

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Uso de nanopartículas de plata y antibióticos como una
alternativa para la desinfección de semillas de *Vasconcellea
pubescens***

María Belén Ortiz Rosero

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 21 de diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Uso de nanopartículas de plata y antibióticos como una alternativa para la
desinfección de semillas de *Vasconcellea pubescens***

María Belén Ortiz Rosero

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.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: María Belén Ortiz Rosero

Código: 00124125

Cédula de identidad: 1722920202

Lugar y fecha: Quito, 21 de 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UNPUBLISHED DOCUMENT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

Vasconcellea pubescens, conocida como “chamburo” es una planta nativa de los Andes del Ecuador que pertenece a la familia Caricaceae junto con la papaya y el babaco. Es una especie poco estudiada con potenciales aplicaciones entre ellas están el mejoramiento genético de cultivos comerciales como la papaya o el babaco, el uso de nanopartículas de biocatálisis dentro de la industria farmacéutica por su alto contenido en papaína y también es parte de tradiciones gastronómicas ecuatorianas. El objetivo del estudio fue establecer un protocolo de desinfección de semillas de *V. pubescens* para su posterior introducción al cultivo *in vitro*. Hay estudios previos que reportan la desinfección de semillas de chamburo sin testa con tratamientos químicos y luz UV donde se consiguió porcentajes ineficientes de esterilidad. La metodología en el presente estudio consistió en remover la testa de las semillas con H₂O₂, luego se sometió a las semillas a un tratamiento con alcohol (70%) e hipoclorito de sodio (2.5%) más Tween 20 y posteriormente se probó el efecto de nanopartículas de plata de la marca “Argovit”. Las nanopartículas fueron usadas de dos formas: a) lavado de las semillas en soluciones con distintas concentraciones y por distintos tiempos; b) siembra de las semillas en el medio de cultivo suplementado con distintas concentraciones de nanopartículas. Los resultados obtenidos con el uso de nanopartículas no fueron eficientes ni para la esterilización de las semillas ni para su germinación en condiciones *in vitro*. Por este motivo, se buscó una alternativa para lograr semillas estériles empleando los antibióticos gentamicina y rifampicina obteniendo un 90% de esterilidad de las semillas que fueron lavadas con una solución de 300 mg/L de gentamicina y 70% de esterilidad de las semillas que fueron lavadas con una solución de 300 mg/L de rifampicina. La tasa de germinación de semillas sin embargo fue baja menor a 16.66% en todos los tratamientos. Se necesita realizar más experimentos para lograr introducir al chamburo a condiciones de propagación *in vitro*. La investigación con especies nativas poco

exploradas representa un reto pero a su vez es una necesidad para su conservación y uso sostenible.

Palabras clave: *Vasconcellea pubescens*, esterilidad, germinación, nanopartículas de plata, antibióticos

ABSTRACT

Vasconcellea pubescens, known as “chamburro”, is a native plant from the Andes in Ecuador that belongs to the Caricaceae family, along with papaya and babaco. It is a barely explored species that has many potential applications such as the genetic improvement of commercial crops like papaya and babaco, and the use of biocatalysis nanoparticles in the pharmaceutical industry given its high content of papain. Furthermore, it is used in Ecuadorian traditional recipes. The aim of the study is to establish a disinfection protocol of *V. pubescens* seeds to prepare them for *in vitro* culture. Previous studies report that the disinfection of chamburo seeds without testes with a chemical treatment combined with UV light was inefficient for obtaining sterile seeds. The methodology in the present study consisted in removing the seeds' testa with H₂O₂, then applying a treatment to the seeds with alcohol (70%) and sodium hypochlorite (2.5%) plus Tween 20 and later the efficacy of “Argovit” silver nanoparticles was tested. The silver nanoparticles were employed in two ways: a) immersion of the seeds in the nanoparticles solutions at various concentration and times of exposure, b) sowing of the seeds in the culture media supplemented with the nanoparticles at a range of concentrations. The results from these treatments were not efficient for seed sterilization nor germination of sterile seeds in *in vitro* conditions. For this reason, a disinfection alternative with the antibiotics gentamicin and rifampicin was developed for obtaining sterile seeds reporting a rate of 90% of sterile seeds after washing them with a solution containing 300 mg/L of gentamicin and 70% of sterile seeds after washing the seeds with a solution containing 300 mg/L of rifampicin. However, the germination capacity of the seeds was lower than 16.66% in all treatments. More experiments need to be conducted for introducing chamburo to the proper conditions for *in vitro* propagation. The research of understudied native species remains a challenge and, at the same time, there is a need for their conservation and sustainable use.

Key words: *Vasconcellea pubescens*, sterility, germination, silver nanoparticles, antibiotics

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	13
1.1	CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA CARICACEAE.....	13
1.1.1	Distribución y características de <i>Vasconcellea pubescens</i>	13
1.1.2	Importancia y aplicaciones de <i>Vasconcellea pubescens</i>	14
1.2	CULTIVO <i>IN VITRO</i> : ESTUDIOS EN <i>VASCONCELLEA SPP</i>	15
1.2.1	Mecanismos alternativos de desinfección para el cultivo <i>in vitro</i>	16
2	METODOLOGÍA.....	18
2.1	OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	18
2.2	REMOCIÓN DE TESTA DE LAS SEMILLAS	18
2.3	DESINFECCIÓN QUÍMICA DE LAS SEMILLAS SIN TESTA.....	18
2.4	MECANISMOS ALTERNATIVOS DE DESINFECCIÓN	19
2.4.1	Uso de nanopartículas de plata.	19
2.4.1.1	Protocolo A: Lavados en soluciones de AgNPs por distintos tiempos.....	20
2.4.1.2	Protocolo B: Siembra en el medio AM suplementado con AgNPs.	20
2.4.1.3	Protocolo C: Lavados en 50 mg/L de AgNPs por distintos tiempos.	20
2.4.1.4	Protocolo D: Lavados con AgNPs y siembra en el medio AM suplementado con AgNPs.	20
2.4.2	Uso de antibióticos.....	21
2.4.2.1	Protocolo E y F: Lavados en soluciones del antibiótico.....	21
2.4.2.2	Protocolo G y H: Siembra en el medio AM suplementado con antibiótico.....	22
2.5	REGISTRO DE DATOS	22
2.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	22

	10
2.6.1	Protocolos utilizando nanopartículas de plata “Argovit”.....22
2.6.2	Protocolos utilizando antibióticos.....22
3	RESULTADOS.....23
3.1	ENSAYOS REALIZADOS CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AGNPs) “ARGOVIT”23
3.1.1	Resultados de esterilidad y germinación de semillas.....23
3.1.1.1	Protocolo A: Lavados en soluciones de AgNPs por distintos tiempos.23
3.1.1.2	Protocolo B: Siembra en el medio AM suplementado con AgNPs.23
3.1.1.3	Protocolo C: Lavados en 50 mg/L de AgNPs por distintos tiempos.24
3.1.1.4	Protocolo D: Lavados con AgNPs y siembra en el medio AM suplementado con AgNPs.24
3.2	ENSAYOS REALIZADOS CON ANTIBIÓTICOS24
3.2.1	Resultados de esterilidad y germinación de semillas.....25
3.2.1.1	Protocolo E: Lavados en solución con gentamicina.25
3.2.1.2	Protocolo F: Lavados en solución con rifampicina.....25
3.2.1.3	Protocolo G: Siembra en el medio AM suplementado con gentamicina.25
3.2.1.4	Protocolo H: Siembra en el medio AM suplementado con rifampicina.25
4	DISCUSIÓN26
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES31
6	TABLAS32
7	FIGURAS35
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla # 1. Diseño experimental y resultados del protocolo A con AgNPs.....	32
Tabla # 2. Diseño experimental y resultados del protocolo B con AgNps.. ..	32
Tabla # 3. Diseño experimental y resultados del protocolo C con AgNPs.....	32
Tabla # 4. Diseño experimental y resultados del protocolo D con AgNPs.....	33
Tabla # 5. Diseño experimental y resultados de los protocolos E, F, G, H con antibióticos...	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura # 1. Semillas de chamburo	35
Figura # 2. Frascos de cultivo <i>in vitro</i> de semillas de chamburo germinadas y contaminadas...	35
Figura # 3. Frascos de cultivo <i>in vitro</i> de semillas de chamburo de tratamientos con AgNPs y antibióticos.....	36
Figura # 4. Resultados más eficientes de esterilidad al utilizar AgNPs... ..	36
Figura # 5. Resultados más eficientes de esterilidad al utilizar antibióticos	37

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Características de la familia Caricaceae

La familia Caricaceae comprende seis géneros cuya mayoría de especies son árboles o plantas herbáceas productoras de látex (Missouri Botanical Garden, 2020). Sus semillas se encuentran dentro de una fuerte testa y están rodeadas de mucílago que es una sustancia vegetal viscosa como goma la cual protege a las semillas de la desecación (Espinosa, 2016; Serván, 2018). Dentro de los seis géneros que comprende la familia se encuentran 22 especies. *Carica papaya* conocida comúnmente como papaya, es la planta más representativa de la familia por su consumo global como alimento (Carvalho, 2013).

