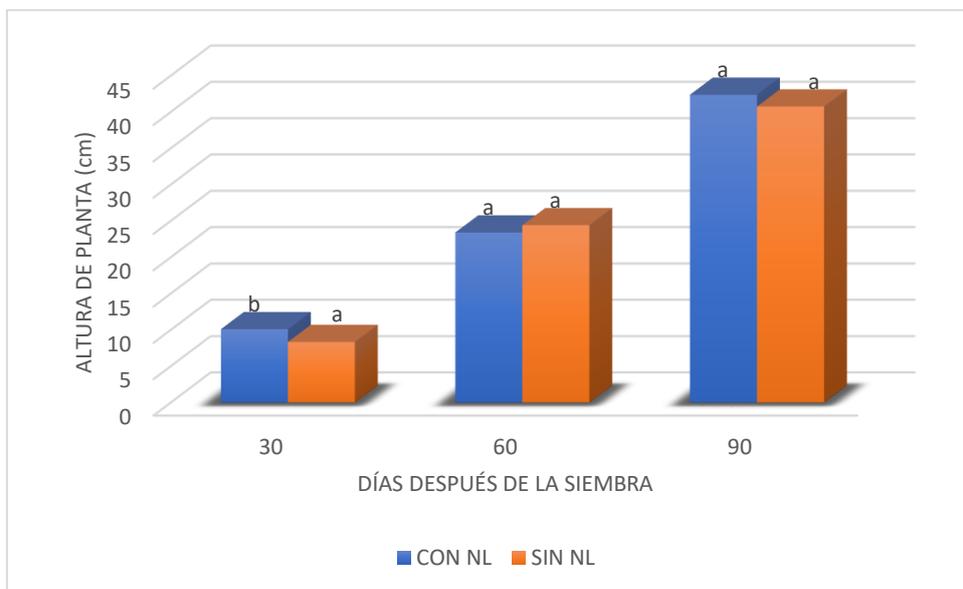
Figura 4.1. Porcentaje de germinación de las semillas de *Tamarindus indica* mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).



4.1.2 ALTURA DE PLANTA (cm)

En la figura 4.2. el tratamiento con inmersión en NL estimuló el crecimiento en altura de planta a los 30 DDG, sin embargo, a los 60 y 90 días no existieron diferencias significativas con el tratamiento sin NL. Estos datos discrepan con los de Arguedas *et al.* (2018) que manifiestan que existió un retraso en el crecimiento en plántulas recuperadas de semillas crioconservadas, mientras que Zevallos *et al.* (2014) no observaron diferencias entre las muestras criopreservadas y no criopreservadas en *Solanum lycopersicum* silvestre.

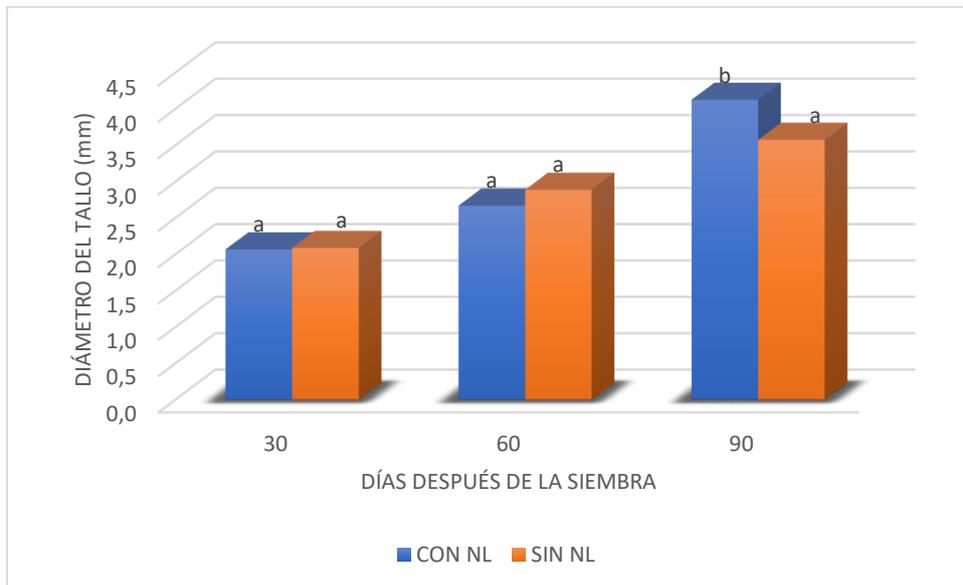
Figura 4.2. Altura de planta (cm) de las semillas de *Tamarindus indica* mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).



