

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**“INFLUENCIA DE LA LUZ Y DEL ÁCIDO GIBERÉLICO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE MUÑA (*Minthostachys spicata* (Benth.) Epling)”**

**TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERA AGRÓNOMA**

**LUZ FIORELA ASTOCONDOR ESPINOZA**

**LIMA-PERÚ**

**2020**

---

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

## FACULTAD DE AGRONOMÍA

### “INFLUENCIA DE LA LUZ Y DEL ÁCIDO GIBERÉLICO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE MUÑA (*Minthostachys spicata* (Benth.) Epling)”

Presentada por:

**LUZ FIORELA ASTOCONDOR ESPINOZA**

Trabajo académico para optar el título profesional de:

**INGENIERA AGRÓNOMA**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

.....  
Ph. D. Hugo Soplín Villacorta  
**PRESIDENTE**

.....  
Ing. Mg. Sc. Cecilia Emperatriz Figueroa Serrudo  
**ASESORA**

.....  
Ing. M. Sc. Karin Cecilia Coronado Matutti  
**MIEMBRO**

.....  
Ing. M. S. Andrés Virgilio Casas Díaz  
**MIEMBRO**

.....  
Biol. Mg. Sc. Mercedes Flores Pimentel  
**CO-ASESORA**

LIMA-PERÚ

2020

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis abuelitos y mis tíos, quienes fueron un ejemplo a seguir, por su perseverancia en la realización de sus sueños.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia, quiénes me apoyaron y confiaron en mí durante todo el proceso del desarrollo de la investigación. A mi mamá, Juana quién me apoyo ante las distintas situaciones que se presentaron, con mucho cariño. A mi papá y mi hermana por su ayuda y consejos.

A mi asesora, Ing. Mg. Sc. Cecilia Figueroa, quien me ayudó en el desarrollo del trabajo, con mucha paciencia y amabilidad.

A mi co-asesora, Biol. Mg. Sc. Mercedes Flores Pimentel, quién me apoyó con sus conocimientos, y sus palabras de motivación.

Al Ph. D. Hugo Soplín Villacorta, por el apoyo en los temas más importantes de la investigación.

## ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1	Muña ( <i>Minthostachys</i> spp.).....	3
2.1.1	Aspectos generales .....	3
2.1.2	Clasificación taxonómica .....	3
2.1.3	Características botánicas .....	4
2.1.4	Regiones del Fruto .....	6
2.1.5	Clasificación del tipo de embrión.....	8
2.1.6	Fenología y propagación .....	9
2.1.7	Hábitat natural .....	11
2.2	Prueba con tetrazolio.....	11
2.3	Germinación.....	16
2.3.1	Factores que intervienen en la germinación .....	16
2.3.2	Tipos de germinación .....	17
2.3.3	Ensayo de germinación en el laboratorio .....	18
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
3.1	Lugar .....	22
3.2	Materiales.....	22
3.2.1	Material biológico .....	22

3.2.2 Materiales y reactivos de laboratorio .....	23
3.2.3 Equipos.....	24
3.3 Método de extracción de la semilla .....	25
3.4 Caracterización morfo-anatómica de la semilla y fruto .....	25
3.4.1 Características externas .....	26
3.4.2 Anatomía interna de la semilla.....	27
3.4.3 Estudio histoquímico.....	27
3.5 Procedimiento del ensayo de germinación .....	28
3.6 Variables evaluadas .....	31
3.6.1 Porcentaje de plántulas normales .....	31
3.6.2 Porcentaje de semillas no germinadas.....	31
3.6.3 Porcentaje de germinación fisiológica (PGF) .....	31
3.6.4 Velocidad de germinación.....	32
3.7 Procedimiento del ensayo de tetrazolio .....	32
3.8 Diseño experimental .....	34
3.8.1 Prueba de germinación.....	34
3.9 Análisis de varianza .....	34
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
4.1.1. El fruto.....	37
4.1.2. Descripción de la semilla .....	39
4.1.3 Evaluación del endospermo .....	41
4.1.4 Mixocarpia .....	42

4.1.5 Examen preliminar .....	43
4.2. Ensayo de germinación de <i>Minthostachys spicata</i> .....	48
4.2.1. Proceso de germinación .....	48
4.2.2. Evaluación de plántulas.....	51
4.3 Análisis estadístico.....	57
4.3.1 Porcentaje de plántulas normales .....	57
4.3.2 Porcentaje de semillas no germinadas.....	62
4.3.3 Porcentaje de germinación fisiológica .....	66
4.3.4 Velocidad de germinación.....	70
4.4 Ensayo de viabilidad .....	70
V. CONCLUSIONES .....	73
VI. RECOMENDACIONES .....	74
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
VIII. ANEXOS .....	81