Vasconcellea pubescens es una especie que localmente se ha consumido como alimento. Es conocida por su nombre común “chamburo” y pertenece a la familia *Caricaceae*. Hoy en día posee una limitada producción ya que su demanda ha sido sustituida por variedades comerciales de la misma familia como la papaya (*C. papaya*) o el babaco (*C. pentagona*). Además que por su tamaño pequeño y tener semillas grandes ofrece menos producto consumible (Proaño, 2007; Iturralde, 2000). No obstante, por ser una planta nativa del Ecuador resulta interesante impulsar su estudio científico.

1.1.1 Distribución y características de *Vasconcellea pubescens*.

Vasconcellea pubescens es una de las 21 especies que comprende el género *Vasconcellea spp.* que se encuentra en estado silvestre en quebradas o huertas caseras en las provincias de Cotopaxi, Pichincha, Loja, Tungurahua y El Oro (Galarza, 2002; Proaño, 2007). Esta variedad vegetal crece de forma aislada en zonas húmedas montanas entre 2300 y 2600 m.s.n.m. (Endara, 2018). El chamburo es una especie semileñosa, dicotiledónea que mide entre tres y cinco metros de altura (Jordan y Velozo, 1997) cuyo árbol posee hojas grandes entre 20

a 60 centímetros de diámetro, con cinco a siete nervaduras principales y un envés altamente pubescente; es decir, que contiene muchos pelos superficiales finos y suaves (Galarza, 2002). Posee frutos lobulados con forma de baya ovoide, de siete a diez centímetros de largo y de tres a seis centímetros de ancho. Además, por cada 100 gramos de fruto contiene entre 55 y 138 semillas (Vidal et al., 2009).

1.1.2 Importancia y aplicaciones de *Vasconcellea pubescens*.

La importancia principal de investigar *Vasconcellea pubescens* es su propagación para que la especie no se pierda por su decreciente demanda, ya que forma parte de la biodiversidad del Ecuador y posee potenciales aplicaciones (Proaño, 2007; Iturralde, 2000) por ser un recurso biológico y genético valioso que podría usarse en procesos en la industria química, farmacéutica y alimenticia (Endara, 2018; Proaño, 2007). La papaína contenida en varios de sus órganos tiene actividad proteolítica que es aprovechada para la producción de nanopartículas para biocatálisis que es un proceso mediante el cual se pueden obtener compuestos químicos (Ramírez, 2019; Arroyo et al., 2014). Además, la papaína posee propiedades antibacteriales que pueden usarse en la desinfección de heridas, así como posee actividad enzimática que puede aplicarse en tejido muerto para su eliminación (Ramírez, 2019; Soares et al., 2015).

En cuanto a la genética el chamburo posee genes que podrían transferirse a otros cultivares para que se adapten y desarrollen en regiones subtropicales. Estudios en investigaciones llevadas a cabo en la Universidad Central del Ecuador y en la Universidad de Griffith en Australia han demostrado que el chamburo podría ser usado para crear híbridos con *C. papaya* resistentes al virus PRSV-P para mitigar los efectos adversos en la producción que el virus puede ocasionar (Galarza, 2002; O'Brien & Drew, 2009).

Como alimento esta fruta es parte de una tradición gastronómica quiteña ancestral conocida con el nombre de “Rosero”. Esta bebida es una receta hecha en base a mote y almíbar de chamburo, cuya oferta y demanda hoy en día han disminuido (Alvarado, 2015).

El cultivo *in vitro* es una estrategia para obtener estas plantas de una manera rápida y evitar problemas fitopatológicos que se han reportado en varias ocasiones en estudios del género *Vasconcellea spp.* ya que se realiza bajo condiciones controladas que contribuyen al desarrollo de la planta (Espinosa, 2016).

1.2 Cultivo *in vitro*: Estudios en *Vasconcellea spp.*

El cultivo *in vitro* es una técnica de micropropagación de especies en laboratorio fundamentada en la totipotencialidad celular que se realiza bajo condiciones ambientales controladas, condiciones de asepsia, uso de reguladores de crecimiento, factores que ayudan a una propagación más rápida de la especie (Fay, 1993; Ubidia, 2019). Además, dicha técnica solventa en varios casos problemas de germinación al disminuir la dormancia seminal que es un estado de letargo generado como mecanismo de supervivencia ante condiciones ambientales desfavorables (Liñán et al., 2001).

Existen limitados estudios de cultivo *in vitro* realizados al género *Vasconcellea*. En Ecuador se han realizado dos investigaciones que reportan problemas de contaminación en babaco (*V. heilbornii*). El uno ejecutado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias reportó problemas de contaminación por hongos, bacterias y levaduras afectando el desarrollo del explante (Rivas, 2016). El otro estudio ejecutado por la Universidad de las Fuerzas Armadas del Ecuador en brotes de babaco presentó contaminación bacteriana endógena al encontrarse el explante en el medio de cultivo (Vaca, 2008). Se debe recordar que un requisito indispensable previo al cultivo *in vitro* es la obtención de material vegetal estéril (libre de microorganismos) para propagar a la planta, ya que la contaminación interfiere con el

crecimiento del material vegetal al no poder asimilar los nutrientes necesarios para el desarrollo (Pierik, 1997).

A pesar de que se han reportado pocos estudios de cultivo *in vitro* del chamburo la introducción de la especie a condiciones estériles no ha sido fácil. Una investigación realizada por la Universidad de la Plata en el año 2016 reportó contaminación persistente tras la desinfección química estándar al hacer cultivo *in vitro* con las semillas de *V. pubescens* sin sarcotesta (Espinosa, 2016). Otro estudio en la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) llevado a cabo por Donoso (2019) reportó la presencia de contaminación alrededor de las semillas a las que se aplicó un protocolo de desinfección química que empleó alcohol (70%) e hipoclorito de sodio (2.5%) junto a un protocolo alternativo con luz UV, obteniendo un porcentaje de esterilidad del 49%.

1.2.1 Mecanismos alternativos de desinfección para el cultivo *in vitro*.

Se han empleado compuestos alternativos en especies en las que la contaminación es un problema persistente que no es solventado con el protocolo de desinfección química estándar, estos compuestos al combinarlos con la desinfección química muestran resultados de esterilidad eficientes. Los agentes antimicrobianos usado como compuestos alternativos son nanomateriales, que se han antibióticos, cloruro de mercurio, pesticidas, dióxido de cloro y manganato de potasio. (Spinoso-Castillo et al., 2017; Silva et al., 2015; Chérrez & Jadán, 2015).

El estudio del uso de nanopartículas de plata (AgNPs) resultó eficiente para especies en las que eliminar la contaminación ha representado un reto. Las nanopartículas de plata son estructuras esféricas compuestas de plata con un recubrimiento de distintos materiales (Casillas, 2020). Presentan ventajas de aplicación como mantener su estructura y función en elevadas temperaturas y no presentar citotoxicidad en concentraciones de hasta 100 mg/L

(Cardoso, 2016). Entre los mecanismos de acción microbicidas de las nanopartículas de plata se reportan: alteraciones en las proteínas microbianas, inhibición de la fuerza motriz de los protones, impedimento del transporte de electrones de la cadena respiratoria y también la producción de especies reactivas de oxígeno causa estrés oxidativo en las células afectando los constituyentes celulares e induciendo la muerte celular (Cardoso, 2016; Spinoso- castillo et al., 2017). Las nanopartículas utilizadas en este trabajo de titulación fueron de marca “Argovit”, poseen un tamaño de diámetro promedio de 35 nanómetros y están compuestas por plata metálica (1.2%), nanopartículas (20%) y un recubrimiento de polivinilpirrolidona (PVP) (18.8%) (Casillas, 2020).

Otro de los mecanismos utilizados para la desinfección del material vegetal son los antibióticos, que son sustancias antimicrobianas empleadas para eliminar bacterias. Los más usados en estudios de la familia Caricaceae son los de amplio espectro como la gentamicina, rifampicina y estreptomycinina (Mondal et al., 1990;Reuveni et al., 1990;Jadán et al., 2016). Como mecanismo bactericida la gentamicina y la estreptomycinina inhiben la síntesis proteica mientras que la rifampicina inhibe la transcripción (Campos et al., 2013;Godel et al., 2007).

