

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Establecimiento de un protocolo  
de esterilización de semillas de achiote (*Bixa orellana* L.)**

**Nicolás Mafla Viscarra**  
**Ingeniería en Biotecnología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 21 de diciembre de 2020

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencia Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Establecimiento de un protocolo  
de esterilización de semillas de achiote (*Bixa orellana* L.)**

**Nicolás Mafla Viscarra**

**Nombre del profesor, Título académico**

**María de Lourdes Torres, PhD**

**Andrea Montero, MSc**

Quito, 21 de diciembre de 2020

## **DERECHOS DE AUTOR**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Así mismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Nicolás Mafla Viscarra

Código: 00137791

Cédula de identidad: 1718383308

Lugar y fecha: Quito, 21 diciembre de 2020

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

*Bixa orellana* L, conocido como achiote, es un arbusto que crece en las zonas intertropicales del continente americano. Esta especie tiene múltiples aplicaciones en áreas como la farmacéutica, la cosmética y la industria alimenticia. La planta de achiote requiere un suelo con un alto nivel de nutrientes, mientras que sus semillas necesitan un pH y una temperatura específicas para germinar. En respuesta a la gran demanda que esta planta posee en el mercado, el cultivo *in vitro* es una excelente opción para su propagación. En este trabajo se estableció un protocolo de esterilización para semillas de esta especie, el cual consistió en el uso de Tween 20, fungicida Vitavax e hipoclorito de sodio. Las semillas estériles se sembraron en dos medios de cultivo: a) Murashige y Skoog (MS) suplementado con ácido giberélico y b) medio basal AM (1/2 concentración de sales que el medio MS), para conseguir su germinación. Hasta el momento, el protocolo más efectivo para la esterilización de esta planta consiste en fungicida Vitavax (0.1%) durante 45 minutos, complementado con hipoclorito de sodio (2.5%) por 15 minutos. Con este protocolo, se obtuvo 100% de germinación y esterilización. Se determinó que es necesario el uso de un fungicida para el establecimiento de este protocolo de esterilización. Por otro lado, la procedencia y el estado de madurez de los frutos son factores que pueden influir sobre la germinación de las semillas y su posterior desarrollo. Por último, es necesario realizar nuevos experimentos para lograr un protocolo eficiente de germinación de semillas de esta interesante especie con gran potencial comercial.

Palabras clave: achiote, cultivo *in vitro*, germinación semillas, esterilización.

## ABSTRACT

*Bixa orellana* L, known as achiote, is a shrub that grows in the intertropical areas of the American continent. This species has multiple applications in areas such as pharmaceuticals, cosmetics and the food industry. The achiote plant requires a soil with a high level of nutrients, while its seeds need a specific pH and temperature to germinate. In response to the great demand that this plant has in the market, *in vitro* culture is an excellent option for its propagation. In this work, a sterilization protocol was established for seeds of this species, which consisted of the use of Tween 20, Vitavax fungicide and sodium hypochlorite. The sterile seeds were sown in two culture media: a) Murashige and Skoog (MS) supplemented with gibberellic acid and b) AM basal medium (1/2 concentration of salts than the MS medium), to achieve their germination. So far, the most effective protocol for the sterilization of this plant consists of Vitavax fungicide (0.1%) for 45 minutes and sodium hypochlorite (2.5%) for 15 minutes. With this protocol, 100% germination and sterilization were obtained. It was determined that the use of a fungicide is necessary for the establishment of this sterilization protocol. On the other hand, the origin and the state of maturity of the fruits are factors that can influence the germination of the seeds and their subsequent development. Lastly, new experiments are necessary to achieve an efficient seed germination protocol of this interesting species with great commercial potential.

Key words: annatto *in vitro*, seed germination, sterilization.

## TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN .....	10
1.1.	Taxonomía del achiote .....	10
1.2.	Importancia económica y cultural .....	11
1.3.	Aplicaciones en la industria .....	12
1.4.	Cultivo tradicional del achiote .....	13
1.5.	Cultivo <i>in vitro</i> del achiote.....	14
2.	MÉTODOS .....	15
2.1.	Recolección de material vegetal y almacenamiento .....	15
2.2.	Ensayos de esterilización directa de semillas.....	15
2.3.	Ensayos de esterilización de frutos .....	16
2.3.1.	Variación de la concentración de hipoclorito de sodio.....	17
2.3.2.	Variación del tiempo de exposición en hipoclorito de sodio.....	17
2.3.3.	Variación de tiempo en Vitavax. ....	18
2.4.	Registro y análisis estadístico .....	19
3.	RESULTADOS .....	20
3.1.	Ensayos de esterilización de semillas.....	20
3.2.	Ensayos de esterilización de fruto.....	20
3.2.1.	Variación de concentración de hipoclorito. ....	20
3.2.2.	Variación de tiempo de exposición del fruto a hipoclorito de sodio. ....	20
3.2.3.	Variación de tiempo en Vitavax. ....	22
4.	DISCUSIÓN .....	24
5.	CONCLUSIONES .....	29
6.	TABLAS.....	30
7.	FIGURAS .....	32
8.	REFERENCIAS.....	40
9.	ANEXOS .....	53
9.1.	Anexo 1: Recolección y almacenamiento del material vegetal.....	53
9.2.	Anexo 2: Diseño experimental para los ensayos de esterilización de semillas.....	53
9.3.	Anexo 3: Diseño experimental para los ensayos de esterilización de frutos. ....	53
9.4.	Anexo 4: Diseño experimental adaptado de Joseph et al, 2011.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Resultados de los ensayos de esterilización de semillas utilizando hipoclorito de sodio al 2.5% (Ensayos A y B). .....	30
<b>Tabla 2:</b> Resultados del ensayo de esterilización de fruto variando la concentración de hipoclorito de sodio (Ensayo C).....	30
<b>Tabla 3:</b> Resultados de los ensayos de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con hipoclorito de sodio (Ensayos D y E).....	30
<b>Tabla 4:</b> Resultados de los ensayos de esterilización de fruto probando diferentes tiempos de exposición a Vitavax (Ensayos F, G, H e I). .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Resultados de los ensayos de esterilización directa de semillas. ....	32
<b>Figura 2:</b> Resultados del ensayo de esterilización de fruto variando la concentración de hipoclorito de sodio (Ensayo C).....	33
<b>Figura 3:</b> Resultados del primer ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con hipoclorito de sodio (Ensayo D).....	34
<b>Figura 4:</b> Resultados del segundo ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con hipoclorito de sodio (Ensayo E).....	35
<b>Figura 5:</b> Resultados del primer ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con Vitavax (Ensayo F).....	36
<b>Figura 6:</b> Resultados del segundo ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con Vitavax (Ensayo G).....	37
<b>Figura 7:</b> Resultados del tercer ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con Vitavax (Ensayo H).....	38
<b>Figura 8:</b> Resultados del cuarto ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con Vitavax (Ensayo I). ....	39

## 1. INTRODUCCIÓN

El achiote (*Bixa orellana* L.) es un cultivo tradicional ecuatoriano. El colorante obtenido a partir de sus semillas se encuentra segundo en la lista de colorantes naturales con mayor importancia económica a nivel mundial (Siril & Nisha, 2012). Alrededor del mundo, se consumen más de 14 000 toneladas de semillas de achiote, cada año (Venugopalan, Giridhar & Ravishankar, 2011). De hecho, el pigmento obtenido de las semillas de achiote es uno de los primeros colorantes de origen natural en ser utilizado por el ser humano (Ferreira et al, 2014). La bixina y la norbixina, compuestos químicos extraídos a partir de este colorante, constituyen la base para el funcionamiento de la industria cosmética (Payes et al, 2017). Por otro lado, el achiote constituye un emblema dentro de la cultura gastronómica y medicina tradicional latinoamericana (Instituto Nacional de Medicina, 2020).

### 1.1. Taxonomía del achiote

La familia Bixaceae fue descrita por primera vez por el botánico y médico alemán, Heinrich Friedrich Link, en 1822 (Berendsohn, 2012). Esta familia pertenece al orden Violales y contiene tres géneros y 25 especies (Venugopalan, Giridhar & Ravishankar, 2011). Las especies de este grupo tienen una distribución intertropical, que se extiende desde México, pasando por Colombia y Ecuador, hasta llegar a Brasil y Perú. En el sur del Ecuador, se pueden encontrar dos géneros, con una especie cada uno: *Bixa orellana* L. y *Cochlospermum vitifolium* (Aguirre, Merino & Gutiérrez, 2013). Las especies de esta familia se encuentran distribuidas a lo largo de los Andes tropicales, principalmente en ambientes como el bosque húmedo y bosque seco (Lozada, 2003).

El género *Bixa* L. es uno de los más representativos de la familia Bixaceae; contiene cinco especies aceptadas y distribuidas a lo largo del continente americano (The Plant List, 2019). De manera general, las especies del género *Bixa* crecen dentro de un rango altitudinal que va desde los 300 hasta los 1000 m.s.n.m.. Además, requieren niveles de precipitación mayores a los 1000 mm (Aguirre, Kvist & Sánchez, 2006). La especie de mayor importancia económica es el achiote (*Bixa orellana* L.), debido a sus múltiples facetas dentro de la industria. El registro arqueológico más antiguo de esta especie proviene del Caribe; sin embargo, su domesticación se llevó a cabo en la zona norte de América del sur, durante el proceso de la colonización española (Ambrósio, Lins, Dequigiovann, Veasey & Clement, 2015). Principalmente, se la utilizaba con fines ornamentales, en rituales religiosos o para dar color a la vestimenta de las personas; por otra parte, existen reportes de su uso como especia dentro de la cocina nativa (Soler, 2005).

## **1.2. Importancia económica y cultural**

A nivel global, países como Brasil, Ecuador, Perú, México y Kenia son los que más cultivan esta planta (Leal & Michelangeli, 2012). Esta especie es muy frecuente en varios de los platillos de la cocina mexicana, la cual es reconocida a nivel mundial como patrimonio cultural inmaterial de la humanidad (Fernández, 2016). Por otro lado, en Ecuador, los principales cultivos se registran en las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas, Manabí, Napo y Zamora Chinchipe (Artieda, 2010). Solo en Manabí, se comercializan alrededor de 200 quintales de achiote anualmente a empresas como La Fabril, corporación que se dedica a la fabricación de aceites y productos de higiene, lo cual representa una ganancia aproximada de 33 000 dólares para la asociación de

achioteros de Manabí (El Diario, 2017). Además, es importante mencionar los usos culturales de planta, sobre todo en poblaciones como los Tsáchilas donde el colorante del achiote es utilizado en sus rituales sagrados, para adornarse el cuerpo y el cabello. De igual forma, sus semillas se utilizan para elaborar collares o adornos para sus viviendas (La Hora, 2019). Históricamente, existen registros de los Maiongong, una población indígena de la Amazonía brasileña, preparando bebidas a partir de esta planta, con el fin de tratar la malaria (Milliken, 1997). Se sabe que los indígenas brasileños acostumbran a pintarse el cuerpo con achiote, debido a su capacidad para repeler insectos (Shanley, 2004).

### **1.3. Aplicaciones en la industria**

Muchos investigadores han vinculado al fruto del achiote, por los carotenoides que contiene, con aplicaciones farmacéuticas y medicinales (Caiza, 2019). La bixina y la norbixina han sido foco de estudio, dónde se han demostrado las diversas propiedades farmacológicas de esta planta como, por ejemplo: antiinflamatoria, antioxidante y cicatrizante (Lourido & Martínez, 2010). Jodinko y colaboradores reportaron, en el 2019, la propiedad repelente de mosquitos y la actividad larvicida de los aceites esenciales del achiote. Por otra parte, un estudio realizado por Pacheco et al, evidenció que la bixina reduce la migración de neutrófilos, lo que podría ser útil para generar un efecto antiinflamatorio en el paciente (2019). Se ha evidenciado que los extractos de las semillas de *Bixa orellana* L. presentan una mejor concentración inhibitoria mínima (MIC) en contra de *Bacillus cereus* (0.2 µg/ml) que el sulfato de gentamicina (0.5 µg/ml) (Rojas, 2006). La bixina es el compuesto que se encuentra en mayor proporción dentro de los arilos de las semillas de achiote, desde un 70 a 80% p/p, mientras que la norbixina está

presente en menor proporción, desde un 2% a 5% p/p (Teixeira, Zeng, Godoy, Rivera & Dobránszki, 2019). Al ser hidrofóbica, la bixina se extrae mediante la dilución en aceites a altas temperaturas, mientras que la norbixina, se extrae con agua a una temperatura de 40°C, debido a su carácter hidrofílico (Guarrín, 2019)

Por otro lado, los extractos naturales de esta planta también se utilizan en la industria alimenticia y cosmética (Stringheta et al., 2018). Una investigación demostró las propiedades antifúngicas del colorante del achiote, generando así un potencial conservante natural para diversos tipos de alimentos, sin la necesidad de recurrir a compuestos sintéticos (Mohammad et al, 2018). Además, la bixina es una excelente alternativa para reemplazar los compuestos artificiales que se utilizan actualmente en la industria de los cosméticos (Seclén, 2016). Como es evidente, la demanda de esta planta dentro del mercado es elevada, por lo que es necesario la obtención de cultivares de esta especie vegetal.