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) .....	12
Tabla 2: Lavanda ( <i>Lavandula angustifolia</i> ) .....	14
Tabla 3: Métodos detallados para las pruebas de germinación en especies pertenecientes a la familia <i>Lamiaceae</i> .....	30
Tabla 4: Examen preliminar de germinación por tratamiento .....	44
Tabla 5: Tratamientos del ensayo preliminar en el día 6 (22/10/2018) después de la siembra .....	47
Tabla 6: Porcentaje y tiempo de germinación por tratamiento.....	50
Tabla 7: Porcentaje de plántulas y semillas por tratamiento a los 11 días .....	51
Tabla 8: Análisis ANVA para el porcentaje de plántulas normales .....	57
Tabla 9: Comparación de medias para plántulas normales .....	61
Tabla 10: Análisis ANVA para el porcentaje de semillas no germinadas.....	62
Tabla 11: Comparación de medias para semillas no germinadas .....	66
Tabla 12: Análisis ANVA para el porcentaje de germinación fisiológica .....	66
Tabla 13: Comparación de medias para germinación fisiológica.....	69
Tabla 14: Clasificación de la semilla <i>Minthostachys spicata</i> , según patrón de tinción .....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb.....	5
Figura 2: Arquitectura de la copa y raíz de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb .....	6
Figura 3: Regiones del pericarpo de <i>Mentha cervina</i> (Wiik s.n.).....	7
Figura 4: Tipos de embriones de acuerdo a la posición .....	8
Figura 5: Clasificación de embriones de la Familia <i>Lamiaceae</i> .....	9
Figura 6: <i>Minthostachys</i> sp., A. Ramas. B. Hojas vistas al microscopio estereoscopio, C. inflorescencia y D. Cálices y frutos. ....	10
Figura 7: Tejido de la semilla de romero.....	12
Figura 8: Prueba con tetrazolio de <i>Rosmarinus officinalis</i> , A. Pasos de la preparación B. Evaluación, ejemplos de semillas no viables .....	13
Figura 9: Núculas de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	13
Figura 10: Tejido de la semilla de lavanda ( <i>Lavandula angustifolia</i> ).....	14
Figura 11: Prueba con tetrazolio de <i>Lavandula angustifolia</i> , A. Pasos de la preparación. B. Evaluación, ejemplos de semillas no viables .....	15
Figura 12: Núculas de <i>Lavandula angustifolia</i> .....	15
Figura 13: Zona de estudio, provincia de Canta, Lima .....	23
Figura 14: Planta de muña, <i>Minthostachys spicata</i> .....	23
Figura 15: Frutos extraídos y frutos adheridos al cálamo de muña <i>Minthostachys spicata</i> .....	25
Figura 16: Semilla de <i>Minthostachys spicata</i> .....	26
Figura 17: A. Estéreo-microscopio Stemi 305 con iPad. B. Embrión de <i>Minthostachys spicata</i> .....	27

Figura 18: Cámara de germinación 25°C ± 2° constante .....	29
Figura 19: Vasos precipitados con semillas frescas de <i>Minthostachys spicata</i> .....	33
Figura 20: Semilla de <i>Minthostachys spicata</i> luego de la tinción con la sal de tetrazolio ..	33
Figura 21: <i>Minthostachys spicata</i> . A. Inflorescencia, B. Flor, C. y D. Frutos inmaduros, E. Fruto maduro .....	37
Figura 22: Frutos de <i>Minthostachys spicata</i> . a. vista dorsal, dos depresiones con ceras blanquecinas (d), b. vista ventral .....	38
Figura 23: Superficie del epicarpo de <i>Minthostachys spicata</i> , observación al microscopio compuesto, 100x .....	38
Figura 24: <i>Minthostachys spicata</i> . 1. Posición del embrión axial, 2. Embriones con cotiledones gruesos, (A) Radícula, (B) Plúmula .....	39
Figura 25: <i>Minthostachys spicata</i> . A. Semilla con episperma, B. Semilla sin episperma (partes de la semilla), C. Embrión .....	40
Figura 26: A. Corte longitudinal de la semilla. B. Corte transversal con cotiledones C. Con el endospermo .....	40
Figura 27: A. Endospermo sin coloración. B. Endospermo con coloración, rojo- anaranjado, reacción con Sudan III, microfotografía con estereoscopio 20X.....	41
Figura 28: Tinción con Sudan III, A. Vista dorsal, B. Se observa por transparencia los cotiledones .....	41
Figura 29: Tinción negativa para almidón.....	42
Figura 30: Reacción de mixocarpia en frutos de <i>Minthostachys spicata</i> , a partir de un microscopio compuesto de 100x .....	43
Figura 31: Germinación del examen preliminar de muña con fungicida y AG3 .....	45
Figura 32: Anomalías de las plántulas con fungicida.....	46
Figura 33: Proceso de germinación de <i>Minthostachys spicata</i> .....	48