Hasta el momento no ha sido posible estandarizar un protocolo eficiente de desinfección, lo que motivó a que el objetivo principal de este proyecto fue desarrollar un protocolo de esterilización de semillas de *V. pubescens* empleando mecanismos alternativos como son las nanopartículas de plata y los antibióticos.

2 METODOLOGÍA

Los ensayos de desinfección realizados en este trabajo se dividen en dos categorías: a) ensayos de desinfección utilizando nanopartículas de plata de marca Argovit; b) ensayos usando los antibióticos rifampicina y gentamicina.

2.1 Obtención del material vegetal

Las semillas de chamburo empleadas se obtuvieron de frutos maduros recolectados de árboles ubicados en Papallacta en marzo de 2019, en Ibarra en diciembre de 2019, en Nono en octubre de 2020 y en Yaruquí en septiembre de 2020. Estos frutos se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, donde se extrajeron las semillas de los frutos con una cuchara y un tamiz. Las semillas fueron lavadas con abundante agua potable para retirar por completo el mucílago; se las dejó secar a temperatura ambiente y finalmente, se las almacenó en frascos de vidrio en un lugar fresco y seco.

2.2 Remoción de testa de las semillas

En todos los ensayos se removió la testa de las semillas el día del experimento; para esto, se las sumergió en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 50% por un tiempo de 20 minutos (Donoso, 2019) y luego se removió de manera manual la testa con la ayuda de pinzas y un bisturí estériles. En la Figura 1 se muestra la diferencia entre una semilla sin testa y una semilla con testa.

2.3 Desinfección química de las semillas sin testa

Se llevó a cabo una desinfección química estándar ampliamente usada para esterilizar material vegetal, la cual consiste en colocar dentro de una cámara de flujo laminar las semillas

sin testa y sumergirlas en 200 ml de alcohol al 70% durante cinco minutos, lavarlas con agua destilada estéril cuatro veces y posteriormente sumergirlas en 200 ml de Hipoclorito de sodio 2.5% más cinco gotas de Tween 20 por 20 minutos (Donoso, 2019). Todas las semillas se sometieron a estos primeros tres pasos antes de la aplicación del mecanismo alternativo de desinfección.

2.4 Mecanismos alternativos de desinfección

Se desarrollaron los protocolos de desinfección con nanopartículas de plata de marca “Argovit” y antibióticos en base a literatura en estudios similares posterior al protocolo de desinfección química estándar que incluyó la remoción de la testa (Donoso, 2019; Bello-Bello, 2016; Mondal et al., 1990).

2.4.1 Uso de nanopartículas de plata.

Se efectuaron cuatro protocolos con distintos tratamientos empleando nanopartículas de plata de la marca “Argovit” obtenidas gracias a un convenio con el Centro de Nanociencias y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. En cada protocolo se incluyó un grupo control en el cual no se sometían las semillas al tratamiento. Los tratamientos utilizados se dividieron en dos estrategias: 1) Lavados de las semillas en solución de nanopartículas; 2) Siembra de las semillas en el medio de cultivo suplementado con nanopartículas. Después de realizar los tratamientos y la posterior siembra de las semillas en el medio AM (medio MS al 50% en concentración de sales) se incubaron los frascos en el Cuarto de Cultivo *in vitro* del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con 16 horas de fotoperiodo en donde se tomaron datos por un tiempo de 30 días.

2.4.1.1 Protocolo A: Lavados en soluciones de AgNPs por distintos tiempos.

Se realizaron nueve tratamientos con semillas provenientes de Papallacta con un tiempo de almacenamiento de entre 5 y 8 meses. Se sumergieron las semillas sin testa en soluciones de 200 ml con concentraciones de 25, 50 y 100 mg/L de nanopartículas de plata (AgNPs) por tiempos de 5, 10 y 20 minutos (Bello-Bello, 2016). Se enjuagaron las semillas cuatro veces con agua destilada estéril y se sembraron 30 semillas en seis frascos con medio basal AM sólido. Las soluciones de AgNPs fueron realizadas en agua destilada estéril.

2.4.1.2 Protocolo B: Siembra en el medio AM suplementado con AgNPs.

Para este protocolo se emplearon semillas de Papallacta con un tiempo de almacenamiento entre 5 y 8 meses. Se sembraron 90 semillas sin testa en 18 frascos con medio basal AM sólido suplementado con concentraciones de 50, 60 y 80 mg/L de AgNPs (Bello-Bello, 2016).

2.4.1.3 Protocolo C: Lavados en 50 mg/L de AgNPs por distintos tiempos.

Se sumergieron las semillas sin testa provinientes de Papallacta con un tiempo de almacenamiento entre 5 y 8 meses, en cuatro soluciones de 200 mL con una concentración de 50 mg/L de AgNPs por 5, 10, 15 y 20 minutos con agitación constante. (Bello, 2016). Después se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril y se sembraron 96 semillas en total en 16 frascos con medio basal AM sólido. Las soluciones de AgNPs fueron realizadas en agua destilada estéril.

2.4.1.4 Protocolo D: Lavados con AgNPs y siembra en el medio AM suplementado con AgNPs.

Se emplearon semillas de frutos colectados en Ibarra con un tiempo de almacenamiento de aproximadamente 2 meses. Para este protocolo se fusionaron los protocolos A y B, se sumergieron las semillas en una solución de 200 ml con una concentración de 50 mg/L de

AgNPs durante 20 minutos con agitación constante, posteriormente se hicieron cuatro lavados de las semillas en agua destilada estéril, y se las sembró en medio basal AM sólido suplementado con una concentración de 50 mg/L de AgNPs.

2.4.2 Uso de antibióticos.

Posterior a la desinfección química estándar se efectuaron cuatro protocolos con varios tratamientos mediante estrategias similares a las ya descritas empleando por separado los antibióticos rifampicina y gentamicina. En cada protocolo se contó con un grupo control en el que no se sometían las semillas al tratamiento evaluado. Se emplearon diez semillas en cada tratamiento y en los grupos control. Después de realizar los tratamientos y la posterior siembra de las semillas en el medio AM se incubaron los frascos en el Cuarto de Cultivo *in vitro* del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con 16 horas de fotoperiodo en donde se tomaron datos por un tiempo de 30 días.

2.4.2.1 Protocolo E y F: Lavados en soluciones del antibiótico.

Para estos protocolos se emplearon semillas de Yaruquí con un tiempo de almacenamiento de aproximadamente 15 días. Se sumergieron las semillas sin testa en cinco soluciones de 100 ml con concentraciones de 50, 100, 200, 300, y 500 mg/L del antibiótico (se usó rifampicina y gentamicina por separado) por un tiempo de 48 horas con agitación constante (Mondal et al., 1990; Reuveni et al., 1990). Posteriormente, se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril y se las sembró en medio de cultivo basal AM sólido.

Las soluciones de gentamicina se prepararon en agua destilada estéril a partir de una solución stock de 80 000 mg/L, mientras que las de rifampicina se realizaron a partir de una solución stock de 100 000 mg/L. Todas las soluciones de los ensayos con rifampicina se envolvieron en papel aluminio debido a que el antibiótico es fotosensible (Godel y Marchou, 2007).

2.4.2.2 Protocolo G y H: Siembra en el medio AM suplementado con antibiótico.

Se empleó un pool de semillas provenientes de Yaruquí y de Nono con un tiempo de almacenamiento de aproximadamente 15 días. Se sembraron las semillas sin testa en medio basal AM sólido suplementado con concentraciones de 25, 50, 75, 100, y 150 mg/L del antibiótico (a los antibióticos se los empleó por separado) (Mondal et al., 1990; Reuveni et al., 1990). Los frascos en los que se empleó rifampicina en el medio se almacenaron por 48 horas en la oscuridad debido a la fotosensibilidad del antibiótico y transcurrido este tiempo se trasladaron al cuarto de cultivo, mientras que los de gentamicina se pasaron directamente al cuarto de cultivo.

2.5 Registro de datos

La toma de datos de todos los protocolos se realizó registrando el número de semillas estériles y el número de semillas germinadas estériles pasando un día por un periodo de 30 días empleando una distribución binomial.

2.6 Análisis estadísticos

2.6.1 Protocolos utilizando nanopartículas de plata “Argovit”.

Se realizaron dos tipos de pruebas estadísticas para esterilidad de semillas dependiendo del número de muestra en el software Minitab. No se efectuaron pruebas estadísticas de las semillas estériles germinadas, ya que se obtuvo un número bajo no significativo de semillas estériles en cada tratamiento.