#### **1.4. Cultivo tradicional del achiote**

El fruto del achiote es una cápsula de tipo dehiscente, es decir, es un tipo de fruto que presenta un mecanismo natural para abrirse y liberar sus semillas (The Plant List, 2019). Además, la presencia del colorante natural en las semillas de esta especie, puede inhibir la ruptura de la testa (Leal & Michelangeli, 2012). Igualmente, las semillas de esta especie requieren un pH medio de 6.25 para germinar y las plántulas de achiote necesitan 29 °C de temperatura promedio para desarrollarse correctamente; condiciones que son difíciles de conseguir en el campo (Michelangeli, et al., 2003). Adicionalmente, la polinización cruzada es muy común en este arbusto, lo que se traduce en rendimientos muy variados con respecto a sus compuestos secundarios como la bixina, la viabilidad de

sus las semillas y su tasa de germinación (Pech, 2017). Como es evidente, el cultivo tradicional de esta especie presenta limitaciones y contratiempos, por lo que su micropropagación dentro del laboratorio resultado interesante.

### **1.5. Cultivo *in vitro* del achiote**

El cultivo *in vitro* es una técnica que permite la micropropagación de plantas en un tiempo relativamente corto y en condiciones ambientales controladas (Kumar et al, 201). Esta técnica es una excelente alternativa para la propagación de esta especie, tomando en cuenta todas las limitaciones que presentan los métodos tradicionales. Es importante resaltar que las técnicas de cultivo *in vitro* dependen de un protocolo efectivo para la esterilización del material vegetal con el que se inicia el cultivo.

Debido a que no existen varios estudios en la literatura acerca del cultivo *in vitro* del achiote, el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo eficiente de esterilización de semillas para implementar el cultivo *in vitro* del achiote.

## 2. MÉTODOS

Los ensayos de esterilización en esta investigación, se dividen en dos categorías: ensayos de esterilización directa de semillas y ensayos de esterilización de frutos.

### 2.1. Recolección de material vegetal y almacenamiento

Las semillas para los ensayos de esterilización se obtuvieron de la empresa La Fabril en mayo de 2019. Estas se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ y fueron almacenadas en un ambiente fresco y seco. Para los ensayos de esterilización de fruto, se realizaron salidas de campo en dos lugares distintos: Pallatanga, Chimborazo y Echeandía, Bolívar, desde julio de 2019 hasta noviembre de 2020. Los frutos recolectados fueron recubiertos con papel periódico, con la finalidad de protegerlos a lo largo de la movilización. Posteriormente en el laboratorio, fueron almacenados en un ambiente fresco y seco (Anexo 1).

### 2.2. Ensayos de esterilización directa de semillas

Se llevaron a cabo dos ensayos de esterilización directa de semillas. Para el primer experimento, se siguió el protocolo estandarizado del Laboratorio de Biotecnología Vegetal (Ensayo A). Este protocolo consiste en lavar las semillas con etanol, en una concentración al 70%, durante cinco minutos y más adelante, lavar el material vegetal con hipoclorito de sodio, al 2.5%, durante 20 minutos. Por último, se realizaron varios lavados con agua destilada estéril (Zaldívar-Cruz et al, 2003; Chi Chi et al, 2016). La siembra de las semillas se realizó en dos tipos de medio de cultivo: Murashige y Skoog (MS), suplementado con ácido giberélico ( $GA_3$ ) a  $3.0 \mu\text{M}$  y en el medio basal AM, el cual contiene la mitad de sales que el medio MS (Joseph, Elenjikkal y Nair, 2011). Se sembraron 10 semillas en cada frasco y se empleó un frasco para cada tipo de medio de

cultivo utilizado. Para el segundo experimento, se siguió el mismo protocolo detallado anteriormente utilizando semillas provenientes de Pallatanga, provincia de Chimborazo (Ensayo B). En esta ocasión, también se sembraron 10 semillas en cada frasco y se utilizó un frasco por cada tipo de medio (Anexo 2).

### **2.3. Ensayos de esterilización de frutos**

Se realizaron siete ensayos de esterilización utilizando frutos. Antes de empezar con cada uno de los protocolos, se removieron las prolongaciones que caracterizan a los frutos de achiote. El protocolo general de esterilización de fruto utilizado en este proyecto es una adaptación a lo descrito por Joseph y colaboradores en el año 2011, metodología que consiste en los siguientes pasos: Tween 20 (1%) por 30 minutos, fungicida Bavistin (0.1%) por 60 minutos, cloruro mercúrico (0.1%) por 10 minutos, sumersión de frutos en etanol (70%) y, por último, rápido flameo, durante diez segundos. En nuestro caso, todo el proceso se llevó a cabo de una cámara de flujo laminar y empezó con exposición de los frutos a los reactivos Tween 20, Vitavax e hipoclorito de sodio (Anexo 3 y 4). Posteriormente, los frutos fueron flameados rápidamente. En todos los casos, el detergente Tween 20 se utilizó durante media hora, en una concentración del 1%. En cambio, con el fungicida Vitavax, se probaron diversos tiempos de tratamiento a una concentración del 0.1%. Mientras que, para el hipoclorito de sodio se probaron diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Por último, una vez que el fruto fue flameado, se lo abrió, con la ayuda de un bisturí estéril se obtuvieron las semillas. A continuación, se detallan las variantes para cada protocolo realizado.

### **2.3.1. Variación de la concentración de hipoclorito de sodio.**

Para este protocolo (Ensayo C), se probaron las siguientes concentraciones de hipoclorito de sodio: 0.1%, 1% y 2.5%, durante 10 minutos. Cabe recalcar que en este ensayo también se utilizó fungicida Vitavax al 0.1%, durante 60 minutos (Joseph et al, 2011). La siembra de las semillas se la realizó en medio Murashige y Skoog (MS), suplementado con la hormona  $GA_3$  (ácido giberélico), en una concentración de 3.0  $\mu$ M. Se sembraron 10 semillas en cada frasco y se utilizaron tres frascos por cada tratamiento, dando un total de 9 frascos.

### **2.3.2. Variación del tiempo de exposición en hipoclorito de sodio.**

Se realizaron dos experimentos de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición a hipoclorito de sodio. En ambos casos, se utilizó la concentración de hipoclorito de sodio más alta del ensayo anterior (2.5%). Para el primer experimento de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición de hipoclorito de sodio, se probaron tres diferentes tiempos del reactivo: 10, 15, y 18 minutos (Ensayo D). La siembra de las semillas se la realizó en medio MS, suplementado con la hormona  $GA_3$ , en una concentración de 3.0  $\mu$ M. Se sembraron 10 semillas en cada frasco y se utilizaron tres frascos por cada tratamiento, dando un total de nueve frascos.

Por otro lado, para el segundo experimento, se probaron los siguientes tiempos: 12, 15 y 18 minutos (Ensayo E). En esta ocasión, además de emplear el medio MS +  $GA_3$  (3.0  $\mu$ M), se decidió utilizar medio AM. En este caso, se sembraron 10 semillas por cada frasco y dos frascos por cada tratamiento, uno para cada tipo de medio de cultivo, dando un total de seis frascos.

### 2.3.3. Variación de tiempo en Vitavax.

Se realizaron cuatro experimentos de esterilización del fruto variando el tiempo de exposición a Vitavax. En todos los casos, se utilizó hipoclorito de sodio al 2.5% durante 15 minutos. Para el primer experimento de esterilización del fruto variando el tiempo de exposición de Vitavax, se trató los frutos con fungicida Vitavax a una concentración de 0.1%, durante: 30, 45 y 60 minutos (Ensayo F). La siembra se realizó en los medios AM y MS +  $GA_3$  (3.0  $\mu$ M). En cada frasco se sembraron 10 semillas y se emplearon dos frascos por cada tiempo de exposición con Vitavax, uno para cada tipo de medio de cultivo, dando un total de seis frascos.

Para el segundo experimento de esterilización del fruto variando el tiempo de exposición a Vitavax, se probaron 45 y 60 minutos de tratamiento con el fungicida (Ensayo G). La siembra se realizó únicamente en medio MS +  $GA_3$  (3.0  $\mu$ M). Se sembraron diez semillas por cada frasco y se emplearon cinco frascos para cada tratamiento, dando un total de diez frascos.

Para el tercer experimento de esterilización del fruto variando el tiempo de exposición a Vitavax, se probaron 45 y 60 minutos de exposición al fungicida (Ensayo H). En esta ocasión, se volvieron a probar los dos tipos de medio: AM y MS +  $GA_3$  (3.0  $\mu$ M). Para este ensayo, se sembraron diez semillas por cada frasco y se utilizaron, cinco frascos para cada tipo de medio de cultivo, dando un total de 20 frascos.

Para el cuarto experimento de esterilización del fruto variando el tiempo de exposición a Vitavax, se probaron tres tiempos de exposición del fruto al fungicida: 20, 30 y 40 minutos (Ensayo I). Para este protocolo también se probaron los dos tipos de medio de cultivo: MS +  $GA_3$  (3.0  $\mu$ M) y AM. Se sembraron diez semillas por frasco y se

utilizaron diez frascos por cada tiempo de exposición al fungicida, cinco por cada tipo de medio de cultivo, dando un total de 30 frascos.

#### **2.4. Registro y análisis estadístico**

Una vez concluida la siembra de las semillas, los frascos fueron transportados al cuarto de cultivo del Laboratorio de Biotecnología vegetal USFQ, donde se cultivaron a una temperatura de  $23 \pm 2$  °C y con un fotoperiodo de 16 horas. El registro de los datos se realizó cada 2 días en el programa Excel. Se registraron datos de germinación. Estos fueron considerados por cada semilla sembrada. En cambio, los datos de esterilización se anotaron por frasco. Los análisis estadísticos se realizaron en el software Minitab, en el cual se corroboró la distribución normal de los datos y se estableció una prueba ANOVA.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Ensayos de esterilización de semillas

En cuanto a los resultados obtenidos en el ensayo A, tanto la tasa de germinación como la de esterilización fue del 0% para ambos tipos de medio de cultivo. Con relación al ensayo B, el medio MS + GA<sub>3</sub> presentó un porcentaje de germinación del 20% (2/10), mientras con en el medio AM, el 10% (1/10) de las semillas germinaron. Para este ensayo, la primera semilla en germinar se observó después de 14 días (Tabla 1 y Figura 1).

#### 3.2. Ensayos de esterilización de fruto

##### 3.2.1. Variación de concentración de hipoclorito.

En cuanto al ensayo C, con 2.5% de hipoclorito de sodio, el 6.67% (2/30) de las semillas germinaron y, se logró esterilizar uno de los tres frascos utilizados, lo que representa un 33.33% de esterilización. La tasa de esterilización y germinación para las demás concentraciones del reactivo fue del 0%. Con la prueba estadística ANOVA, se obtuvo un valor p mayor a 0.05, por lo que se concluye que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 2 y Figura 2).

##### 3.2.2. Variación de tiempo de exposición del fruto a hipoclorito de sodio.

Para el ensayo D, con 15 minutos de exposición a hipoclorito de sodio, la germinación fue del 23.33% (7/30) y se logró esterilizar todos los frascos utilizados. En este caso, la primera semilla germinó después de 12 días, a partir la siembra. En cambio, con 18 minutos de tratamiento, se evidenció que 13.33% (4/30) de las semillas germinaron y se consiguió el 100% (3/3) de frascos estériles. La primera semilla germinó a los diez días desde la siembra. Por último, con diez minutos de tratamiento, la germinación fue del 6.67% (2/30) y se logró el 33.3% (1/3) de esterilización. La primera

semilla germinó a los 14 días, desde la siembra (Tabla 3 y Figura 3). Dentro del software Minitab, se corroboró la distribución normal de los datos. Seguido de esto, se aplicó un análisis de varianza, con el cual se obtuvo un valor  $p$  mayor a 0.05, el cual permitió concluir que no existe diferencia significativa entre los distintos tratamientos.