4.1.3 DIÁMETRO DEL TALLO (mm)

En la figura 4.3. el tratamiento con inmersión en NL fue influenciado a los 90 DDG por la inmersión en NL, mientras que a los 30 y 60 DDG el diámetro no manifestó diferencias significativas con el tratamiento sin NL. Estos datos no concuerdan con los de Martínez *et al.* (2005) que indican que no hay diferencias significativas en el diámetro de los tallos, longitud de tallos y la cantidad de tallos de plantas de caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híbrido) obtenidas a partir de callos con estructuras embriogénicas crioconservadas entre el origen de la cepa de la planta sea crioconservada o no crioconservada.

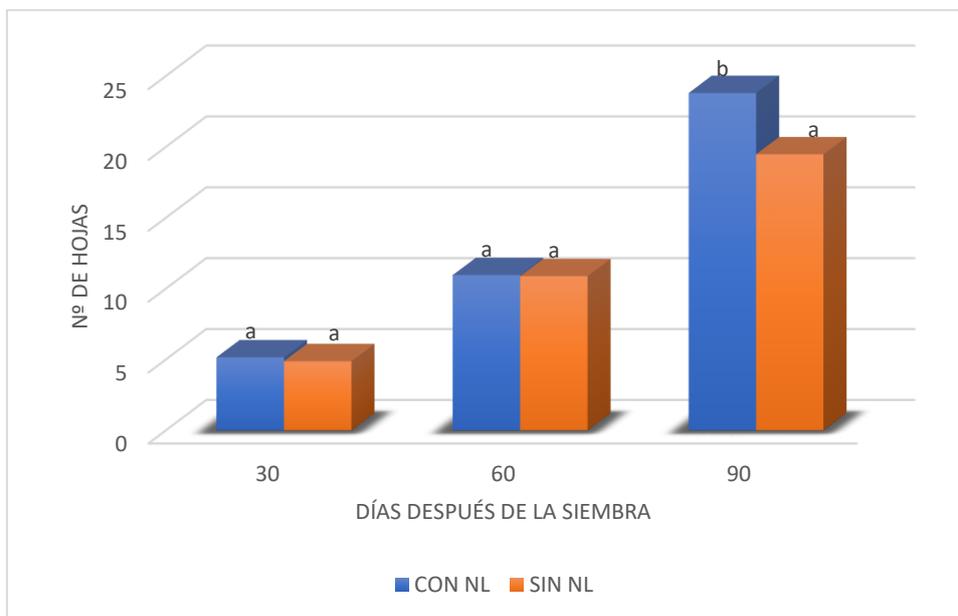
Figura 4.3. Diámetro del tallo (mm) de las semillas de *Tamarindus indica* mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).



4.1.4 NÚMERO DE HOJAS

En la figura 4.4. el tratamiento con inmersión en NL aumentó el número de hojas a los 90 DDG, no obstante, a los 30 y 60 DDG no existieron diferencias significativas con el tratamiento sin NL. Estos datos concuerdan con los de Acosta *et al.* (2019) que manifiestan que en la variable número de hojas obtuvieron un coeficiente de variación medio (41.1%) y una cobertura foliar en plantas, superior a plantas que las semillas fueron crioconservadas en plantas de *Teramnus labialis*. Por lo contrario, Hine *et al.* (2013) discrepan al no reportar diferencias significativas en las semillas de teca congeladas y no congeladas en plantas *in vitro* a los 28 y 56 días en condiciones *in vitro*.