2.6.2 Protocolos utilizando antibióticos.

No se efectuaron pruebas estadísticas ya que los experimentos realizados fueron ensayos piloto con un tamaño de muestra de diez semillas por cada tratamiento.

3 RESULTADOS

3.1 Ensayos realizados con nanopartículas de plata (AgNPs) “Argovit”

Con respecto a estos ensayos ningún tratamiento resultó ser eficiente para la obtención de semillas estériles. El accionar de las nanopartículas dio como resultados rangos de esterilidad entre el 0.00% y el 16.66%. En la Figura 2 se muestra la contaminación alrededor de una semilla y los inicios de germinación. A pesar de que los resultados no fueron los esperados, a continuación se reportan los principales hallazgos de esterilidad y germinación alcanzados con cada tratamiento.

3.1.1 Resultados de esterilidad y germinación de semillas.

3.1.1.1 Protocolo A: Lavados en soluciones de AgNPs por distintos tiempos.

Con el tratamiento en el que se empleó una solución de 50 mg/L de AgNPs por cinco minutos para lavar a las semillas, se obtuvo la mayor tasa de esterilidad que corresponde al 16.66% (5/30 semillas) de las cuales el 100.00% germinó. Sin embargo, en el grupo control se observó un 23.33% de semillas estériles (7/30 semillas) con un 71.43% de germinación (5/7 semillas) como se observa en la Tabla 1. En la prueba estadística ANOVA, se obtuvo un valor p no significativo ($p > 0.05$) para esterilidad de las semillas, lo que indica que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos incluyendo los grupos control.

3.1.1.2 Protocolo B: Siembra en el medio AM suplementado con AgNPs.

En este protocolo se obtuvo un 16.66% de esterilidad (5/30 semillas) con un 40.00% de germinación de semillas estériles (2/5 semillas) en el tratamiento que presentó los mejores resultados (Tabla 2), el cual consistió en suplementar al medio con una concentración de 50 mg/L. Por otra parte, en el grupo control se obtuvo únicamente 8.00% de semillas estériles (2/30 semillas) de las cuales solo una germinó y al evaluar esterilidad entre cada tratamiento y

el grupo control mediante una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

3.1.1.3 Protocolo C: Lavados en 50 mg/L de AgNPs por distintos tiempos.

En este protocolo se observó que al lavar las semillas en la solución por un tiempo de 15 minutos se obtuvo el mejor resultado que corresponde al 11.11% de semillas estériles (2/18 semillas) de las cuales solo una germinó (Tabla 3). En el grupo control se presentó un 15.00% de esterilidad (3/20 semillas) con un 66.66% de germinación de semillas (2/3 semillas). En estos tratamientos se realizó una prueba estadística Kruskal Wallis y no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para esterilidad de semillas ($p > 0.05$) entre cada tratamiento y el grupo control.

3.1.1.4 Protocolo D: Lavados con AgNPs y siembra en el medio AM suplementado con AgNPs.

El único tratamiento que se realizó con este protocolo reportó 6.66% de semillas estériles (2/30 semillas) de las cuales una germinó, mientras que en el grupo control se reportó 0.00% de semillas estériles (Tabla 4). En el tratamiento se empleó la prueba estadística Kruskal Wallis y se obtuvo un resultado estadísticamente no significativo ($p > 0.05$) entre el tratamiento y el grupo control.

3.2 Ensayos realizados con antibióticos

Con respecto a estos ensayos se observaron eficientes porcentajes de esterilidad en algunos tratamientos, sin embargo en otros se evidenciaron altos porcentajes de contaminación, en general se mostraron bajas tasas de germinación. A continuación se presentan los principales resultados de esterilidad y germinación obtenidos en cada tratamiento.

3.2.1 Resultados de esterilidad y germinación de semillas.

3.2.1.1 Protocolo E: Lavados en solución con gentamicina.

En este protocolo se vió que al lavar las semillas en una solución de 100 mg/L o de 300 mg/L de gentamicina se obtuvo un 90.00% de semillas estériles (9/10 semillas) siendo el tratamiento más eficiente del protocolo como se muestra en la Tabla 5. En el grupo control se reportó un porcentaje de semillas estériles del 40.00% (4/10 semillas). Sin embargo, la tasa de germinación de todas las semillas del protocolo fue del 0.00% (Tabla 5).

3.2.1.2 Protocolo F: Lavados en solución con rifampicina.

En este protocolo se observó que al lavar a las semillas en una concentración de 100 mg/L o de 300 mg/L de rifampicina se obtuvo el porcentaje más alto de semillas estériles que corresponde al 70.00% (7/10 semillas), de las cuales se obtuvo una germinación del 14.29% (1/7 semillas) en ambos tratamientos. No obstante, al emplear la concentración de 200 mg/L se obtuvo un porcentaje de esterilidad similar pero una germinación nula. Por otra parte, en el grupo control se reportó un 60.00% de semillas estériles (6/10 semillas) de las cuáles 16.66% (1/6 semillas) germinaron (Tabla 5).

3.2.1.3 Protocolo G: Siembra en el medio AM suplementado con gentamicina.

No se obtuvieron semillas estériles en los tratamientos ni en el grupo control por lo que no se obtuvo resultados de germinación.

3.2.1.4 Protocolo H: Siembra en el medio AM suplementado con rifampicina.

Se reportó la mayor tasa de semillas estériles que corresponde a 40.00% (4/10 semillas) con un 25.00% de germinación (1/4 semillas) al emplear una solución de 100 mg/L de rifampicina para suplementar al medio de cultivo AM como se muestra en la Tabla 5. En el grupo control no se obtuvieron semillas estériles.

4 DISCUSIÓN

La estandarización de un protocolo de desinfección de semillas de chamburo es de suma importancia para solventar el problema de contaminación y cumplir con los objetivos del cultivo *in vitro*, ya que la técnica se caracteriza por propagar plantas en condiciones controladas libres de microorganismos (Pierik, 1997). Sin embargo, cuando los protocolos de desinfección comunes que emplean alcohol e hipoclorito de sodio no son eficientes, se recurre a complementar el protocolo de desinfección con otras alternativas como el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) y antibióticos (Cardoso, 2016).

Las nanopartículas de plata han sido eficientes en la desinfección de material vegetal en otras especies como *Vanilla planifolia* y *Rubus glaucus* (Bello-Bello, 2016; Landázuri, 2018), motivo por el cual se realizaron tratamientos con este compuesto alcanzando 16.66% de semillas de chamburo estériles (5/30 semillas). Sin embargo, de lo que se conoce y se ha investigado esta fue la primera vez que se utilizaron a las nanopartículas en solución o en el medio de cultivo dentro de la familia Caricaceae. En los reportes de Bello-Bello (2016) se indicó el uso de nanopartículas en concentraciones de hasta 200 mg/L evidenciándose esterilidad en los brotes de vainilla de 100.00%, por esto se efectuaron tratamientos en el chamburo usando una concentración máxima de 100 mg/L en solución. No obstante, los resultados no fueron los esperados e incluso se observó un desarrollo anormal de la planta de chamburo bajo esa concentración, efecto también reportado al emplear 100 y 200 mg/L de nanopartículas en el estudio de la vainilla (Bello-Bello, 2016).

Los efectos fitotóxicos que las nanopartículas generan en concentraciones mayores a 100 mg/L se deben a una alta producción de especies reactivas de oxígeno que ejercen un efecto citotóxico en las células vegetales, el cual no puede ser contrarrestado con la respuesta antioxidante (Casillas, 2020). En dos de los tres tratamientos en los que se empleó una concentración de 100 mg/L para lavar las semillas de chamburo se evidenció una germinación

menor que al emplear otras concentraciones de nanopartículas, lo cual podría deberse al estrés oxidativo.

Las concentraciones de nanopartículas con las que se suplementó al medio de cultivo se determinaron en base al estudio realizado por Landázuri (2018) con la especie *R. glaucus*, en donde se observó inhibición del crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo sin afectar al desarrollo de la planta al aplicar concentraciones de 50, 75 y 100 mg/L. Con sustento en las dos primeras concentraciones reportadas se sembraron a las semillas en el medio de cultivo con 50, 60 y 80 mg/L de nanopartículas, y aunque no se logró esterilidad en estos tratamientos se observó que no se afectó la germinación de las semillas de chamburo (Figura 3).