En cuanto a los resultados obtenidos con el ensayo E, con respecto al tratamiento con 12 minutos, el porcentaje de germinación fue del 70% (7/10) para el medio MS +  $GA_3$  y del 60% (6/10) para el medio AM. Por otro lado, no se logró esterilizar ningún frasco para este tiempo de exposición (0/2). La germinación de la primera semilla se evidenció después de cuatro días. En cambio, con 15 minutos de tratamiento con hipoclorito de sodio, el 50% (5/10) de las semillas germinaron y el porcentaje de esterilización fue del 0% (0/2), en los dos tipos de medio de cultivo utilizados. La germinación de la primera semilla se evidenció después de cinco días, desde la siembra. Por último, con 18 minutos de hipoclorito de sodio, todos los frascos se contaminaron. Por otra parte, el 10% (1/10) de las semillas germinaron con el medio AM y ninguna semilla germinó en el medio MS +  $GA_3$ . En esta ocasión, la primera semilla en germinar se registró después de siete días (Tabla 3 y Figura 4). Se comprobó la distribución normal de los datos, mediante una prueba de normalidad en Minitab. Después, se realizó un análisis de varianza. Se obtuvo un valor  $p$  menor a 0.05, el cual permite concluir que sí existe una diferencia significativa entre los tratamientos analizados. Por último, mediante una prueba de Tukey, se logró agrupar a los tratamientos de 12 y 15 minutos, mientras que el tratamiento con 18 minutos se clasificó como una agrupación individual. Esto se determinó a través de una gráfica de intervalos.

### 3.2.3. Variación de tiempo en Vitavax.

En cuanto al ensayo F, con 45 minutos de Vitavax, se evidenció 100% (10/10) de germinación y esterilización para ambos tipos de medio de cultivo. En este caso, la primera semilla en germinar se observó después de siete días. Por otro lado, con 60 minutos de exposición a Vitavax, el medio MS +  $GA_3$  presentó 100% (10/10) de germinación y esterilización. La primera semilla en germinar se observó después de 7 días. Mientras que, para el medio AM, no se logró la esterilización en ningún frasco (0/1) y ninguna semilla germinó (0/10). Por último, con 30 minutos de tratamiento, se observó 70% (7/10) de germinación y 0% de esterilización, tanto en el medio AM como en el medio MS +  $GA_3$ . Las primeras semillas germinaron después de siete días, desde la siembra. En este ensayo también se comprobó la distribución normal de los datos. Seguido de eso se realizó un ANOVA. En esta ocasión, se obtuvo un valor p mayor a 0.05. Por lo tanto, se concluyó que no existe una diferencia significativa entre los distintos tratamientos (Tabla 4 y Figura 5).

En cuanto al ensayo G, con 45 minutos de exposición de fungicida Vitavax, la tasa de germinación fue del 36% (18/50) y se logró la esterilización del 20% (1/5) de los frascos. Las primeras semillas germinaron después de cuatro días. En cambio, con 60 minutos de tratamiento, se observó 8% (4/50) de germinación y 40% (2/5) de esterilización. En este caso, la primera semilla germinó después de ocho días. Se comprobó la distribución normal de los datos, mediante una prueba de normalidad. Después, se realizó una prueba ANOVA, en donde se obtuvo un valor p mayor a 0.05, por lo que se concluyó que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos analizados (Tabla 4 y Figura 6).

Con respecto al ensayo H, ninguna semilla logró germinar. En cuanto a la esterilización, con 60 minutos de tratamiento, se esterilizaron el 100% (10/10) de los frascos. Por otro lado, con 45 minutos de tratamiento con Vitavax, se consiguió el 80% (4/5) de los frascos estériles en el medio AM, y el 100% (5/5) de los frascos en el medio MS +  $GA_3$  (Tabla 4 y Figura 6).

Por último, en relación al ensayo I, con 40 minutos de exposición a Vitavax, se logró esterilizar el 20% de los frascos con medio AM y 20% de los frascos con medio MS +  $GA_3$ . En cuanto a la germinación, se obtuvo 60% (30/50) en el medio AM y 64% (32/50) en el medio MS +  $GA_3$ . La primera semilla germinó después de 11 días desde la siembra. En cambio, con 30 minutos de tratamiento con Vitavax, no se logró esterilizar ningún frasco. En cuanto a la germinación, se obtuvo 28% (14/50) en el medio AM y 36% (18/50) en el medio MS +  $GA_3$ . Para este tiempo de exposición, la primera semilla germinó después de nueve días, desde la siembra. Por último, con 20 minutos de tratamiento, no se logró esterilizar ningún frasco. En cuanto a la germinación, se obtuvo 18% (9/50) para el medio AM y 24% (12/50) para el medio MS +  $GA_3$ . La primera semilla germinó a los nueve días, desde la siembra. Se comprobó la distribución normal de los datos. En seguida, se realizó un análisis de varianza con los datos, con el cual se obtuvo un valor  $p$  mayor a 0.05, por lo tanto, se concluyó que no existe una diferencia significativa entre los distintos tratamientos (Tabla 4 y Figura 7).

#### 4. DISCUSIÓN

Para implementar cualquier método de cultivo *in vitro*, la esterilización del material vegetal es un requisito indispensable. Se decidió emplear semillas como el material vegetal de partida y etanol e hipoclorito de sodio como agentes de esterilización para los primeros experimentos. En relación a los dos primeros ensayos, en los cuales se emplearon semillas de distinto origen, la germinación y esterilización en el ensayo B, fue mayor a la observada en el ensayo A.

Existen diversos reportes científicos acerca del cultivo *in vitro* del achiote, que han utilizado semillas como material vegetal de inicio y etanol e hipoclorito de sodio como parte de sus protocolos de esterilización (Almeida et al, 1996; Zaldívar-Cruz et al, 2003; Parimalan et al, 2008; Chi Chi et al, 2016; Vidal et al, 2019). Con respecto al etanol, se han reportado tiempos de exposición de dos a cinco minutos, a una concentración de 70% (Almeida et al, 1996; Zaldívar-Cruz et al, 2003; Parimalan et al, 2008; Chi Chi et al, 2016; Vidal et al, 2019). Con relación al hipoclorito de sodio, se han empleado concentraciones desde 0.1% hasta 4.5% y tiempos de tratamiento de 7 hasta 20 minutos. Utilizando este protocolo de esterilización, reportes anteriores han obtenido porcentajes de germinación superiores al 73% (Almeida et al, 1996; Zaldívar-Cruz et al, 2003; Parimalan et al, 2008; Chi Chi et al, 2016; Vidal et al, 2019). Como se puede observar en el anexo 2, las concentraciones y los tiempos de tratamiento utilizados para etanol e hipoclorito de sodio en el presente trabajo son valores que ya han sido empleados en investigaciones anteriores para el cultivo *in vitro* de esta especie (Almeida et al, 1996; Zaldívar-Cruz et al, 2003; Parimalan et al, 2008; Chi Chi et al, 2016; Vidal et al, 2019). Por lo tanto, esto sugiere que otros factores, externos al protocolo de esterilización, influyeron en los resultados de germinación obtenidos. Se sabe que el proceso de secado de las semillas, es un factor que puede influir en la germinación de las mismas (Goldbach, 1979; Das et al, 2018). Estas

semillas requieren un secado a la sombra, de lo contrario, su tegumento interno se engrosa y, como resultado, se generan conformaciones estructurales dentro de la semilla que dificultan la germinación (Nunes et al, 2013). Además, una característica de todas las semillas de la familia Bixaceae es una testa impermeable, por lo que el proceso de imbibición se ve obstruido en muchos casos (Yogeesha et al, 2005). Por otro lado, en estos experimentos no se obtuvieron resultados esperados en cuanto a la esterilización. De hecho, en el primer ensayo, no se logró esterilizar ningún frasco. Se sabe que una humedad interna elevada del material vegetal podría favorecer a la proliferación de microorganismos (Goldbach, 1978; Yogeesha et al, 2005; Joseph et al, 2011).

Considerando que, al utilizar semillas como material vegetal de inicio para los dos primeros ensayos de esterilización, las tasas de germinación y esterilización fueron bajas, se decidió emplear un protocolo de esterilización de frutos. Con este tipo de protocolos se han reportado tasas de germinación superiores al 93% (Joseph et al., 2011; Parimalan et al., 2011; Mohammed et al., 2015). El presente trabajo está basado en uno de esos reportes científicos, en el cual se utilizaron los siguientes reactivos: un detergente polisorbitol, con el objetivo de romper la tensión superficial del fruto y así permitir que los demás reactivos actúen de manera óptima, un fungicida, con la finalidad de eliminar la carga fúngica presente en la superficie de los frutos y, por último, cloruro mercuríco, como desinfectante (Joseph et al., 2011). En el presente trabajo, se decidió reemplazar el cloruro mercuríco por hipoclorito de sodio, debido a su gran eficiencia de esterilización y su fácil adquisición en el mercado (Teixeira et al, 2019).

Para evaluar si la concentración de hipoclorito de sodio en los ensayos de esterilización directa de semillas fue excesiva, en el ensayo C, se decidió probar diferentes concentraciones de este reactivo. Sin embargo, en este ensayo la germinación no superó

el 6.67%. En un estudio científico acerca del cultivo *in vitro* del achiote, donde también se utilizó hipoclorito de sodio al 2.5%, se obtuvieron resultados mucho más eficientes: una respuesta del 100% en cuanto a la frecuencia de regeneración de brotes por parte de las plantas (Vidal et al., 2019). Esto sugiere que otros factores, aparte de la concentración de hipoclorito de sodio, influyeron en los resultados del ensayo C. Por lo tanto, para los ensayos D y E, se decidió probar diferentes tiempos de exposición a hipoclorito de sodio.

Existen estudios acerca del cultivo *in vitro* del achiote que han utilizado hipoclorito de sodio por un tiempo de exposición de cinco minutos dentro de su protocolo de esterilización, mientras que otros reportes han empleado el mismo reactivo durante 30 minutos (de Cruz et al, 2015; Michelangeli de Clavijo et al, 2002). En este trabajo, se utilizaron tiempos de exposición desde 10 hasta 18 minutos. En el ensayo D, los mejores resultados se obtuvieron con hipoclorito de sodio al 2.5% durante 15 minutos. Por ende, para el ensayo E, se decidió establecer 12 minutos de tratamiento con este agente, con la finalidad de replicar la tasa de esterilización que se obtuvo con 15 minutos, pero mejorar el porcentaje de germinación de las semillas. Sin embargo, en el ensayo E, tanto la esterilización como la germinación, disminuyeron. Es importante mencionar que, en todos los trabajos científicos mencionados anteriormente, se han obtenido tasas de germinación superiores al 85% (Michelangeli de Clavijo et al, 2002; Cruz et al, 2015). Esto sugiere que el tiempo de exposición a hipoclorito de sodio en estos ensayos no fue la causa de la baja tasa de germinación que se registró. Una posible explicación es que la aplicación del fungicida Vitavax sobre los frutos, afectó la germinación de las semillas. Recordando que en los ensayos C, D y E se utilizó este reactivo a una concentración de 0.1%, durante 60 minutos, como se reporta en el artículo de referencia para el protocolo de esterilización utilizado para este proyecto (Joseph et al, 2011). Por esta razón, para los siguientes

ensayos, se decidió fijar la exposición de los frutos a hipoclorito de sodio al 2.5% por 15 minutos y variar el tiempo de exposición al fungicida Vitavax.

Los fungicidas son ampliamente utilizados en el cultivo *in vitro* del achiote y de muchas otras especies. Los fungicidas más utilizados para la esterilización de material vegetal de achiote son: Bavistin, del 0.1% al 1% de concentración, en un tiempo de exposición que varía desde una hasta tres horas; Nistatina al 0.01% durante dos horas y Agrimicina al 0.2% durante dos horas (Parimalan et al., 2007; Joseph et al., 2011; Castello et al., 2012; Siril & Joseph, 2013; de Cruz et al., 2015). Sin embargo, en este estudio se decidió emplear el fungicida Vitavax para realizar lavados del material vegetal, ya que el porcentaje de germinación, las características de crecimiento de la planta y el desarrollo de hojas no se ven afectados, siempre y cuando se lo utilice en una concentración adecuada (Senoussi, 2010). Es necesario aclarar que, hasta el momento, no se han reportado trabajos en los que se use este fungicida en el cultivo *in vitro* de achiote. El fungicida Vitavax tampoco ha sido empleado para realizar lavados de frutos. De hecho, la forma más común de utilizar el fungicida es disolviéndolo dentro del medio de cultivo, es decir, no lo emplean de manera directa sobre el material vegetal (Quintero & Urdaneta, 1997; Shovan et al., 2008; Abu-Taleb et al., 2008).

En el ensayo F, con 45 y 60 minutos de exposición a Vitavax, se obtuvo una tasa de germinación alta. Sin embargo, en este ensayo se empleó un número relativamente bajo de semillas; 20 por cada tratamiento. Por ello, es probable que los datos de la germinación obtenidos en este experimento, no sean estadísticamente significativos. Por lo tanto, para el ensayo G se decidió aumentar el número de semillas para cada tratamiento. Un estudio recomienda un mínimo de 100 semillas para obtener resultados estadísticamente significativos (Giannetti et al, 2020). Como se muestra en la tabla 4, el

porcentaje de germinación en el ensayo G fue de 36% o menos. Por lo tanto, se decidió realizar nuevamente este experimento en el ensayo H, con el fin de corroborar estos resultados.