Figura 4.4. N° de hojas de las semillas de *Tamarindus indica* mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).



4.1.5 LONGITUD DE RAÍZ (cm)

En la figura 4.5. la variable longitud de raíz a los 90 DDG adquirió diferencias altamente significativas en las plantas de tamarindo entre los tratamientos estudiados, lo que concuerda con los de López y Bravo (2009), los que indican que en la longitud de raíz en plantas del género *Phaseolus* se observaron diferencias significativas mediante la prueba no paramétrica de Wisconsin, en el cual las raíces con tratamiento de inmersión de semillas a NL son superiores en comparación de las congeladas en refrigerador, al igual que García y Abdelnour (2013) quienes manifiestan que semillas de cedro crioconservadas, obtuvieron mejor desarrollo de raíces en el medio MS que aquellas semillas cultivadas en la presencia de BA ($0,5 \text{ mg}^{-1}$), de la misma forma, coincide con Zevallos *et al.* (2016) que en *Solanum lycopersicum* Mill hay efectos muy notables después de la crioconservación en las raíces como la disminución del contenido de clorofilas y fenólicos unidos a la pared celular.

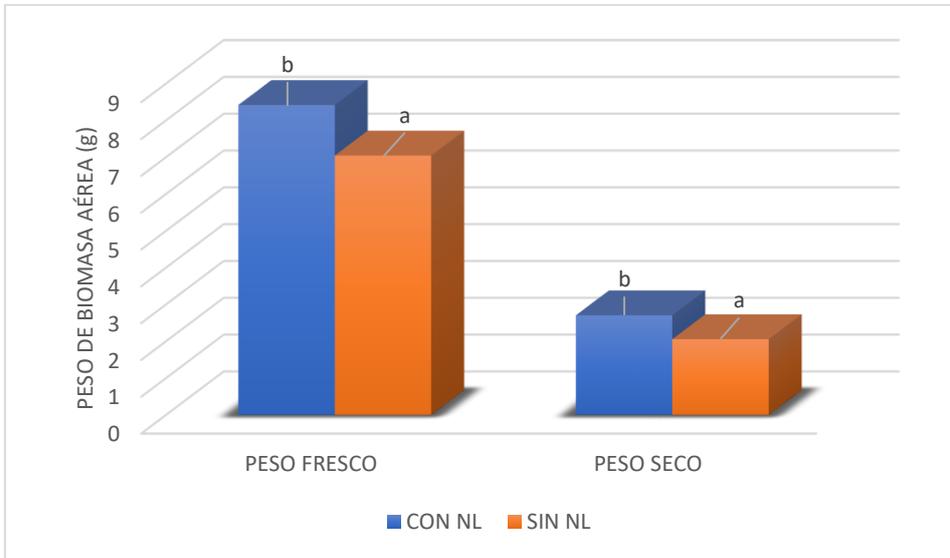
Figura 4.5. Longitud de raíz (cm) de las semillas de *Tamarindus indica* mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).



4.1.6 PESO DE BIOMASA AÉREA (g)

En la figura 4.6. el tratamiento con inmersión en NL afectó positivamente al peso de biomasa aérea a los 90 DDG en las plantas de tamarindo entre los tratamientos estudiados. Estos resultados indican que la inmersión de semillas con NL presenta un aumento de peso en biomasa aérea tanto en peso fresco como en peso seco, tal como manifiesta Arguedas *et al.* (2018) que el peso fresco combinado de tallos y hojas en maíz muestra diferencias significativas en las semillas criopreservadas.

Figura 4.6. Peso de biomasa aérea (g) de las semillas de *Tamarindus indica* mediante la inmersión en Nitrógeno Líquido (NL).



CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Las semillas de tamarindo incrementaron su porcentaje de germinación al ser tratadas con nitrógeno líquido tras romper la dormancia física.
- La inmersión en nitrógeno líquido de semillas de tamarindo incrementó el diámetro, N° de hojas, longitud de raíz y el peso de la biomasa aérea a los 90 días después de la germinación (DDG) y promovió la tasa de crecimiento a los 30 días de germinada.
- La inmersión en NL no ayudó a romper la dormancia física de las semillas de Teca y Melina

5.2 RECOMENDACIONES

- Realizar el experimento con otras especies con dormancia física bajo la inmersión en NL y utilizar otros métodos de escarificación.
- Probar otros métodos de escarificación para la ruptura de dormancia física en semillas de Melina y Teca y exponer el mejor.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A., Rojas, G., & Alfaro, U. (2007). Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Revista Tecnología En Marcha*, 20(1), 98.
https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/95
- Acosta, Y., Hernández, L., Mazorra, C., Quintana, N., Zevallos, B. E., Cejas, I., Sershen, Lorenzo J., Martínez, M., y Fontes, D. (2019). Seed Cryostorage Enhances Subsequent Plant Productivity in the Forage Species *Teramnus Labialis* (LF) Spreng. *CryoLetters*, 40(1), 36-43.
<https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2019/00000040/00000001/art00006>
- Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A., y Fait, A. (2010). Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in plant science*, 15(4), 211-218.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1360138510000063>
- Arguedas, K. M. (2014). *Estudios fisiológicos y bioquímicos relacionados con la conservación de germoplasma vegetal de Phaseolus vulgaris L, Glycine max L y Zea mays L en nitrógeno líquido* [proyecto de graduación, Instituto tecnológico de Costa Rica]. Repositorio Institucional del Tecnológico de Costa Rica. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/3266>
- Arguedas, M., Gómez, D., Hernández, L., Engelmann, F., Garramone, R., Cejas, I., y Lorenzo, J. C. (2018). Maize seed cryo-storage modifies chlorophyll, carotenoid, protein, aldehyde and phenolics levels during early stages of germination. *Acta physiologiae plantarum*, 40(6), 118.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-018-2695-7>

- Arrieta, A. A. (2010). *Evaluación preliminar para la crioconservación de semillas de Gmelina arborea roxb. (Verbenaceae) utilizando el método de congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido* [tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Institucional Pontificia Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8558>
- Cardoso, A., Pita, J., & Gomes, J. (2000). Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 2(1), 67-71. <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev21/Art218.pdf>
- Chaves, E., & Fonseca, W. (1991). *Teca: Tectona grandis: Lf especie de árbol de uso múltiple en América Central* (Vol. 11). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/handle/11554/4173>
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*, 31(1), 00-00. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000100011
- García, T., y Abdelnour, A. (2013). Crioconservación de ápices y semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante las técnicas de vitrificación y deshidratación. *Agronomía Costarricense*, 37(1), 113-126. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242013000100009
- González, E., Pita, J., Perez, C., & Pérez, F. (1997). Effect of cryopreservation on seed germination of different Leguminosae species. In *Basic and applied aspects of seed biology* (pp. 797-802). https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-5716-2_87

- González, M., y Engelmann, F. (2013). *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe*. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. <http://up-rid2.up.ac.pa:8080/xmlui/handle/123456789/2412?show=full>
- Hine, A., Vargas, P., y Abdelnour, A. (2013). Crioconservación de semillas de teca (*Tectona grandis* L. f). *Agronomía Costarricense*, 37(1), 51-60. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242013000100004&script=sci_arttext
- Iriondo, J. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Investigación agraria. *Producción y protección vegetales*, 16(1), 5-24. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=112309>
- Johnson, T., Cruse, J., y Pullman, G. (2012). Micropropagation and seed cryopreservation of the critically endangered species Tennessee yellow-eye grass, *Xyris tennesseensis* Kral. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(3), 369-376. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11627-011-9420-1>
- López, J. (2016). *Efectos de los niveles de fertilización orgánica y química en el desarrollo de plántulas de teca (Tectona grandis lf), en el Cantón Mocache, año 2016* [Tesis de maestría, Universidad Técnica Estatal de Quevedo]. Repositorio Digital UTEQ. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/1787>
- López, M., y Bravo, S. (2019). Crio-conservación de variedades del género *Phaseolus* mediante la viabilidad en la Parroquia Quiroga, Cantón Cotacachi. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 8(2), 136-148. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7153082>