Los resultados de esterilidad en los tratamientos con nanopartículas no fueron eficientes, motivo por el cual se establecieron ensayos con los antibióticos rifampicina y gentamicina en concentraciones similares a las que ya han sido reportadas exitosas en especies de la familia Caricaceae (Mondal et al. 1990; Reuveni et al., 1990). En un estudio realizado por Mondal et al. (1990) en *C. papaya* se probaron soluciones con concentraciones de 250, 500 y 750 mg/L de gentamicina reportando un porcentaje de esterilidad de 70.00%. En otro estudio se reportaron dos tratamientos eficientes para obtener esterilidad de brotes de *C. papaya*, en el primero se usó una solución de 300 mg/L de rifampicina por 24 horas y en el segundo se usó el medio de cultivo suplementado con una concentración de 50 mg/L del antibiótico reportando respectivamente 80.00% y 100.00% de esterilidad sin afectar al crecimiento del brote (Reuveni et al., 1990). Las concentraciones que se establecieron para lavar a las semillas de chamburo fueron cinco distintas siendo la menor de 50 mg/L y la mayor de 500 mg/L observando porcentajes altos de esterilidad entre 60.00% y 90.00%, porcentajes similares a los reportados en los estudios de *C. papaya*.

La ineficiencia de las nanopartículas para obtener esterilidad podría ser dada por el tamaño, el material y concentración del recubrimiento, y la concentración que estas tienen en plata metálica. Las nanopartículas de marca “Argovit” poseen 35 nanómetros de diámetro y un recubrimiento de PVP. Se ha demostrado diferentes efectos citotóxicos y antimicrobianos en nanopartículas con distinto tamaño, porcentaje de PVP en el recubrimiento, o con distinto material de recubrimiento (Panáček et al., 2017; Pazos-Ortiz et al., 2017; Casillas, 2020).

Los tratamientos con tasas de esterilidad más eficientes (Figura 4) consistieron en utilizar nanopartículas en una solución de 50 mg/L por cinco y diez minutos presentando respectivamente 100.00% y 80.00% de germinación de semillas estériles. Estas tasas de germinación podrían relacionarse con el hecho de que estos ensayos se realizaron con semillas almacenadas por un tiempo de entre cinco y ocho meses. Se reporta en un estudio de *Vasconcellea cundinamarcensis* que la germinación incrementa si las semillas tienen un tiempo de secado de entre cuatro y 12 meses (Scheldeman, 2002), no se describe completamente el mecanismo por el cual se da este efecto beneficioso en la tasa de germinación de la especie, pero se conoce que el exceso de humedad en la semilla se relaciona con bajas tasas de germinación (Scheldeman, 2002). Además, aunque se desconoce el tiempo exacto de almacenamiento de las semillas en ensayos previos realizados por Donoso (2019), en los ensayos con nanopartículas se obtuvo mayores porcentajes de germinación que los obtenidos por Donoso (2019), en los cuales incluso con el uso de hormonas se alcanzó 18.00%.

Los ensayos efectuados con antibióticos reportaron tasas de esterilidad eficientes, con un mayor porcentaje de semillas estériles al usar soluciones con distintas concentraciones de antibióticos que al usar el medio de cultivo suplementado con antibióticos. Los dos tratamientos en los que se mostraron mejores resultados corresponden a una concentración de 100 mg/L y 300 mg/L de gentamicina (Figura 5), aunque no se observó germinación de ninguna semilla (Figura 3). En la concentración de 200 mg/L que es el tratamiento intermedio entre los

dos más eficientes se observó un porcentaje similar de semillas desinfectadas. Por otra parte, los tratamientos en los que se emplearon los antibióticos en el medio de cultivo mostraron un porcentaje de semillas estériles menor a 40.00%. A pesar de que nuestros resultados no son concluyentes, hasta el momento los porcentajes de esterilidad de semillas son prometedores por lo tanto sería interesante ajustar el uso de los antibióticos realizando más experimentos.

Los porcentajes de germinación obtenidos en los ensayos con antibióticos fueron menores que los reportados en los ensayos con nanopartículas. En los tratamientos que usaron gentamicina para el lavado de semillas no existió germinación de semillas estériles (Figura 3), esto concuerda con un estudio de cultivo *in vitro* de semillas de la especie *Adansonia digitata*, en el cual se reportó una disminución significativa del 30.00% en la germinación de las semillas al emplear un aminoglucósido análogo a la gentamicina en concentraciones de 300 mg/L (Singh y Parasharami, 2019). Considerando estos problemas se debe saber que obtener esterilidad sin germinación no sirve para establecer un protocolo de desinfección eficiente y realizar propagación *in vitro* de una especie.

A pesar de que en estudios de cultivo *in vitro* con antibióticos en especies de la familia Caricaceae no se ha reportado un crecimiento deficiente de la planta (Reuveni et al., 1990), existe la posibilidad de que estos causen fitotoxicidad que podría evidenciarse con bajas tasas de germinación como las obtenidas. Se ha observado en un estudio realizado por Padilla y Burgos (2010) que los antibióticos del grupo aminoglucósidos como la gentamicina afectan los ribosomas mitocondriales y cloroplásticos de células vegetales al suprimir el final de la traducción y generar un cambio en el marco de lectura de las proteínas. Además, al emplear altas concentraciones de gentamicina se puede inhibir la síntesis de proteínas eucariotas ya que el antibiótico se une de manera no específica a los ribosomas (Padilla y Burgos, 2010).

Los problemas persistentes de dormancia característicos del género *Vasconcellea* se deben tomar en cuenta cuando se obtienen bajas tasas de germinación, por este motivo es común en

investigaciones de cultivo *in vitro* del género usar hormonas como ácido giberélico (GA3) (Vélez-Mora et al., 2015). No obstante, en el estudio previo llevado a cabo por Donoso (2019) se empleó GA3 en tres distintas concentraciones siendo la más alta de 1.48 mg/L sin presentar un efecto significativo en la germinación de semillas. Además, Donoso (2019) reportó que para romper la dormancia solo era necesaria la remoción de la testa empleando H₂O₂, sin embargo, en sus ensayos se obtuvo solo un 18.00% de germinación. El peróxido de hidrógeno posee un efecto oxidante fuerte que destruye inhibidores presentes en las capas externas de las semillas como compuestos fenólicos de la testa, o enzimas inhibidoras que se encuentran en el mucílago (Vélez-Mora et al., 2015).

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El establecimiento de un protocolo de desinfección del material vegetal de especies nativas representa un reto cuando el protocolo de desinfección tradicional no resulta eficiente, por lo tanto es de suma importancia recurrir a otros compuestos alternativos como las nanopartículas de plata y los antibióticos para cumplir con el requisito de esterilidad necesario en el cultivo *in vitro*.

En este proyecto el uso de nanopartículas de plata de la marca “Argovit” para la obtención de semillas estériles no presentó resultados eficientes, siendo el mejor tratamiento el lavado de las semillas en una solución de 50 mg/L por un tiempo de cinco minutos en el que se observó una tasa de esterilidad del 16.66%.

Hasta el momento se han observado resultados alentadores al emplear rifampicina y gentamicina siendo el mejor tratamiento el lavado de las semillas en una solución de 300 mg/L de gentamicina en el que se reportó una tasa de esterilidad del 90.00%. No obstante, estos resultados no son concluyentes porque el número de semillas evaluadas en cada tratamiento y en los grupos control fue de solo diez semillas.

Para superar el problema de la contaminación persistente alrededor de las semillas se sugiere emplear nanopartículas de plata provenientes de casas comerciales certificadas, con el fin de comparar con los resultados obtenidos en este trabajo. Además, se recomienda considerar el uso del antibiótico estreptomycinina ya que ha reportado resultados exitosos en plantas de la familia Caricaceae. Finalmente, es necesario aumentar el número de semillas por tratamiento para obtener resultados concluyentes; y sería interesante caracterizar la contaminación para estudiar una posible relación que esta pueda tener con la germinación.

6 TABLAS

Tabla # 1. Diseño experimental y resultados del protocolo A con AgNPs. Diseño experimental de la aplicación de nanopartículas de plata “Argovit” en el lavado de semillas sin agitación constante. Resultados de porcentajes de semillas estériles que germinaron al cabo de 30 días.

Concentración de AgNPs (mg/L) en solución	Tiempo (min)	Número total de semillas	% semillas estériles	% de semillas germinadas
Grupo control	--	30	23.33	71.43
25	5	30	3.33	0.00
	10	30	10.00	100.00
	20	30	6.66	100.00
50	5	30	16.66	100.00
	10	30	16.66	80.00
	20	30	6.66	0.00
100	5	30	6.66	50.00
	10	30	6.66	100.00
	20	30	13.33	0.00

Tabla # 2. Diseño experimental y resultados del protocolo B con AgNPs. Diseño experimental de la aplicación de nanopartículas de plata “Argovit” en el medio AM. Resultados de porcentajes de semillas estériles que germinaron al cabo de 30 días.