En el ensayo H, los resultados de la esterilización superaron el 80%, sin embargo, no se observó germinación en ningún frasco. Esto sugiere que los tiempos de exposición empleados en el ensayo H fueron muy prolongados, considerado que el fungicida Vitavax nunca ha sido reportado como un agente para realizar lavados de frutos. Además, se sabe que un tiempo de exposición muy prolongado, a la gran parte de fungicidas, puede afectar el vigor de las semillas (Lozano et al, 2006). Por lo tanto, para el ensayo I, se decidió probar tiempos menores de tratamiento con Vitavax. En este experimento no se logró esterilizar ningún frasco con 20 y 30 minutos de tratamiento de Vitavax. Se sabe que el tiempo mínimo de tratamiento con algún fungicida dentro del cultivo *in vitro* del achote es de 60 minutos (Joseph et al, 2011). Por lo tanto, es muy probable que los tiempos de exposición al fungicida, utilizados en el ensayo I, fueron muy débiles. Esto nos hacen pensar que existen varios factores que influyen en los resultados de este tipo de protocolos. Por ejemplo, se sabe que mientras más maduros son los frutos, la testa de las semillas se vuelve más compacta, afectando la germinación (Lopes et al, 2008; Das et al, 2018).

Por último, el tiempo promedio de germinación registrado en este proyecto fue de ocho días. Período de tiempo que se ajusta bastante bien con los resultados reportados en la literatura. En el estudio científico que sirvió como referencia para este trabajo, se reportó un tiempo promedio de germinación de 15.16 días, utilizando el mismo medio de cultivo y la misma hormona que se empleó en esta investigación (Joseph et al, 2011).

## 5. CONCLUSIONES

El establecimiento de un protocolo de esterilización del material vegetal de variedades nativas es un campo desconocido, lo cual representa un reto. En general, la tasa de germinación del achiote es baja, independientemente de los reactivos que se utilicen para su esterilización, por lo que la baja tasa de germinación reportada en este estudio no estaría influenciada necesariamente por la aplicación de los diferentes desinfectantes utilizados. Por otro lado, se notó que es necesario el uso de un fungicida para este tipo de protocolo, ya que la mayor parte de la contaminación observada en los frascos fue por hongos. Hasta el momento, se han visto resultados alentadores al usar una concentración de hipoclorito de sodio de 2.5%, durante 15 minutos y una exposición a Vitavax (0.1%) por 45 minutos, en donde las tasas de germinación fueron de 100% y la tasa de esterilización de 100%. No obstante, estos resultados no son concluyentes, por lo que es necesario probar nuevos ensayos de exposición a estos reactivos para finalmente estandarizar este protocolo de esterilización.

Es necesario recalcar la importancia del trabajo con especies nativas, el cual muchas veces presenta limitaciones, por lo que esta investigación ha tratado de dar los primeros pasos en cuanto a la introducción del achiote a condiciones estériles. Se recomienda probar otros protocolos de esterilización directa con semillas, considerando factores como la humedad interna, el almacenamiento del material vegetal y la edad de la planta, por lo que se sugiere estandarizar el proceso de colección y almacenamiento. Por otro lado, se propone que la procedencia, así como es estado de madurez del fruto son factores que puede influir sobre los resultados obtenidos en este tipo de protocolos. Por último, se recomienda el uso de un número mayor de semillas para ensayos futuros, con el fin de obtener resultados concluyentes.

## 6. TABLAS

**Tabla 1: Resultados de los ensayos de esterilización directa de semillas utilizando hipoclorito de sodio al 2.5% (Ensayos A y B).** Cada letra en mayúscula representa cada ensayo. Ensayo A: semillas de La Fabril S.A. Ensayo B: semillas de Pallatanga. MS: Murashige y Skoog. AM: medio basal.  $GA_3$ : ácido giberélico. \*Tiempo de germinación: 14 días.

Ensayo	Tipo de Medio	Semillas germinadas (%)	Frascos estériles (%)
A	MS + $GA_3$	0%	0%
	AM	0%	0%
B*	MS + $GA_3$	20%	0%
	AM	10%	100%

**Tabla 2: Resultados del ensayo de esterilización de fruto variando la concentración de hipoclorito de sodio (Ensayo C).** Cada número representa cada tratamiento. Tratamiento 1: 0.1%. Tratamiento 2: 1%. Tratamiento 3: 2.5%. MS: Murashige y Skoog.  $GA_3$ : ácido giberélico.

Tratamiento	Tipo de Medio	Semillas germinadas (%)	Frascos estériles (%)
1	MS + $GA_3$	0%	0%
2	MS + $GA_3$	0%	0%
3	MS + $GA_3$	6.67%	33.33%

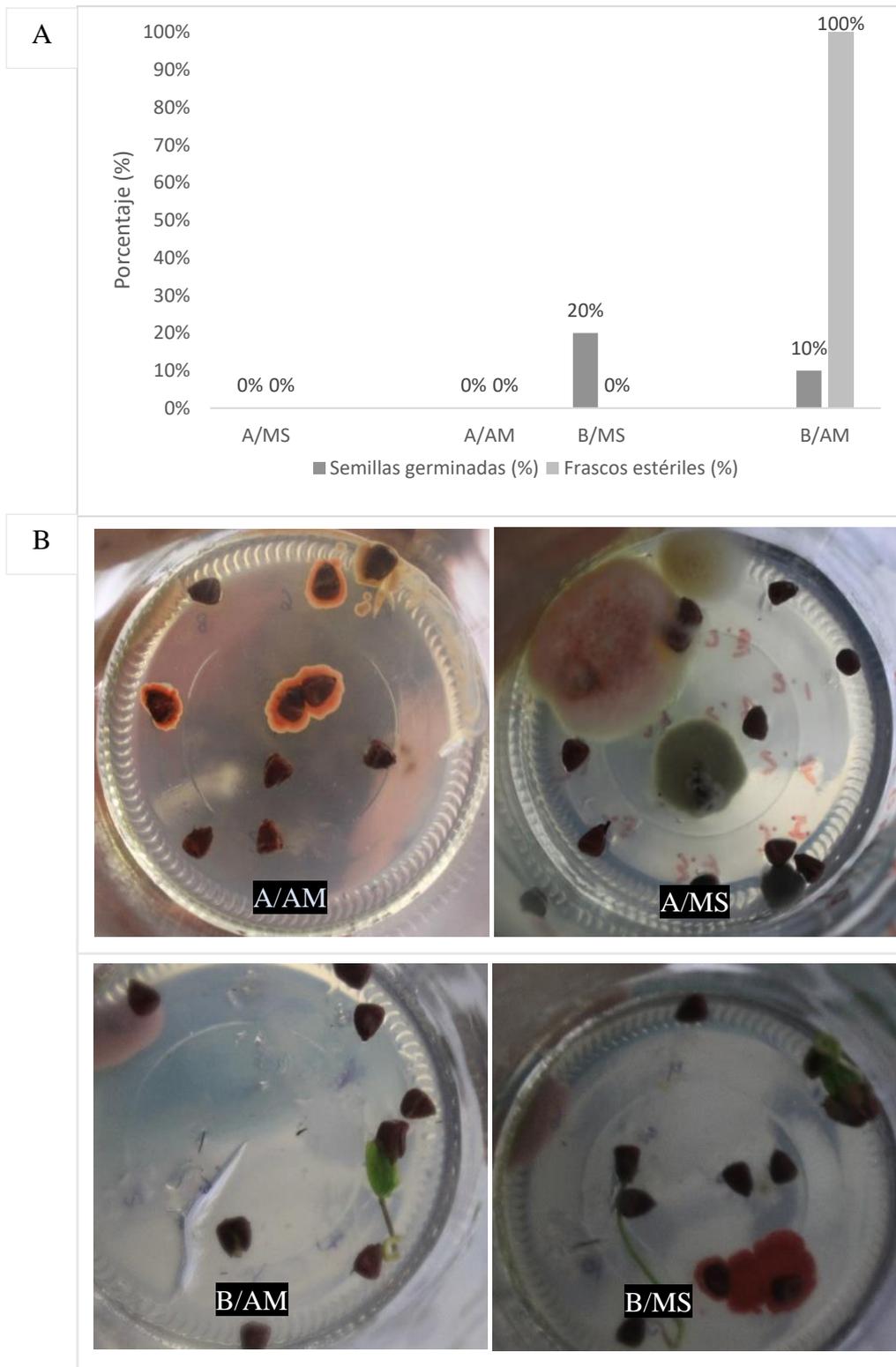
**Tabla 3: Resultados de los ensayos de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con hipoclorito de sodio (Ensayos D y E).** Cada letra en mayúscula representa cada ensayo. Cada número representa cada tratamiento. Ensayo D: 10, 15 y 18 minutos. Ensayo E: 12, 15 y 18 minutos. MS: Murashige y Skoog. AM: medio basal.  $GA_3$ : ácido giberélico. \*Tiempo de germinación: 12 días \*\*Tiempo de germinación: 4 días.

Ensayo	Tratamiento	Tipo de Medio	Semillas germinadas (%)	Frascos estériles (%)
D*	1	MS + $GA_3$	6.67%	33.33%
	2	MS + $GA_3$	23.33%	100%
	3	MS + $GA_3$	13.33%	100%
E**	1	MS + $GA_3$	70%	0%
		AM	60%	0%
	2	MS + $GA_3$	50%	0%
		AM	50%	0%
	3	MS + $GA_3$	0%	0%
		AM	10%	0%

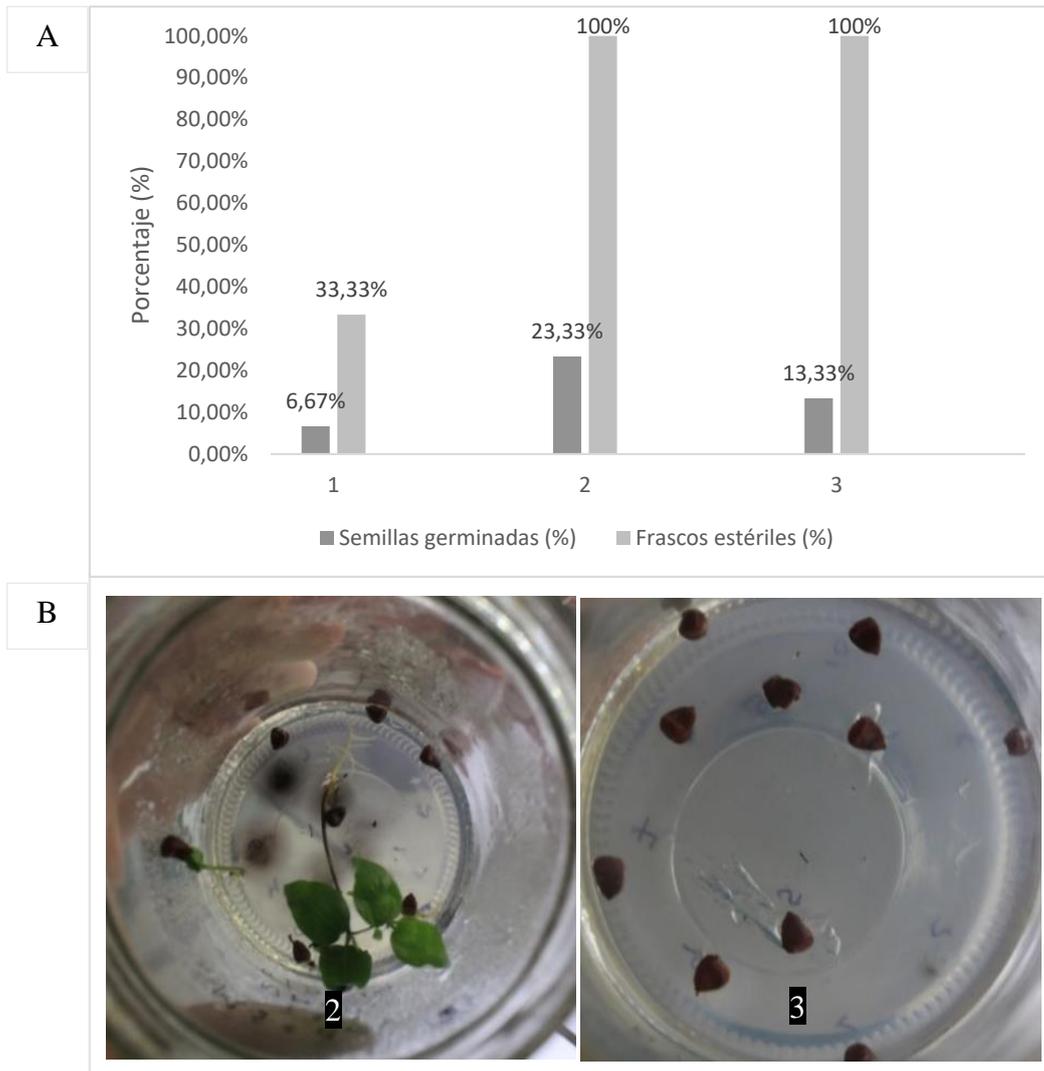
**Tabla 4: Resultados de los ensayos de esterilización de fruto probando diferentes tiempos de exposición a Vitavax (Ensayos F, G, H e I).** Cada letra en mayúscula representa cada ensayo. Cada número representa cada tratamiento. Ensayo F: 30, 45 y 60 minutos. Ensayo G: 45 y 60 minutos. Ensayo H: 45 y 60 minutos. Ensayo I: 20, 30 y 40 minutos. MS: Murashige y Skoog. AM: medio basal.  $GA_3$ : ácido giberélico. \*Tiempo de germinación: 7 días. \*\*Tiempo de germinación: 4 días. \*\*\*Tiempo de germinación: 9 días.