- Martínez, J., Feijóo, J., Gálvez, J., Mora, N., & Martínez, M. (2005). Cambios bioquímicos asociados a las membranas celulares durante la crioconservación de callos de caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido) con estructuras embriogénicas. *Centro Agrícola*, 32(3), 48. https://www.researchgate.net/publication/270050862_Cambios_bioquimicos_asociados_a_las_membranas celulares_durante_la_crioconservacion_de_callos_de_cana_de_azucar_Saccharum_spp_hibrido_con_estructuras_embriogenicas
- Masilamani, P., y Dharmalingam, C. (1998). Germination improvement in teak (*Tectona grandis* Linn. f.) through forced ageing. *Current science*, 75(4). https://www.researchgate.net/publication/334130433_Germination_improvement_in_teak_Tectona_grandis_Linn_f_through_forced_ageing
- Melendres, J. (2012). *Métodos de congelación de embriones bovinos en nitrógeno líquido* [tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. DSpace ESPOCH. <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/2105>
- Méndez, G., Robles, A., y Peña, E. (2013). Procesos moleculares involucrados en la protección de las semillas a la desecación. *Biológicas*, 15, 42-48. https://www.researchgate.net/publication/264973783_Procesos_moleculares_involucrados_en_la_proteccion_de_las_semillas_a_la_deseccion
- Mendez, J., Merazo, J., Zerpa, M., y Bolívar, C. (2008). Efecto de la colocación de semillas de maíz (*Zea mays* L.), caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en papel toallín (enrollados y sin enrollar) sobre la germinación y el vigor. *UDO Agrícola*, 8(1), 67-71. https://www.researchgate.net/publication/41019536_Effect_of_seed_placement_of_corn_Zea_mays_L_French_bean_Phaseolus_vulgaris_L_and_cotton_Gossypium_hirsutum_L_on_towel_paper_rolled_and_without_rolling_on_germination_and_vigor

- Ministerio del ambiente. (2017). *Deforestación del Ecuador continental periodo 2014-2016*. <http://reddecuador.ambiente.gob.ec/redd/wp-content/uploads/2019/12/Anexo-5.-Informe-de-Deforestaci%C3%B3n-Ecuador-Continental-periodo-2014-2016.pdf>
- Mira, S., Schnadelbach, A., Correa, E., Pérez, F. y González, M. (2017). Variability of physical dormancy in relation to seed mechanical properties of three legume species. *Seed Science and Technology*, 45 (3), 540-556. <https://www.ingentaconnect.com/content/ista/sst/2017/00000045/00000003/art00003>
- Monge, A. A. (2011). *Tratamientos de temperatura y humedad para incrementar el porcentaje de germinación en la semilla de teca (Tectona grandis Linn. f.)* [tesis de pregrado, Universidad de Costa Rica]. <http://www.cigras.ucr.ac.cr/phocadownload/Semillas/Tesis%20documento%20final%20Andres%20Monge%20Vargas.pdf>
- Pérez, F. (2016). *Establecimiento de cultivo in vitro de Tamarindus indica L. para la obtención de antioxidantes* [tesis de pregrado, Universidad autónoma del estado de México]. Repositorio Institucionl RI. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/65363>
- Perullo, N., Determann, R., Cruse, J., y Pullman, G. (2015). Seed cryopreservation and micropropagation of the critically endangered species swamp pink (*Helonias bullata* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51 (3), 284-293. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-015-9679-8>
- Portales, C. H. (2015). *Pretratamiento de las semillas de guinda (Prunus serotina) para incrementar el porcentaje de germinación*. [Trabajo de investigación, Universidad para el Desarrollo Andino]. Repositorio UDEA. <http://repositorio.udea.edu.pe/handle/123456789/31>