Concentración AgNPs (mg/L) en medio AM	Número total de semillas	% semillas estériles	% de semillas germinadas
Grupo control	25	8.00	50.00
50	30	16.66	40.00
60	30	0.00	0.00
80	30	0.00	0.00

Tabla # 3. Diseño experimental y resultados del protocolo C con AgNPs. Diseño experimental de la aplicación de nanopartículas de plata “Argovit” en el lavado de semillas con agitación constante. Resultados de porcentajes de semillas estériles que germinaron al cabo de 30 días.

Concentración de AgNPs (mg/L) en solución	Tiempo (min)	Número total de semillas	% semillas estériles	% de semillas germinadas
Grupo control	--	20	15.00	66.66
50	5	30	0.00	0.00
	10	30	0.00	0.00
	15	18	11.11	50.00
	20	18	5.55	0.00

Tabla # 4. Diseño experimental y resultados del protocolo D con AgNPs. Diseño experimental de la aplicación de nanopartículas de plata “Argovit” en el lavado de semillas y en el medio de cultivo AM. Resultados de porcentajes de semillas estériles que germinaron al cabo de 30 días.

Concentración AgNPs (mg/L) en medio AM y en solución	Tiempo (min) de semillas en solución	Número total de semillas	% semillas estériles	% de semillas germinadas
Grupo control	--	10	0.00	0.00
50	20	30	6.66	50.00

Tabla # 5. Diseño experimental y resultados de protocolos E, F, G, H con antibióticos. Diseño experimental de la aplicación de rifampicina y gentamicina en el lavado de semillas y en el medio de cultivo. Resultados de porcentajes de semillas estériles que germinaron al cabo de 30 días.

Protocolo	Antibiótico y modo de empleo	Concentración antibiótico (mg/L)	Número de semillas	% de semillas estériles	% de semillas germinadas
E	Grupo control	0	10	40.00	0.00
	Gentamicina en solución para lavados	50	10	70.00	0.00
		100	10	90.00	0.00
		200	10	70.00	0.00
		300	10	90.00	0.00
		500	10	40.00	0.00
F	Grupo control	0	10	60.00	16.66
	Rifampicina en solución para lavados	50	10	70.00	0.00
		100	10	70.00	14.29
		200	10	60.00	0.00
		300	10	70.00	14.29
		500	10	80.00	0.00
G	Grupo control	0	10	0.00	0.00
	Gentamicina en medio de cultivo AM	25	10	0.00	0.00
		50	10	0.00	0.00
		75	10	0.00	0.00
		100	10	0.00	0.00
		150	10	0.00	0.00
H	Grupo control	0	10	0.00	0.00
	Rifampicina en medio de cultivo AM	25	10	10.00	100.00
		50	10	20.00	100.00
		75	10	10.00	100.00
		100	10	40.00	25.00
		150	10	20.00	0.00

7 FIGURAS

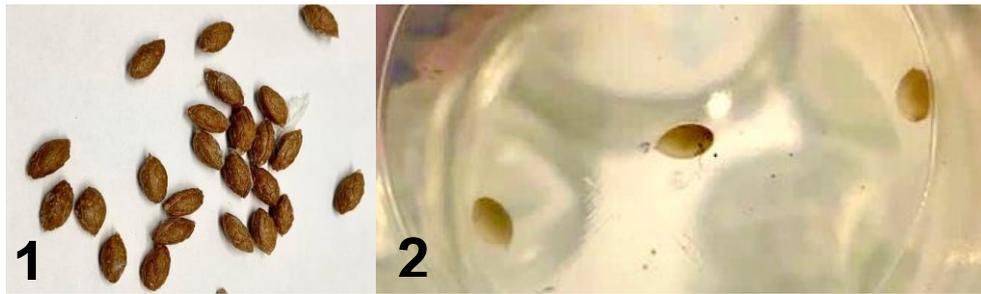


Figura # 1. Semillas de chamburo. Se observan semillas con testa (1) y sin testa (2).

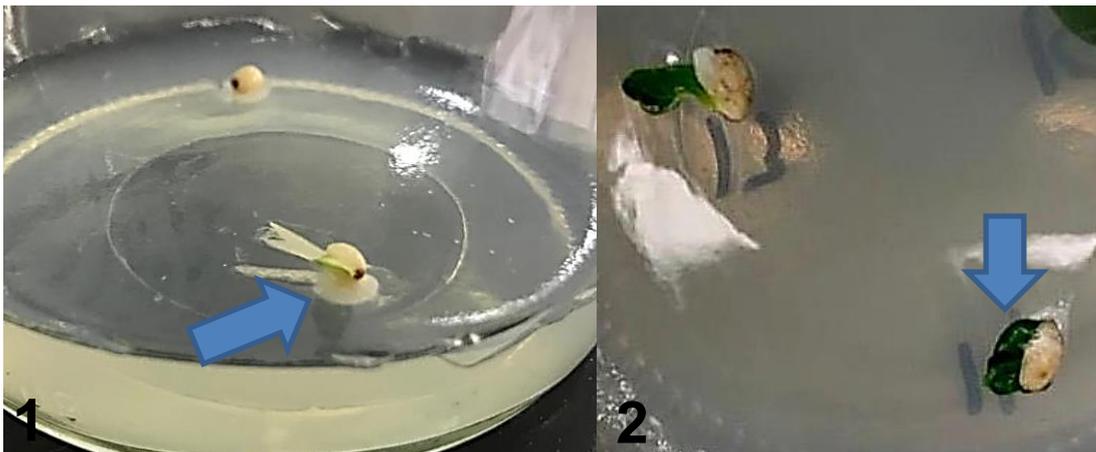


Figura # 2. Frascos de cultivo *in vitro* de semillas de chamburo germinadas y contaminadas. Se observa contaminación alrededor de las semillas (1) y germinación (2) en tratamientos con AgNPs.

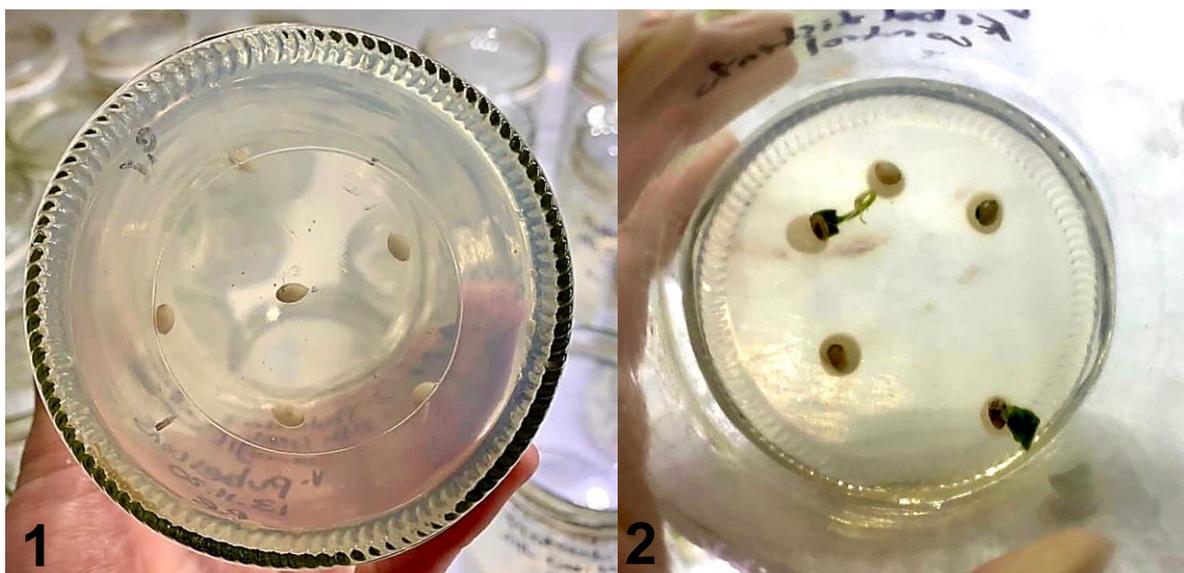


Figura # 3. Frascos de cultivo *in vitro* de semillas de chamburo de tratamientos con AgNPs y antibióticos. Se observan semillas estériles no germinadas en tratamiento con antibióticos (1) y semillas contaminadas y germinadas en tratamiento con AgNPs (2).