Ensayo	Tratamiento	Tipo de Medio	Semillas germinadas (%)	Frascos estériles (%)
F*	1	MS + $GA_3$	70%	0%
		AM	70%	0%
	2	MS + $GA_3$	100%	100%
		AM	100%	100%
	2	MS + $GA_3$	100%	100%
		AM	0%	0%
G**	1	AM	36%	20%
	2	AM	8%	40%
H	1	AM	0%	80%
		MS + $GA_3$	0%	100%
	2	AM	0%	100%
		MS + $GA_3$	0%	100%
I***	1	AM	18%	0%
		MS + $GA_3$	24%	0%
	2	AM	28%	0%
		MS + $GA_3$	36%	0%
	3	AM	60%	20%
		MS + $GA_3$	64%	20%

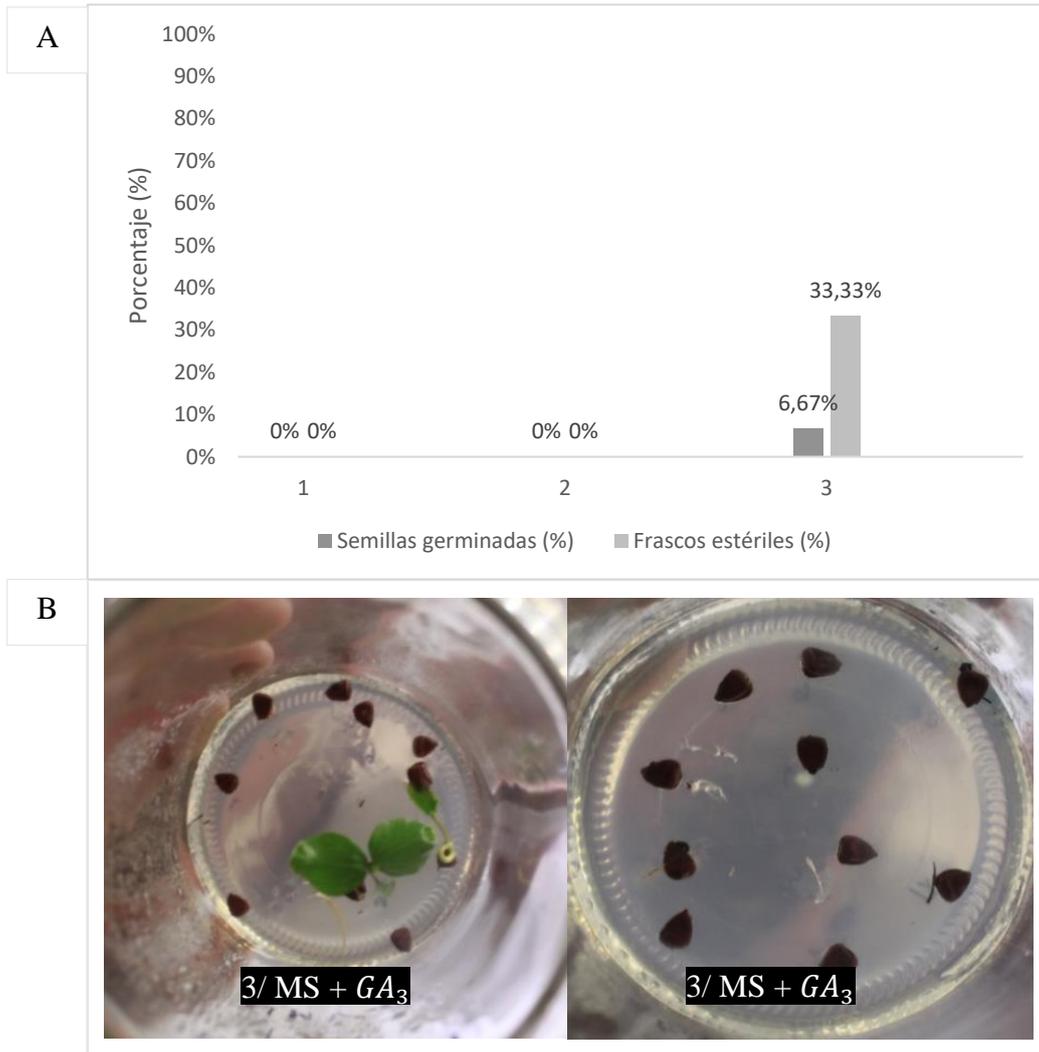
## 7. FIGURAS



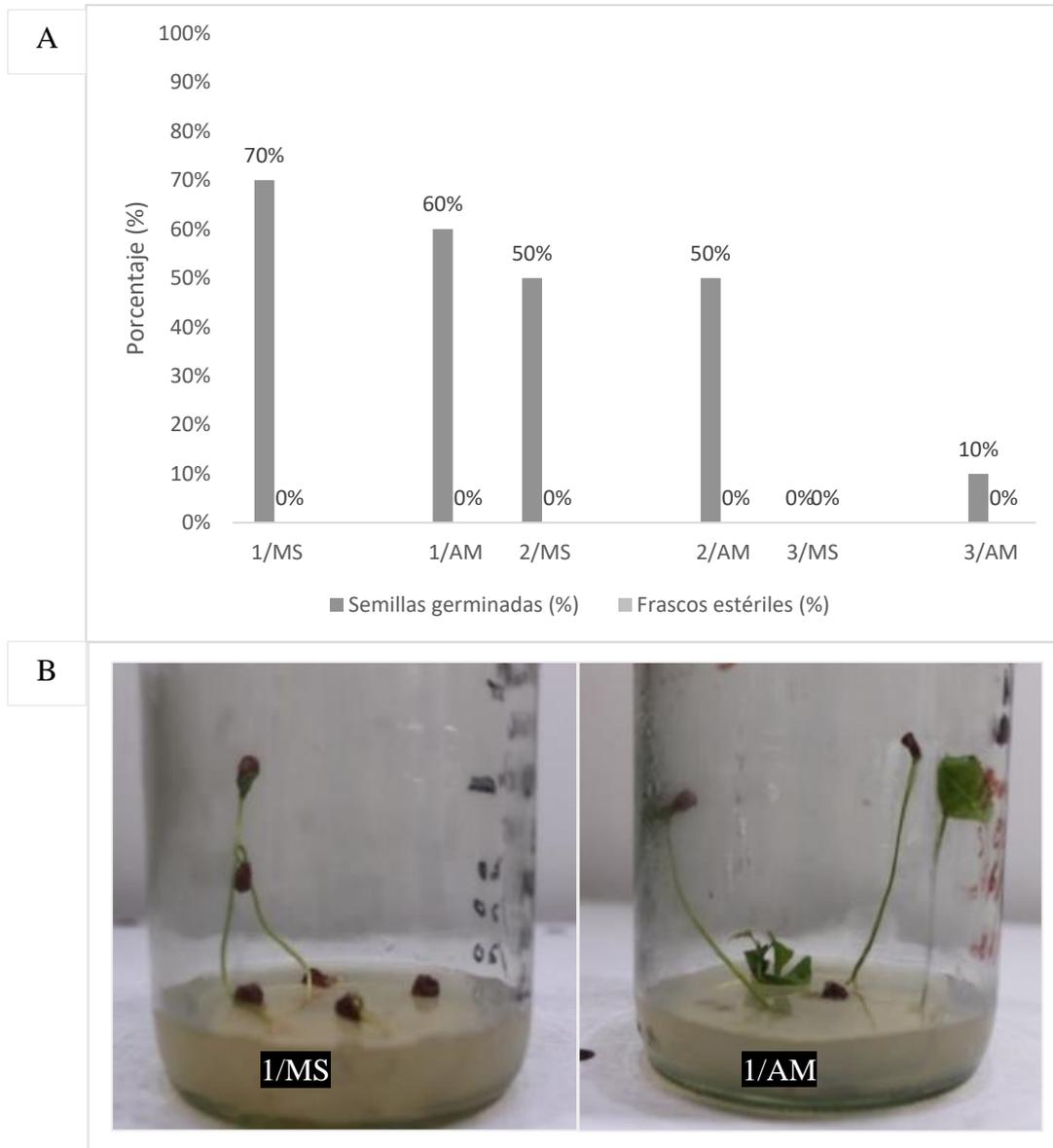
**Figura 1: Resultados de los ensayos de esterilización directa de semillas. A:** porcentajes de germinación y esterilización. **B:** Fotografías de los ensayos A y B.



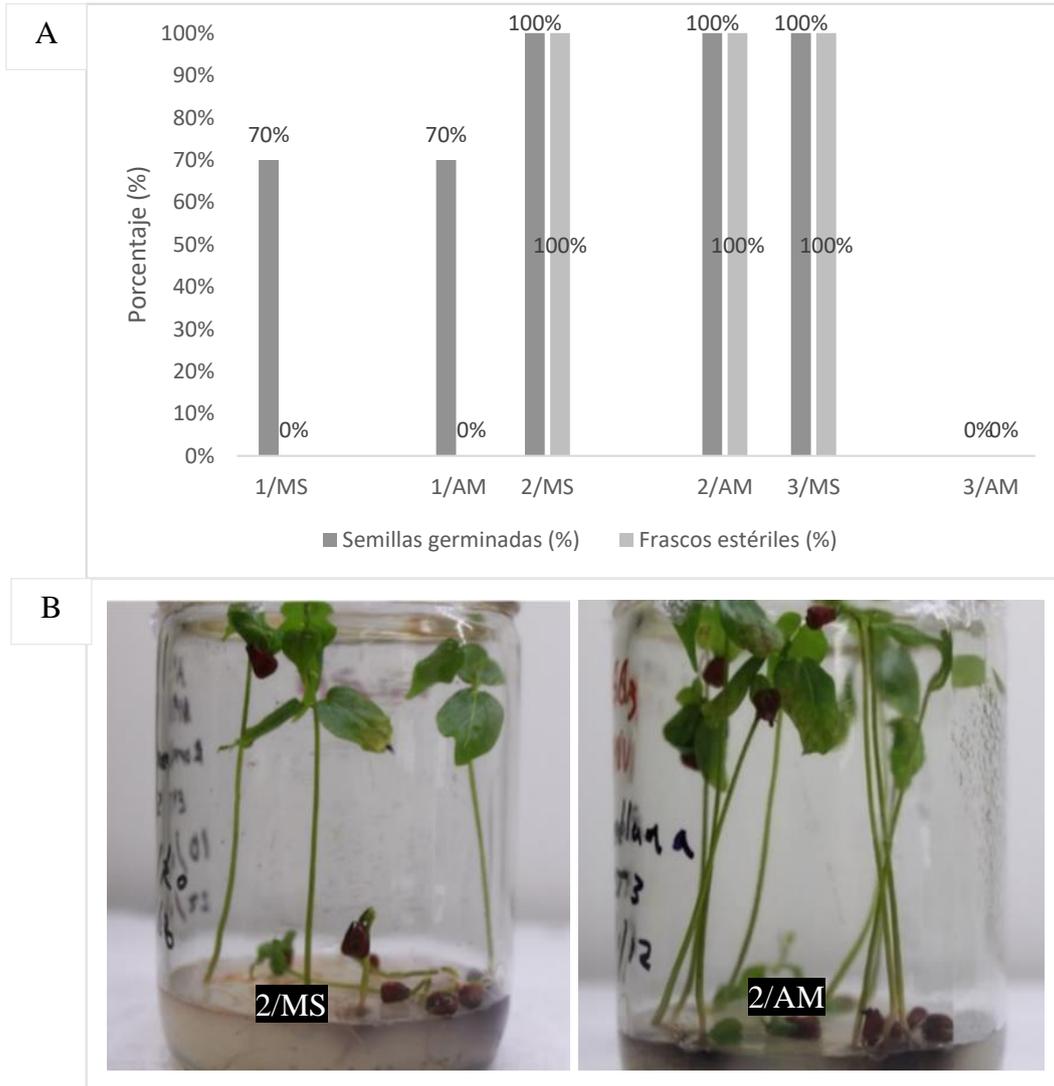
**Figura 2: Resultados del ensayo de esterilización de fruto variando la concentración de hipoclorito de sodio (Ensayo C). A: Porcentajes de germinación y esterilización. B: fotografías del ensayo C.**