- Ramírez, D., Agramonte, D., Gutiérrez, O., Barbón, R., Pérez, M., Collado, R., & Jiménez-Terry, F. (2003). Propagación in vitro de explantes de teca obtenidos a partir de semillas. *Bioteología Vegetal*, 3(3). 161-167. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/250>
- Ramirez, G., Pacheco, C. y Beltran, D. (2007). *Biotransformación de biomasa foliar de Gmelina arborea Roxb. (Melina) mediante el uso de hongos y bacterias* [tesis de pregrado, Universidad Técnica de Quevedo]. Repositorio Digital UTEQ. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3324>
- Ramos, J. R. (2015). *Producción de plantas de melina (Gmelina arborea Roxb.) con dos tratamientos pregerminativos, en fundas plásticas a nivel de vivero en el cantón Buena Fé, provincia de Los Ríos* [tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. DSpace ESPOCH. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4991>
- Rao, N., Hanson, J., Dulloo, M., Ghosh, K., Nowell, D., & Larinde, M. (2007). *Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma* (No. 8). Bioversity International. https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Manual_para_el_manejo_de_semillas_en_bancos_de_germoplasma_1261_01.pdf
- Robertson, B. (2002). Growing Teak in the Top End of the NT. *Agnote*, 346(20), 1-5. https://dpiir.nt.gov.au/___data/assets/pdf_file/0020/233372/812.pdf
- Simbaña, M. (2016). *Evaluación de los métodos de propagación sexual, asexual y comportamiento de Melina (Gmelina arborea Roxb), en plantación, en la hacienda Pizará, cantón Pedro Vicente Maldonado, provincia de Pichincha* [tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. DSpace ESPOCH. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/5137>

- Sucuytana, F. (2019, 5 agosto). *Nitrógeno Líquido*. Scribd. Consultado 8 enero, 2020, de <https://es.scribd.com/document/420767831/NITROGENO-LIQUIDO>
- Varela, S., y Arana, V. (2010). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Sistema Forestales Integrados*, 3, 1-10. <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Latenciaygerminaci%C3%B3ndeSemillas.pdf>
- Vázquez, C., Orozco, A., Rojas, M., Sánchez, M. & Cervantes, V. (1997). *La reproducción de las plantas: semillas y meristemos*. Fondo de Cultura Económica. <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000045648>
- Vílchez, B. (1986), *Germinación y crecimiento de las plántulas del tamarindo (Tamarindus indica L.)* [Tesis de grado, Universidad de Costa Rica]. <http://www.biologia.ucr.ac.cr/TesisLic/BraulioVilchezAlvarado.pdf>
- Willan, R. L. (1991). *Guía para la manipulación de semillas forestales con especial referencia a los trópicos*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/3/ad232s/ad232s10.htm#ch8.2>
- Zevallos, B., Cejas, I., Engelmann, F., Carputo, D., Aversano, R., Scarano, M., Yanes, E., Martínez, M., y Lorenzo, J. C. (2014). Phenotypic and molecular characterization of plants regenerated from non-cryopreserved and cryopreserved wild *Solanum lycopersicum* Mill. seeds. *CryoLetters*, 35(3), 216-225. <https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2014/00000035/00000003/art00007>
- Zevallos, B., Cejas, I., Rodríguez, R., Yabor, L., Aragón, C., González, J., Engelmann, F., Martínez, M., y Lorenzo, J. (2016). Biochemical characterization of Ecuadorian wild *Solanum lycopersicum* Mill. plants

produced from non-cryopreserved and cryopreserved seeds. *CryoLetters*, 37(4), 413-421.
<https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2016/00000037/00000004/art00011>

ANEXOS

Anexo 1.
Recolección de semillas



Anexo 2.
Determinación de porcentaje de humedad



Anexo 3.

Inmersión en nitrógeno líquido



Anexo 4.
Germinación de semillas



Anexo 5.
Preparación de sustrato



Anexo 6.
Llenado de fundas



Anexo 7.
Siembra de semillas



Anexo 8.

Toma de datos de 30 DDG



Anexo 9.

Toma de datos de 60 DDG



Anexo 10.

Toma de datos de 90 DDG



Anexo 11.

Toma de variables de peso