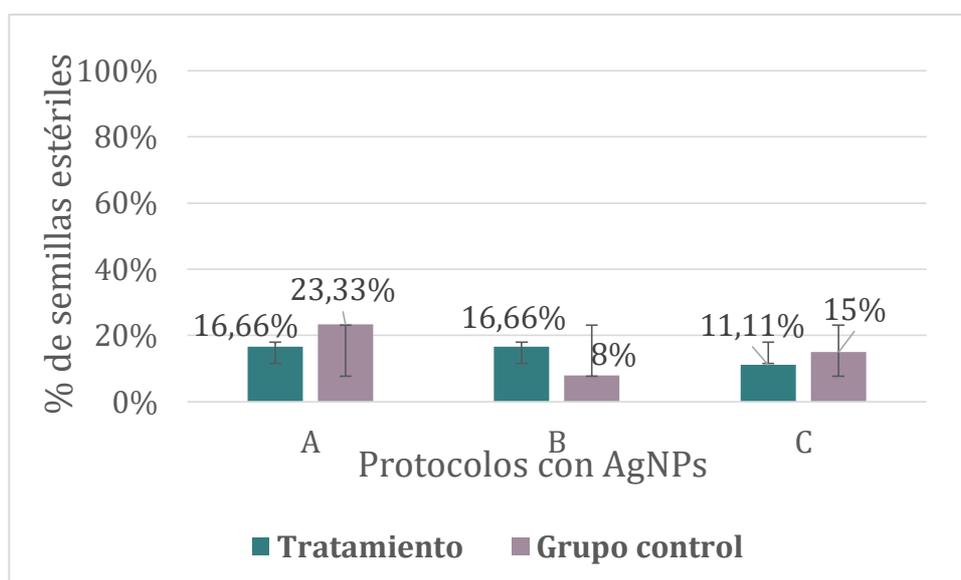


Figura # 4. Resultados más eficientes de esterilidad al utilizar AgNPs. (A) Porcentaje de semillas estériles obtenido en el tratamiento que empleó una solución de 50 mg/L por cinco minutos para lavar a las semillas. (B) Porcentaje de semillas estériles obtenido en el tratamiento que empleó 50 mg/L en el medio de cultivo AM. (C) Porcentaje de semillas estériles obtenido en el tratamiento que empleó una solución de 50 mg/L por 15 minutos para lavar a las semillas.

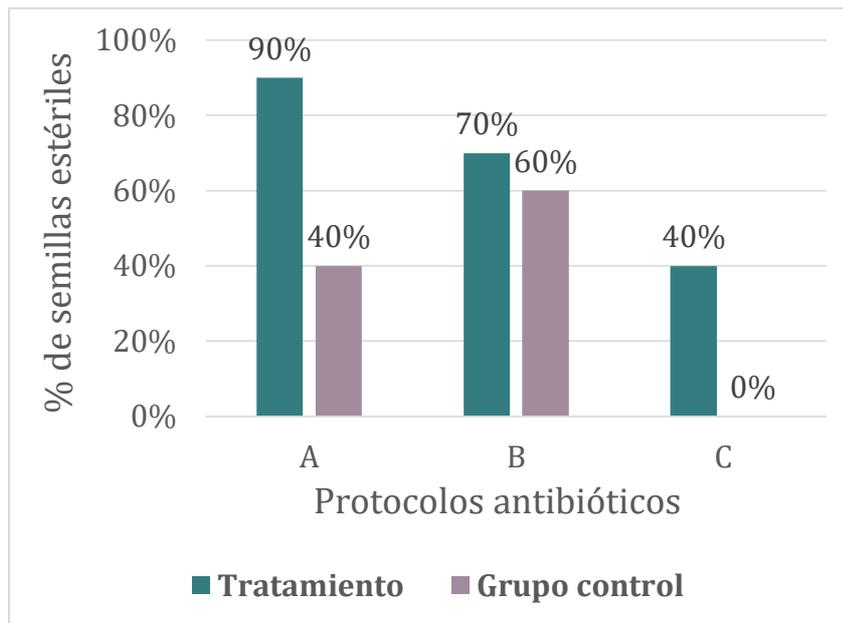


Figura # 5. Resultados más eficientes de esterilidad al utilizar antibióticos. (A) Porcentaje de semillas estériles obtenido en el tratamiento que empleó una solución de 300 mg/L de gentamicina para lavar a las semillas. (B) Porcentaje de semillas estériles obtenido en el tratamiento que empleó una solución de 300 mg/L de rifampicina para lavar a las semillas. (C) Porcentaje de semillas estériles obtenido en el tratamiento que empleó 100 mg/L de rifampicina en el medio de cultivo AM.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, A. (2015). *El Rosero, una bebida con sabores actuales*. Obtenido el 2 de abril de 2020 de <https://www.elcomercio.com/tendencias/elrosero-sabores-bebida-tradicion-austro.html>
- Arroyo, M.; Acebal, C. y de la Mata, I. (2014). "Biocatálisis y biotecnología". *Arbor*, 190 (768): a156. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4010>
- Ávalos, A., Haza, A., Mateo, D., Morales, P. (2013). *Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente*. Obtenido el 16 de abril de 2020 de [file:///C:/Users/mbele/Downloads/43408-Texto%20del%20art%C3%ADculo-65510-1-10-20131203%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/mbele/Downloads/43408-Texto%20del%20art%C3%ADculo-65510-1-10-20131203%20(1).pdf)
- Badillo, V. (1993). Caricaceae: segundo esquema. Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. *Alcance*, 43, 111.
- Battle, M. (2020). *Los países más biodiversos del mundo*. Obtenido el 31 de agosto de 2020 de https://viajes.nationalgeographic.com.es/a/paises-mas-biodiversidad-mundo_15317/2
- Bello-Bello, J., Spinoso-Castillo, J., Pérez Sato, J., Bogdanchikova, N., (2016). Respuesta antimicrobiana de nanopartículas de plata sobre la regeneración in vitro de vainilla (*vanilla planifolia*). *BIOTE-16 Academia Veracruzana de Ciencias*. Obtenido el 10 de abril de 2020 de https://www.researchgate.net/publication/309418457_BIOTE-16_Respuesta_antimicrobiana_de_nanoparticulas_de_plata_sobre_la_regeneracion_in_vitro_de_vainilla_vanilla_planifolia
- Bhattacharya, J., & Khuspe, S. . (2001). *In vitro* and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Scientia Horticulturae*, 91(1-2), 39–49. doi:10.1016/s0304-4238(01)00237-0
- Campos, A. (2013). *Vademecum Académico de Medicamentos*. México D.F, México: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Campozano, S., Saltos, X. (2013). *Diseño de propuesta gastronómica de Carica pubescens "Chamburo"*. Obtenido el 16 de abril de 2020 de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/6012/1/Gs030.pdf>
- Cardoso, P. (2016). *Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud*. Obtenido el 16 de abril de 2020 de <http://revistapediatria.com.ar/wp-content/uploads/2016/04/260-Nanoparti%CC%81culas-de-plata.pdf>
- Carvalho, F. (2013). *e-Monograph of Caricaceae*. Obtenido el 2 de abril de 2020 de <http://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/caricaceae>.
- Casillas, F. (2020). Evaluación de los efectos citotóxicos, genotóxicos y fisiológicos de las Nanopartículas De Plata Argovit® en Allium Test. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Baja California, Baja California.

- Chérrez, J. y Jadán, M. (2015). Obtención de brotes del híbrido Babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) a partir de explantes de hojas ex vitro, vía organogénesis directa. Congreso REDU. Obtenido el 2 de abril de 2020 de https://www.academia.edu/21410092/OBTENCI%C3%93N_DE_BROTOS_DEL_H%C3%8DBRIDO_BABACO_Vasconcellea_x_heilbornii_A_PARTIR_DE_EXPLAN_TES_DE_HOJAS_EX_VITRO_V%C3%8DA_ORGANOGE%C3%89NESIS_DIRECTA
- Chong-Pérez, B., Carrasco, B., Silva, H., Herrera, F., Quiroz, K., & Garcia-Gonzales, R. (2018). Regeneration of highland papaya (*Vasconcellea pubescens*) from anther culture. *Applications in Plant Sciences*, e01182. doi:10.1002/aps3.1182
- Correa, V. (2012). *Efecto de fármacos sobre el equilibrio de especies reactivas: consecuencias moleculares y celulares*. Obtenido el 10 de diciembre de 2020 de: <http://www.elfarmaceutico.es/index.php/component/k2/item/2700-efecto-de-farmacos-sobre-el-equilibrio-de-especies-reactivas-consecuencias-moleculares-y-celulares#.X9WL4mhKjIV>
- Donoso, S. (2019). Establecimiento de protocolos para el cultivo in vitro de caimito (*Pouteria caimito*) y chamburo (*Vasconcellea pubescens*). Tesis de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito, Quito.
- Endara, E. (2018). Desarrollo in vitro de embriones de *V. pubescens* para la generación de plántulas. Tesis de Pregrado, Universidad de las Américas, Quito.
- Espinosa, I. (2016). Germinación, microinjertación y cultivo de callos in vitro de *V. stipulata* y *V. pubescens*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires.
- Fay, M. F. (1994). In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservations? *Biodiversity and Conservation*, 3(2), 176–183. doi:10.1007/bf02291887
- Fundación Heifer Ecuador. (2020). *La agricultura y sus principales problemas en el país*. Obtenido el 20 de noviembre de 2020 de: <http://www.heifer-ecuador.org/wp-content/uploads/2018/03/3.-Reflexion-biodiversidad.pdf>
- Galarza, V. (2002). *Estudio de la afinidad de especies de caricaceae como patrones de babaco y su reacción a Fusarium oxysporum*. Obtenido el 10 de abril de 2020 de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=EC20040023460>
- Godel, A., y Marchou, B. (2007). Rifampicina. EMC - *Tratado de Medicina*, 11(2), 1–4. doi:10.1016/s1636-5410(07)70644-x
- Iturralde, P. (2000). *Producción, cultivo y comercialización de babaco*. Tesis de Pregrado, Universidad de las Américas, Quito.
- Jadán, M., Basantez, K., Gómez, R., Bermúdez, I. (2016). Establecimiento *in vitro* de brotes de *Vasconcellea x heilbornii*(Badillo) Badillo. *Bioteología Vegetal*. 16(2): 67-72. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/511/pdf>