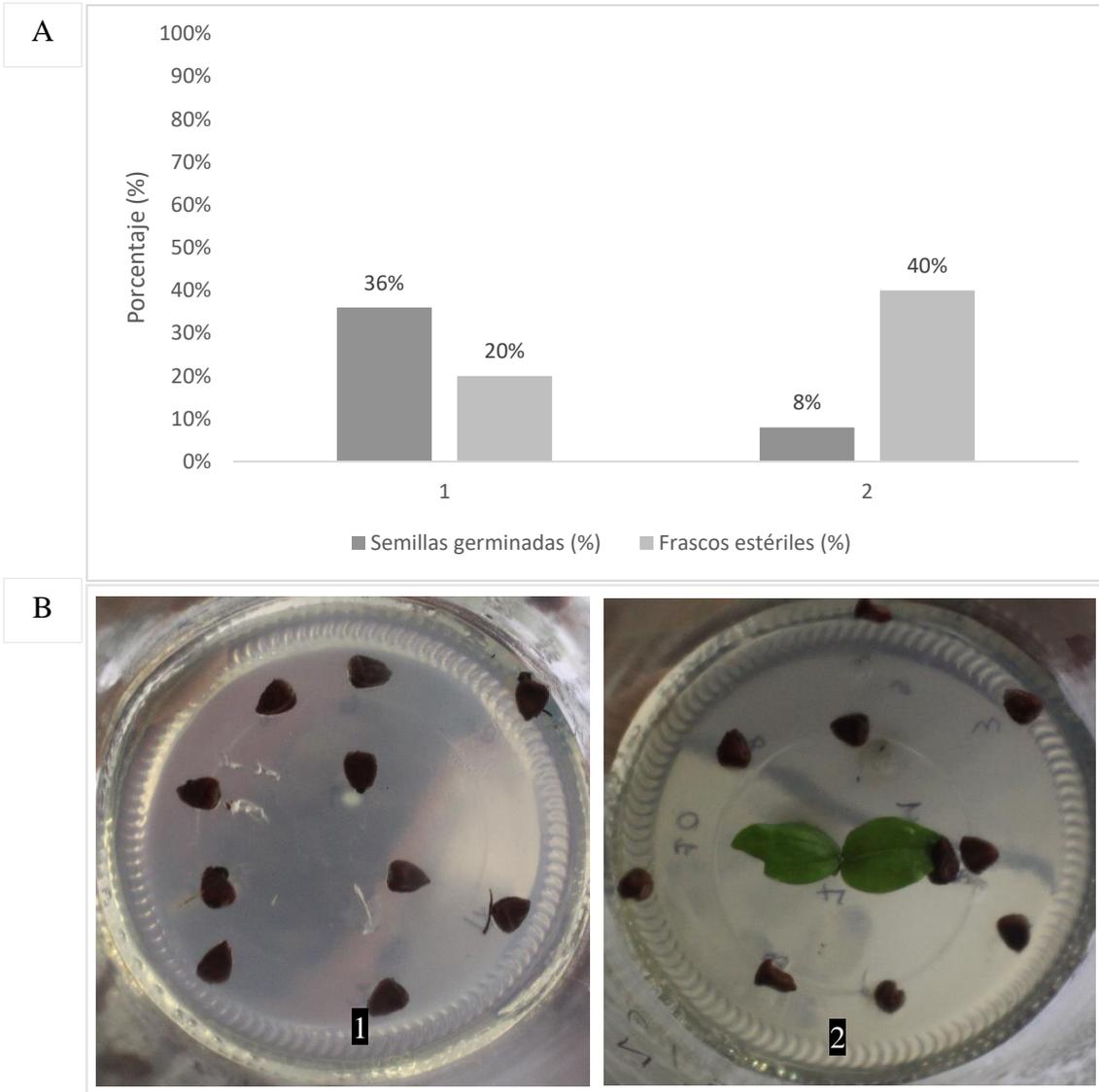
**Figura 3: Resultados del primer ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con hipoclorito de sodio (Ensayo D). A: porcentajes de germinación y esterilización. B: fotografías del ensayo D.**



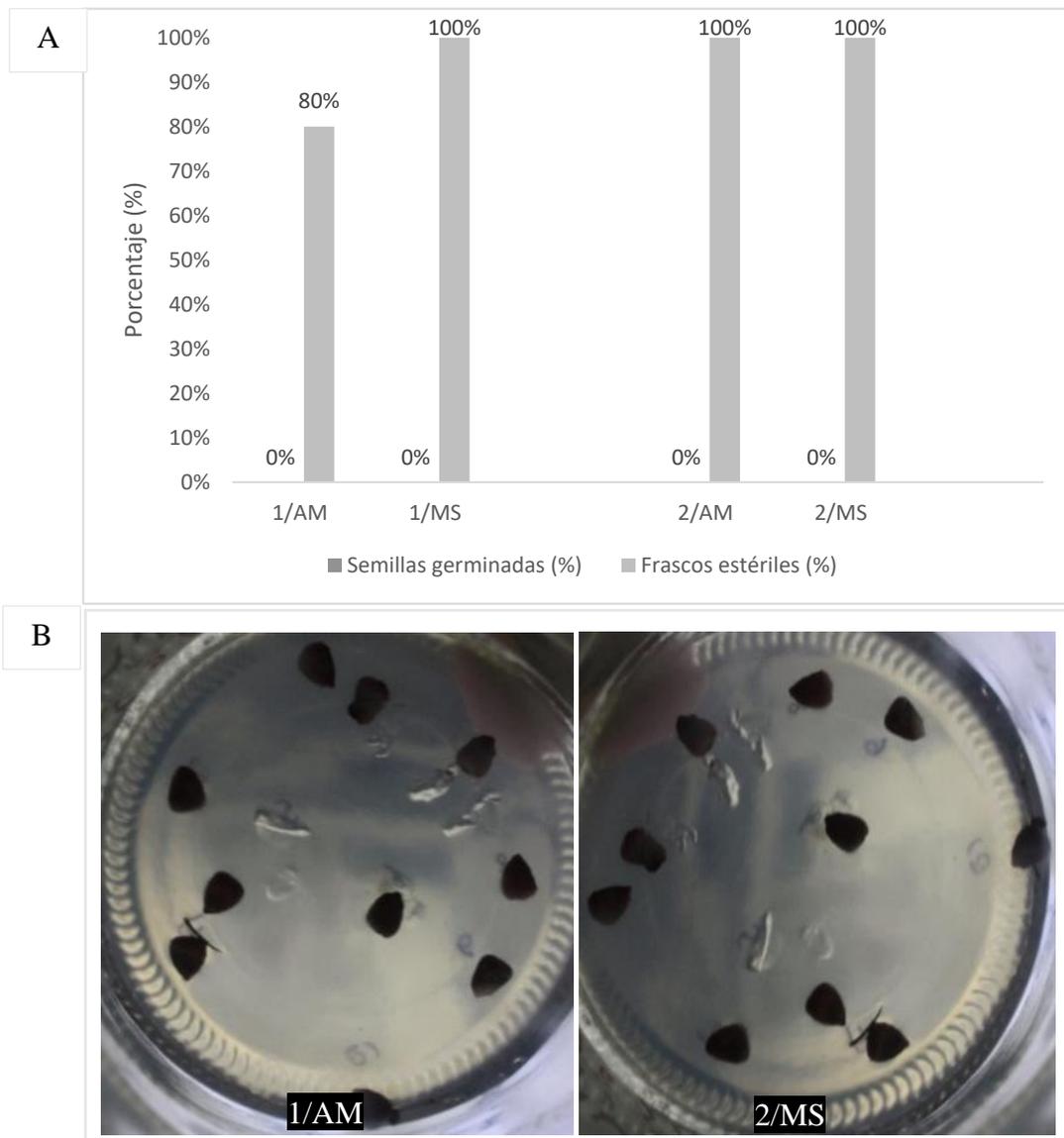
**Figura 4: Resultados del segundo ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con hipoclorito de sodio (Ensayo E). A: porcentajes de germinación y esterilización. B: fotografías del ensayo E.**



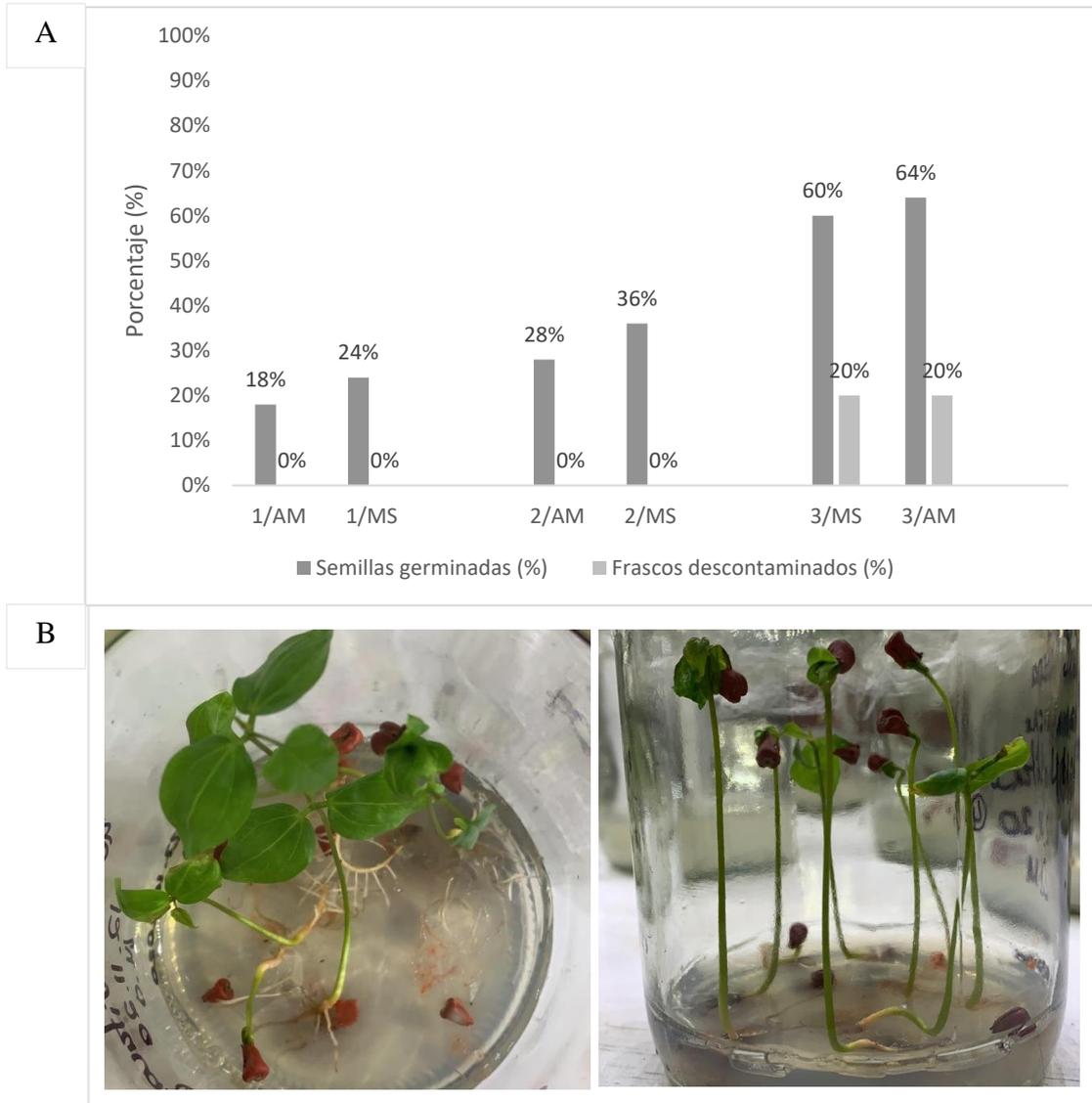
**Figura 5: Resultados del primer ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con Vitavax (Ensayo F). A: porcentajes de germinación y esterilización. B: fotografías del ensayo F.**



**Figura 6: Resultados del segundo ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con Vitavax (Ensayo G). A: porcentajes de germinación y esterilización. B: fotografías del ensayo G.**



**Figura 7: Resultados del tercer ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con Vitavax (Ensayo H). A: porcentajes de germinación y esterilización. B: fotografías del ensayo H.**



**Figura 8: Resultados del cuarto ensayo de esterilización de fruto variando el tiempo de exposición con Vitavax (Ensayo I). A: porcentajes de germinación y esterilización. B: fotografías del ensayo I.**

## 8. REFERENCIAS

- Abu-Taleb et al. (2008). *Evaluation of antifungal activity of Vitavax and Trichoderma viride against two wheat root rot pathogens*. Recuperado el 12 de octubre de 2020 de [https://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/amal\\_almosa\\_amira\\_abu\\_taleb.pdf](https://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/amal_almosa_amira_abu_taleb.pdf)
- Adama. (2020). *Vitavax*. Recuperado el 12 de octubre de 2020 de [http://www.adama.com/documents/392363/398678/FT-VITAVAX\\_400-020920](http://www.adama.com/documents/392363/398678/FT-VITAVAX_400-020920)
- Aguirre, M., Kvist, L. & Sánchez, O. (2006). *Bosques secos en Ecuador y su diversidad*. Recuperado el 30 de marzo de 2020 de [https://www.researchgate.net/profile/Monica\\_Moraes\\_R/publication/312313242\\_Botanica\\_Economica\\_de\\_los\\_Andes\\_Centrales/links/587988a408ae9a860fe2f2ad/Botanica-Economica-de-los-Andes-Centrales.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Monica_Moraes_R/publication/312313242_Botanica_Economica_de_los_Andes_Centrales/links/587988a408ae9a860fe2f2ad/Botanica-Economica-de-los-Andes-Centrales.pdf)
- Aguirre, Z., Merino, B. & Gutiérrez, M. (2013). *Principales familias de árboles, arbustos y hierbas del sur del Ecuador*. Recuperado el 30 de marzo de 2020 de [https://www.academia.edu/8450870/Guia\\_de\\_las\\_familias\\_bot%C3%A1nicas\\_del\\_sur\\_del\\_Ecuador](https://www.academia.edu/8450870/Guia_de_las_familias_bot%C3%A1nicas_del_sur_del_Ecuador)
- Almeida JL, Almeida FCG, Nunes RDEP, Almeida FAG (1996). *Bud initiation in leaf explants of annatto seedlings in different cytokinins*. Ciênc Rural 26:45–49 (in Portuguese with English abstract)
- Ambrósio, P., Lins, J., Dequigiovanni, G., Veasey, E. & Clement, C. (2015). *La domesticación de Annatto (Bixa orellana) de Bixa urucurana en la Amazonía*. Recuperado el 31 de marzo de 2020 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s12231-015-9304-0>

- Artieda, S. (2010). *Estudio investigativo del achiote, cultivo, producción, usos y aplicación en la gastronomía*. Recuperado el 11 de junio de 2020 de [http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11516/1/40848\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11516/1/40848_1.pdf)
- Bagot, M. (2005). *El cultivo in vitro en la reproducción vegetativa en plantas de vivero*. Recuperado el 8 de abril de 2020 de [http://www.horticom.com/Revistasonline/extras/2005/M\\_Estopa.pdf](http://www.horticom.com/Revistasonline/extras/2005/M_Estopa.pdf)
- Bedoya-Pérez, J., Sánchez-Jaramillo, C., Bermúdez-Gómez, S. & Ramírez, S. (2016). *Estandarización de un protocolo de esterilización y establecimiento de cultivo in vitro de Aloysia tryphilla*. Recuperado el 11 de diciembre de 2020 de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n2/v14n2a05.pdf>
- Berendsohn, W. (2012). *Introduction: "the Silva Cuscatlantica"*. Recuperado el 11 de junio de 2020 de [https://www.jstor.org/stable/24368335?read-now=1&seq=5#page\\_scan\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/24368335?read-now=1&seq=5#page_scan_tab_contents)
- Bouvier, F., Dogbo, O. & Camara, B. (27 de junio de 2003). *Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto)*. Recuperado el 23 de junio de 2020 de [https://www.jstor.org.ezbiblio.usfq.edu.ec/stable/pdf/3834418.pdf?ab\\_segments=0%252Fbasic\\_SYC-5187%252Ftest&refreqid=excelsior%3Ab00f90d778237ccf0ef8cfbefba13681](https://www.jstor.org.ezbiblio.usfq.edu.ec/stable/pdf/3834418.pdf?ab_segments=0%252Fbasic_SYC-5187%252Ftest&refreqid=excelsior%3Ab00f90d778237ccf0ef8cfbefba13681)
- Caiza, N. (2019). *Extracción de colorantes en Bixa orellana L. (achiote) y su aplicación en formas farmacéuticas líquidas*. Recuperado el 11 de junio de 2020 de <http://200.12.169.19/bitstream/25000/18817/1/T-UCE-0008-CQU-140.pdf>

- Cárdenas, C., et.al. (2018). *Propagación in vitro de especie endémica de los Paramos colombianos*. Recuperado el 27 de agosto de 2020 de <https://www.scielo.br/pdf/rod/v70/2175-7860-rod-70-e00682018.pdf>
- Castello MC, Sharan M, Sharon M (2012a) *In vitro culture studies of Bixa orellana L: II – Bixin accumulation in root and hypocotyl derived callus*. Eur J Exp Biol 2:151–155
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34431273/Propagacion\\_de\\_plantas\\_por\\_cultivo\\_in\\_vitro.pdf?response-content-](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34431273/Propagacion_de_plantas_por_cultivo_in_vitro.pdf?response-content-)
- Causil, L., Coronado, J., Verbel, L., Vega, M., Donado, K. & Pacheco, C. (2017). Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). Recuperado el 12 de diciembre de 2020 de <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5662>
- Chi Chi LC, Barredo Pool FA, Godoy Hernández G, Rivera-Madrid R, Pinzón López L, Villanueva Cohuoh E (2016). *Análisis histológico del proceso morfogénico de Bixa orellana*. Rev Centro Graduados e Investigación (Instituto Tecnológico de Mérida) 31:62–64 (in Spanish with English abstract)
- Choi, G., Ghimire, B., Lee, H. & Jeong, G. (2016). *Scarification and stratification protocols for breaking dormancy of Rubus (Rosaceae) species in Korea*. Recuperado el 11 de Agosto de 2020 de [304812115\\_Scarification\\_and\\_stratification\\_protocols\\_for\\_breaking\\_dormancy\\_of\\_Rubus\\_Rosaceae\\_species\\_in\\_Korea](https://doi.org/10.1007/s12249-016-9304-4)

- da Cruz ACF, Rocha DI, Iarema L, Ventrella MC, Costa MGC, Neto VBP, Otoni WC (2014) *In vitro organogenesis from root culture segments of Bixa orellana L. (Bixaceae)*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 50:76–83
- da Cruz ACF, Pinheiro MVM, Xavier A, Otoni WC, Costa MGC, Paiva Neto VB, Rêgo MM (2015) *In vitro regeneration of annatto (Bixa orellana L.) plantlets from nodal and internodal adult stem segments*. *Acta Horti* 1083:335–346
- de Carvalho JFRP, de Carvalho CRP, Otoni WC (2005a) *In vitro regeneration of annatto (Bixa orellana L.) from various explants*. *Revista Árvore* 29:887–895 (in Portuguese with English abstract)
- D’Souza MC, Sharon M (2001). *In vitro clonal propagation of annatto (Bixa orellana L.)*. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37:168–172
- El Diario. (14 de julio de 2017). *El achiote en todo su “boom”*. Recuperado el 8 de abril de 2020 de <http://www.eldiario.ec/noticias-manabi-ecuador/440072-el-achiote-en-todo-su-boom/>
- Fernández, E. (10 de diciembre de 2016). *Cómo llegó la gastronomía mexicana a ser patrimonio de la humanidad*. Recuperado el 9 de abril de 2020 de <https://www.forbes.com.mx/forbes-life/gastronomia-mexicana-patrimonio-de-la-humanidad/>
- Ferreira, et.al. (21 de noviembre de 2014). *In vitro organogenesis from root culture segments of Bixa orellana L. (Bixaceae)*. Recuperado el 11 de junio de 2020 de [https://www.researchgate.net/publication/259623789\\_In\\_vitro\\_organogenesis\\_from\\_root\\_culture\\_segments\\_of\\_Bixa\\_orellana\\_L\\_Bixaceae](https://www.researchgate.net/publication/259623789_In_vitro_organogenesis_from_root_culture_segments_of_Bixa_orellana_L_Bixaceae)

- Godi, H., Yao, K., Koffi, K. & Pierre, E. (2013). *Influence of the storage conditions on moisture and bixin levels in the seeds of Bixa orellana L.* Recuperado el 3 de diciembre de 2020 de [https://www.researchgate.net/publication/263587383\\_Influence\\_of\\_the\\_storage\\_conditions\\_on\\_moisture\\_and\\_bixin\\_levels\\_in\\_the\\_seeds\\_of\\_Bixa\\_orellana\\_L](https://www.researchgate.net/publication/263587383_Influence_of_the_storage_conditions_on_moisture_and_bixin_levels_in_the_seeds_of_Bixa_orellana_L)
- Guarín, K. (2019). *Extracción de pigmento rojo de achiote (Bixa orellana) y oleorresina roja de paprika (Capsicum annum) en la formulación de pinturas para juguetes de madera.* Recuperado el 24 de junio de 2020 de <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7591/1/6141247-2019-2-IQ.pdf>
- Instituto Nacional de Medicina. (2020). *Monografías de plantas medicinales: Achiote (Bixa orellana L.)*. Recuperado el 20 de junio de 2020 de <https://web.ins.gob.pe/es/salud-intercultural/medicina-tradicional/farmacopea-herbolaria/monografia-de-plantas-medicinales>
- Jondiko, J., Akinyi, D. & Nodonga, M. (2019). *Mosquito repellency and larvicidal activities of essential oils from the seeds of annatto (Bixa orellana L.)*. Recuperado el 8 de agosto de 2020 de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103346650>
- Joseph, N., Elenjikkal, S. & Nair, G. (2011). *Una metodología eficiente de propagación in vitro para Annatto (Bixa orellana L.)*. Recuperado el 1 de abril de 2020 de [https://www.researchgate.net/publication/236189628\\_An\\_efficient\\_in\\_vitro\\_propagation\\_methodology\\_for\\_Annatto\\_Bixa\\_orellana\\_L](https://www.researchgate.net/publication/236189628_An_efficient_in_vitro_propagation_methodology_for_Annatto_Bixa_orellana_L)

Kumar, N. & Reddy, M. (2011). Propagación de plantas in vitro: una revisión.

Recuperado el 12 de diciembre de 2020 de

[https://www.researchgate.net/publication/263638941\\_In\\_vitro\\_Plant\\_Propagation\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/263638941_In_vitro_Plant_Propagation_A_Review)

Kumer, M., Hena, M. & Nasrin, S. (2013). *Sterilization factors affect seed germination*

*and proliferation of Achyranthes aspera cultured in vitro*. Recuperado el 20 de abril de 2020 de

[https://www.researchgate.net/profile/Monokesh\\_Sen/publication/281491274\\_Sterilization\\_factors\\_affect\\_seed\\_germination\\_and\\_proliferation\\_of\\_Achyranthes\\_aspera\\_cultured\\_in\\_vitro/links/55ead1dd08ae65b6389c6e8f.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Monokesh_Sen/publication/281491274_Sterilization_factors_affect_seed_germination_and_proliferation_of_Achyranthes_aspera_cultured_in_vitro/links/55ead1dd08ae65b6389c6e8f.pdf)

La Hora. (19 de abril de 2019). *Tsáchilas resaltan los 'poderes' del achiote en Santo*

*Domingo*. Recuperado el 9 de abril de 2020 de

<https://www.lahora.com.ec/noticia/1102237506/tsachilas-resaltan-los-poderes-del-achiote-ezn-santo-domingo>

Leal, F. & Michelangeli, C. (2012). *Annatto: botánica y horticultura*. Recuperado el 20

de abril de 2020 de

[https://www.researchgate.net/publication/287484733\\_Annatto\\_Botany\\_and\\_Horticulture](https://www.researchgate.net/publication/287484733_Annatto_Botany_and_Horticulture)

Lopes, J., Lima, R. & Macedo, C. (2008). *Annatto seeds germination at different*

*maturation stadia*. Recuperado el 3 de diciembre de 2020 de

[https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362008000100004&script=sci\\_abstract](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362008000100004&script=sci_abstract)

- Lourido, H. & Martínez, G. (2010). *Bixa orellana L. in treatment of stomatology affections: a subject that has not studied yet*. Recuperado el 1 de abril de 2020 de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152010000200012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152010000200012)
- Lozada, L. (2003). *Flora de Guerrero: Bixaceae*. Recuperado el 1 de abril de 2020 de <http://biologia.fciencias.unam.mx/plantasvasculares/PDF%20FLORAS/16%20Bixaceae.pdf>
- Mahendranath G, Venugopalan A, Parimalan R, Giridhar P, Ravishankar GA (2011). *Annatto pigment production in root cultures of achiote (Bixa orellana L.)*. Plant Cell Tissue Organ Cult 106:517–522
- Michelangeli de Clavijo CC, Artioli PIG, Medina AMM (2002) *Somatic embryogenesis in annatto*. Agron Trop 52:523–541 (in Spanish with English abstract)
- Michelangeli de Clavijo, C.C. et al. (2003). *Anatomía y ultraestructura de la embriogénesis somática sobre el Onoto*. *Agronomía Tropical*. V53N1. Maracay, marzo. Recuperado el 20 de abril de 2020 de <http://www.cich.org/Publicaciones/03/CNTAF-Manual-Tecnico-del-Achiote.pdf>
- Milliken, W. (1997). *Traditional Anti-Malarial Medicine in Roraima, Brazil*. Recuperado el 20 de junio de 2020 de <http://www.jstor.com/stable/4255962>
- Mohammad, B., Rezaer, S., Hosseini, F. & Karazhyan, R. (2018). *In Vitro Evaluation of Antimold Activity of Annatto Natural Dye and Its Effects on Microbial, Physicochemical, and Sensory Properties of Bread*. Recuperado el 25 de agosto de 2020 de <https://meridian.allenpress.com/jfp/article-abstract/81/10/1598/104692>