- Jordan, M., & Velozo, J. (1997). *In vitro* propagation of highland papayas (*Carica pubescens* and *C. pentagona*). *Acta Horticulturae*, (447), 103–106. doi:10.17660/actahortic.1997.447.10
- Landázuri, P. (2018). Estudio del efecto hormético y antimicrobiano de nanoplata en la regeneración *in vitro* en mora de castilla (*Rubus glaucus*). Tesis de Pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas del Ecuador, Quito.
- Liñán, M., Troncoso, J., Aparicio, A., Troncoso, A. (2001). *El cultivo in vitro, un método para mejorar la germinación de plantas con interés forestal en Andalucía*. Universidad de Sevilla. Obtenido el 4 de abril de 2020 de <file:///C:/Users/mbele/Downloads/15613-Texto%20del%20art%C3%ADculo-15605-1-10-20140611.pdf>
- Martynyuk, O., Bogdanchikova, N., Burmistrov, V., Vázquez, R., Hernández, C. (2014). *Estándares de trabajo con soluciones de nanoplata ARGOVIT*. Ensenada B.C, México.
- Miller, J. (1992). A Short Course in Bacterial Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, USA*. Obtenido el 20 de abril de 2020 de <https://doi.org/10.1002/jobm.3620330412>
- Missouri Botanical Garden. (2020). *Caricaceae*. Obtenido el 30 de Agosto de 2020 de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Mondal, M., Gupta, S., & Mukherjee, B. B. (1990). *In vitro* propagation of shoot buds of *Carica papaya* L. (caricaceae) var. Honey Dew. *Plant Cell Reports*, 8(10), 609–612. doi:10.1007/bf00270065
- Montgomery, D. (2013). *Design and Analysis of Experiments*. Arizona, Estados Unidos de América: John Wiley & Sons, Inc
- Noah, Y. (2020). *De animales a dioses*. Bogotá, Colombia: Editorial DEBATE.
- O'Brien, C. M., & Drew, R. A. (2009). Potential for using *Vasconcellea parviflora* as a bridging species in intergeneric hybridisation between *V. pubescens* and *Carica papaya*. *Australian Journal of Botany*, 57(7), 592. doi:10.1071/bt09111
- Oyebanji, O., Nweke, O., Odebunmi, O. Galadima, N... (2009). Simple, effective and economical explant- Surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum sedes. *African Journal of Biotechnology*. 8 (20): 5395-5399.
- Padilla, I. M. G., & Burgos, L. (2010). Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on *in vitro* plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports*, 29(11), 1203–1213. doi:10.1007/s00299-010-0900-2
- Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., ... Zbořil, R. (2017). Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology*, 13(1), 65–71. doi:10.1038/s41565-017-0013-y
- Pazos-Ortiz, E., Roque-Ruiz, J. H., Hinojos-Márquez, E. A., López-Esparza, J., Donohué-Cornejo, A., Cuevas-González, J. C., ... Reyes-López, S. Y. (2017). Dose-Dependent

- Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles on Polycaprolactone Fibers against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Journal of Nanomaterials*, 2017, 1–9.
- Perals, J., Angosto, M. (2018). *Protocolo para la propagación in vitro de Carica papaya var. Sweet sense*. Tesis de Maestría, Universidad de Almería, Almería.
- Pierik, (1997). *In Vitro Culture of Higher Plants*. Springer Netherlands. DOI 10.1007/978-94-011-5750-6
- Proaño, E. (2007). Fitoquímica y agroindustrialización de dos genotipos de *Vasconcellea*, Chamburo y Toronche. Tesis de Pregrado, Escuela Politécnica del Ejército, Guayaquil.
- Ramírez, F. (2019). La papaína y su potencial como producto de valor agregado en Costa Rica. Laboratorio de Fitoquímica Universidad Nacional de Costa Rica. Obtenido el 2 de abril de 2020 de https://www.researchgate.net/publication/332738556_La_papain_a_y_su_potencial_como_producto_de_valor_agregado_en_Costa_Papain_and_its_potential_as_a_value-added_product_in_Costa_Rica
- Reuveni, O., Shlesinger, D. R., & Lavi, U. (1990). In vitro clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20(1), 41–46. doi:10.1007/bf00034755
- Rivas, F. (2016). Establecimiento in vitro y multiplicación de brotes de babaco (*Vasconcellea heilbornii*) mediante el uso combinado de reguladores de crecimiento. Tesis de Pregrado, Universidad de las Américas, Quito.
- Rodríguez, M. (2018). *Cultivo in vitro: Alternativa al cultivo tradicional de plantas. Universidad Complutense*. Obtenido el 10 de abril de 2020 de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL%20RODRIGUEZ%20AMARO.pdf>
- Scheldeman, X. (2002). Distribution and Potential of Cherimoya (*Annona Cherimola* Mill.) and Highland Papayas (*Vasconcellea* Spp.) in Ecuador. Tesis de Doctorado, Universidad de Gent, Gent.
- Segretín, M. (2008). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones. Argenbio*. Obtenido el 10 de abril de 2020 de <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>
- Serván, M. (2018). *Interés Farmacéutico de los Mucílago*s. Tesis de Maestría, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Silva, J. A. T. da, Winarto, B., Dobránszki, J., & Zeng, S. (2015). Disinfection procedures for in vitro propagation of *Anthurium*. *Folia Horticulturae*, 27(1), 3–14. doi:10.1515/fhort-2015-0009
- Singh, S., Parasharami, V. (2019). Effect of antibiotics on in vitro seed germination responses in *Adansonia digitata* L.: A valuable medicinal tree. *The Journal of the Society for Tropical Plant Research*, 6(3), 488–492. doi: 10.22271/tpr.2019.v6.i3.060

- Soares, A., Renaud, B., Futuro, D., Secoli, S. (2015). Efectividad del gel de papaína en tratamiento de úlceras venosas. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. DOI: 10.1590/0104-1169.0381.2576
- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J. J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129(2), 195–207. doi:10.1007/s11240-017-1169-8
- Torres, J. (2008). *Conservación de la biodiversidad*. Santiago de Chile, Chile: Comisión Nacional del Medio Ambiente de Chile.
- Ubidia, A. (2019). *Cultivo “in vitro” de tejidos vegetales*. Obtenido el 31 de agosto de 2020 de <https://www.utec.edu.pe/blog-de-carreras/bioingenieria/cultivo-vitro-de-tejidos-vegetales>
- Vaca, I. (2008). Incremento del número de brotes de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv babaco) in vitro mediante la interacción de reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas completas. Tesis de Pregrado, Escuela Politécnica del Ejército, Guayaquil.
- Vélez- Mora, D., Armijos, R., Jordán, Z. (2015). Mejoramiento de la germinación, control de la hiperhidricidad y formación de brotes en *Vasconcellea stipulata* Badillo. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 17(2). <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.43611>
- Vidal, L., Finot, V., Mora, K., Venegas, F. (2009). Características Físico-Químicas del Látex de Papayuelo (*Vasconcellea cundinamarcensis* Badillo, Caricaceae). *Información Tecnológica*. 20 (6): 93-103. doi:10.1612/inf.tecnol.4131it.08