- Narváez, E. y Mena, C. (2015). *Aislamiento y caracterización visible e infrarroja del colorante de achiote (Bixa orellana)*. Recuperado el 11 de junio de 2020 de <http://investigaciones.puce.edu.ec/handle/23000/748>
- Nunes, D., Cortina, J., Dias, A., Faria, G. & Alves, C. (2013). Germinación de semillas de achiote en función de métodos para superar la latencia y las temperaturas. Recuperado el 11 de diciembre de 2020 de [https://www.researchgate.net/publication/260775820\\_Germination\\_of\\_annatto\\_seeds\\_according\\_to\\_different\\_methods\\_for\\_breaking\\_dormancy\\_and\\_temperatures](https://www.researchgate.net/publication/260775820_Germination_of_annatto_seeds_according_to_different_methods_for_breaking_dormancy_and_temperatures)
- Olivera, G., Tamariz A., & Gutiérrez, C. (18 de agosto de 2010). *Disinfection and influence of naftalen acetic acid and benzil aminopurine on the in vitro multiplication of Perezia coerulescens, high-land medicinal plant*. Recuperado el 9 de abril de 2020 de [http://revistas.unasam.edu.pe/index.php/Aporte\\_Santiaguino/article/view/429/400](http://revistas.unasam.edu.pe/index.php/Aporte_Santiaguino/article/view/429/400)
- Pacheco, S. et.al. (2019). *Efectos antinociceptivos y antiinflamatorios de la bixina, un carotenoide extraído de las semillas de Bixa orellana*. Recuperado el 20 de abril de 2020 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31546267>
- Parimalan R, Giridhar P, Gururaj HB, Ravishankar GA (2007). *Organogenesis from cotyledon and hypocotyls derived explants of japhara (Bixa orellana L.)*. Act Bot Croat 66:153–160

- Parimalan R, Giridhar P, Gururaj HB, Ravishankar GA (2008). *Mass multiplication of Bixa orellana L. through tissue culture for commercial propagation*. Ind Crops and Prod 28:122–127
- Parimalan R, Giridhar P, Gururaj HB, Ravishankar GA (2009). *Micropropagation of Bixa orellana using phytohormones and triacontanol*. Biol Plant 53:347–350
- Pech-Hoil R, Ferrer MM, Aguilar-Espinosa M, Valdez-Ojeda R, Garza-Caligaris LE, Rivera-Madrid R (2017). *Variation in the mating system of Bixa orellana L. (achiote) under three different agronomic systems*. Sci Hortic 223:31–37
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro Culture of Higher Plants*. Recuperado el 20 de abril de 2020 de <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=eUWe9894KzwC&oi=fnd&pg=PA1&dq=in+vitro+culture+of+higher+plants&ots=ccGXBjHh8M&sig=cv5PYTRr8HC8ibQXMsZ0LtKH2Og#v=onepage&q=in%20vitro%20culture%20of%20higher%20plants&f=false>
- Payes, E., Cano, T. & Mérida, M. (2017). *Obtención y caracterización fisicoquímica del extracto colante del achiote (Bixa orellana L.) a nivel laboratorio*. Recuperado el 16 de diciembre de 2020 de <https://core.ac.uk/download/pdf/80749109.pdf>
- Quintero, E. & Urdaneta, L. (1997). *Evaluación in vitro de fungicidas para el control del hongo Macrophoma sp., agente causal de la pudrición apical del fruto del Guayabo (Psidium guajava L.)*. Recuperado el 12 de octubre de 2020 de [https://www.revfacagronluz.org.ve/v14\\_2/v142z007.html](https://www.revfacagronluz.org.ve/v14_2/v142z007.html)
- Rojas, J., Ochoa, V. Ocampo, S. & Muñoz, J. (17 de febrero de 2006). *Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric*

*medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections.*

Recuperado el 15 de junio de 2020 de  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1395329/>

Seclén, L. (2016). *Obtaining a natural dye from Bixa orellana L. (Bixaceae) seeds as an alternative for cosmetic use.* Recuperado el 9 de abril de 2020 de  
<https://pdfs.semanticscholar.org/5eaf/8e21f3ba90927e2a58f161f1d242c3b19105.pdf>

Senoussi, A. (2010). *El efecto de utilizar el fungicida Vitavax en la flora microbiana de arcillas y raíces de cebada y algunas características vegetativas.* Recuperado el 20 de abril de 2020 de  
[https://www.researchgate.net/publication/255962793\\_THE\\_EFFECT\\_OF\\_USING\\_VITAVAX\\_FUNGICIDE\\_ON\\_MICROBIAL\\_FLORA\\_OF\\_PEAS\\_AND\\_BARLEY\\_ROOTS\\_AND\\_SOME\\_VEGETATIVE\\_CHARACTERISTICS](https://www.researchgate.net/publication/255962793_THE_EFFECT_OF_USING_VITAVAX_FUNGICIDE_ON_MICROBIAL_FLORA_OF_PEAS_AND_BARLEY_ROOTS_AND_SOME_VEGETATIVE_CHARACTERISTICS)

Shanley, P. (2004). *Report Part Title: Andiroba, medicinal oil.* Recuperado el 24 de junio de 2020 de  
[https://www.jstor.org/ezbiblio.usfq.edu.ec/stable/pdf/resrep02039.24.pdf?ab\\_segments=0%252Fbasic\\_SYC-5187%252Ftest&refreqid=excelsior%3Acb4a9970452117890dcde31ce8c634cb](https://www.jstor.org/ezbiblio.usfq.edu.ec/stable/pdf/resrep02039.24.pdf?ab_segments=0%252Fbasic_SYC-5187%252Ftest&refreqid=excelsior%3Acb4a9970452117890dcde31ce8c634cb)

Sharon M, D'Souza MC (2000) *In vitro clonal propagation of annatto (Bixa orellana L.).* Curr Sci 78:1532–1535

Shovan, L., Bhuiyan, M. & Pervez, Z. (2008). *In vitro control of Colletotrichum dematium causing anthracnose of soybean by fungicides, plant extracts and Trichoderma harziadnum.* Recuperado el 20 de septiembre de 2020 de

<https://www.semanticscholar.org/paper/IN-VITRO-CONTROL-OF-COLLETOTRICHUM-DEMATIUM-CAUSING-Shovan-Bhuiyan/8c55165e8e5991353314845b1c724f9466dc40e3>

Siril, E. & Joseph, N. (14 de noviembre de 2012). *Micropropagation of annatto (Bixa orellana L.) from mature tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants with RAPD markers*. Recuperado el 17 de junio de 2020 de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3550682/pdf/12298\\_2012\\_Article\\_150.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3550682/pdf/12298_2012_Article_150.pdf)

Soler, C. (2005). *El achiote: el colorante rojizo de América*. Recuperado el 11 de junio de 2020 de <https://www.vix.com/es/imj/gourmet/6665/el-achiote-el-colorante-rojizo-de-america>

Stringheta, P., et.al. (2018). *Aplicación industrial y potencial aplicación industrial*. Recuperado el 11 de junio de 2020 de <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/annatto>

Teixeira, J., Zeng, S., Godoy-Hernández, G., Rivera-Madrid, R. & Dobránszki, J. (1 de abril de 2019). *Bixa orellana L. (achiote) tissue culture: a review*. Recuperado el 17 de junio de 2020 de [https://www.researchgate.net/publication/332878328\\_Bixa\\_orellana\\_L\\_achiote\\_tissue\\_culture\\_a\\_review](https://www.researchgate.net/publication/332878328_Bixa_orellana_L_achiote_tissue_culture_a_review)

The Plant List (2019) *Bixa*. Recuperado el 11 de junio de 2020 de <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Bixa>. Accessed25Feb20

- Valášková, M. & Martynková, G. (2012). *Vermiculite: Structural Properties and Examples of the Use*. Recuperado el 17 de junio de 2020 de [https://www.researchgate.net/publication/230938283\\_Vermiculite\\_Structural\\_Properties\\_and\\_Examples\\_of\\_the\\_Use](https://www.researchgate.net/publication/230938283_Vermiculite_Structural_Properties_and_Examples_of_the_Use)
- Venugopalan, A. Giridhar, P & Ravishankar, A. (2011). *Food, ethnobotanical and diversified applications of Bixa orellana L.: A scope for its improvement through biotechnological mediation*. Recuperado el 15 de junio de 2020 de <https://pdfs.semanticscholar.org/546e/ac0608deb1d4dc542abe8ea160109fd53659.pdf>
- Vidal, D., Nayara, L., Monteiro, E., Costa, M., Silva, D., Cardoso, G., Borges, V., Aloisio, X., Rogalski, M. & Campos, W. (2019a). *Irradiance and light quality affect two annatto (Bixa orellana L.) cultivars with contrasting bixin production*. Recuperado el 15 de octubre de 2020 de [https://www.researchgate.net/profile/Diego\\_Batista3/publication/334234130\\_Irradiance\\_and\\_light\\_quality\\_affect\\_two\\_annatto\\_Bixa\\_orellana\\_L\\_cultivars\\_with\\_contrasting\\_bixin\\_production/links/5d1e8965299bf1547c98a05a/Irradiance-and-light-quality-affect-two-annatto-Bixa-orellana-L-cultivars-with-contrasting-bixin-production.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Diego_Batista3/publication/334234130_Irradiance_and_light_quality_affect_two_annatto_Bixa_orellana_L_cultivars_with_contrasting_bixin_production/links/5d1e8965299bf1547c98a05a/Irradiance-and-light-quality-affect-two-annatto-Bixa-orellana-L-cultivars-with-contrasting-bixin-production.pdf)
- Vidal, D., Nayara, L., Monteiro, E., Costa, M., Silva, D., Cardoso, G., Borges, V., Aloisio, X., Rogalski, M. & Campos, W. (2019b). *Wounding and medium formulation affect de novo shoot organogenic responses in hypocotyl-derived explants of annatto (Bixa orellana L.)*. The Society for *In Vitro* Biology 2019.

Zaldívar-Cruz JM, Ballina-Gómez H, Guerrero-Rodríguez C, Avilés Berzunza E, Godoy-Hernández GC (2003) *Agrobacterium-mediated transient transformation of annatto (Bixa orellana) hypocotyls with the GUS reporter gene*. Plant Cell Tissue Organ Cult 73:281– 284

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1: Recolección y almacenamiento del material vegetal

Lugar de recolección	Material vegetal	Ensayos de esterilización	Material protector	Sitio de almacenamiento
1	Semillas	1 (semillas)	Vidrio	Estante seco
2	Frutos	2 (semillas) 1, 2 (frutos)	Papel periódico	Estante seco
3	Frutos	3, 4, 5, 6, 7, 8 (frutos)	Papel periódico	Estante seco

### 9.2. Anexo 2: Diseño experimental para los ensayos de esterilización de semillas

Tratamiento			Diseño	
Etanol (70%)	Hipoclorito de sodio (2.5%)	Lavados con agua destilada estéril	# de semillas por frasco	Tipo de medio
5 minutos	20 minutos		10	MS + GA <sub>3</sub>
			10	AM

### 9.3. Anexo 3: Diseño experimental para los ensayos de esterilización de frutos

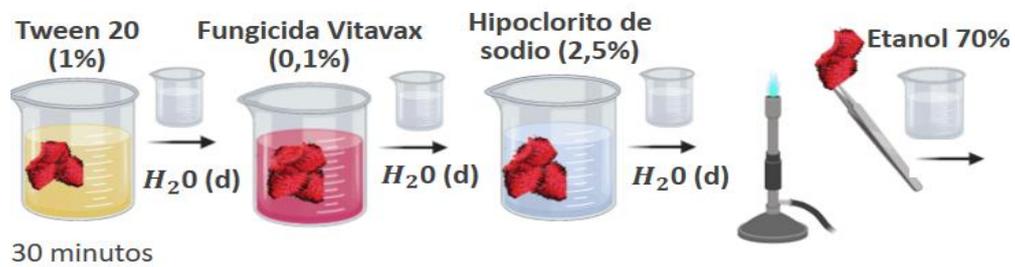
Tratamiento				Diseño	
Tween 20	Vitavax	Hipoclorito de sodio	Flameo con etanol	# de semillas por frasco	Tipo de medio
				10	MS + GA <sub>3</sub>
				10	AM
				10	MS + GA <sub>3</sub>
				10	AM
				10	MS + GA <sub>3</sub>
				10	AM

#### 9.4. Anexo 4: Diseño experimental adaptado de Joseph et al, 2011

### 1. Recolección



### 2. Desinfección



### 3. Siembra