Figura 34: Curvas de germinación de <i>Minthostachys spicata</i> .....	50
Figura 35: Porcentaje de plántulas y semillas por tratamiento .....	51
Figura 36: Plántulas normales con ligera zona necrótica de <i>Minthostachys spicata</i> con el tratamiento 1 (Luz fluorescente y 0ppm de AG3) .....	52
Figura 37: Plántulas normales con ligera infección secundaria de <i>Minthostachys spicata</i> con el tratamiento 1 (Luz fluorescente y 0ppm de AG3) .....	52
Figura 38: Plántulas normales a) con hojas cloróticas desarrolladas en oscuridad y con AG3. b) con hojas verdes desarrolladas en luz y con AG3 .....	53
Figura 39: Plántula normal con raíz secundaria .....	54
Figura 40: Plántulas anormales.....	55
Figura 41: A) Semillas frescas, B) Semilla frescas en placas Petri .....	56
Figura 42: Semillas muertas .....	57
Figura 43: Gráfica de efectos principales para plántulas normales .....	59
Figura 44: Grafica de interacción para plántulas normales .....	59
Figura 45: Diagrama de cajas para plántulas normales .....	60
Figura 46: Gráfica de puntos de las medias para plántulas normales.....	61
Figura 47: Grafica de efectos principales para semillas no germinadas.....	63
Figura 48: Grafica de interacción para semillas no germinadas.....	64
Figura 49: Diagrama de cajas para semillas no germinadas.....	65
Figura 50: Grafica de puntos de medias para semillas no germinadas.....	65
Figura 51: Efectos principales para germinación fisiológica .....	67
Figura 52: Gráfica de interacción para germinación fisiológica .....	68
Figura 53: Diagrama de cajas para germinación fisiológica .....	68
Figura 54: Gráfica de puntos de medias para germinación fisiológica .....	69
Figura 55: Índice de velocidad de germinación.....	70

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado.....	81
Anexo 2. Medida de semillas de <i>Minthostachys spicata</i> .....	82
Anexo 3. Análisis ANVA para el porcentaje de plántulas normales.....	83
Anexo 4. Porcentaje de plántulas normales.....	84
Anexo 5. Análisis ANVA para el porcentaje de semillas no germinadas.....	85
Anexo 6. Porcentaje de semillas no germinadas.....	86
Anexo 7. Análisis ANVA para el porcentaje de germinación fisiológica.....	87
Anexo 8. Porcentaje de germinación fisiológica.....	88
Anexo 9. Índice de velocidad de germinación.....	89
Anexo 10. Tabla de resultados de germinación desde el día 1 al día 11.....	90

## RESUMEN

La muña *Minthostachys* spp. es una planta que suele referirse como maleza, ya que se encuentra en forma silvestre, la importancia que posee esta planta está en la extracción de aceites esenciales que se emplean en la industria cosmética, farmacológica, así como también su uso en la medicina tradicional. Existe escasa investigación acerca de sus características morfológicas y su forma de dispersión. Por esta razón, la investigación realizada a la especie *Minthostachys spicata* tuvo como objetivos el análisis morfológico dividido en la descripción de los frutos, semillas y la reacción de mixocarpía; característica de la subfamilia Nepetoideae. El segundo objetivo consistió en determinar el efecto de la calidad de la luz fluorescente y la acción del ácido giberélico en la germinación de las semillas de muña. El ensayo se realizó bajo condiciones controladas de laboratorio con fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), a una temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; se evaluó el efecto de la luz (fluorescente, oscuridad) y tres concentraciones de ácido giberélico (0, 5 y 7ppm) en la germinación. Se empleó un diseño al azar (DCA) con arreglo factorial 2x3 y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey al 0.05. Finalmente, se encontró que la semilla era completa, poseía episperma marrón, endospermo limitado o muy reducido con presencia de lípidos y embrión pequeño, ovoide, de posición axial. Por otro lado, se evidenció estadísticamente que el factor concentraciones de ácido giberélico no influyó y que por el contrario el efecto de la interacción del factor luz y el factor concentraciones de ácido giberélico sí tuvo diferencia significativa en la germinación de las semillas de muña, siendo el tratamiento con luz sin aplicación de AG3 el más favorable alcanzando 83% de germinación.

Palabras clave: *Minthostachys spicata*, morfología, germinación, luz, AG3.

## ABSTRACT

The *Minthostachys* spp. is a plant that is usually referred to as weeds, since it is found in the wild, the importance that this plant has is in the extraction of essential oils that are used in the cosmetic, pharmacological industry, as well as its use in traditional medicine. There is little research about its morphological characteristics and its form of dispersion. For this reason, the research carried out on the species *Minthostachys spicata* had as objectives the morphological analysis divided in the description of the fruits, seeds and the reaction of myxocarpy; characteristic of the subfamily Nepetoideae. The second objective was to determine the effect of the quality of fluorescent light and the action of gibberellic acid on the germination of seedlings. The test was carried out under controlled laboratory conditions with photoperiod (16 hours of light and 8 hours of darkness), at a constant temperature of  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; The effect of light (fluorescent, dark) and three concentrations of gibberellic acid (0, 5 and 7ppm) on germination were evaluated. A randomized design (DCA) with a 2x3 factorial arrangement was used and the Tukey test at 0.05 was used for the comparison of means. Finally, it was found that the seed was complete, had brown episperm, limited or very small endosperm with the presence of lipids and small, ovoid embryo, axial position. On the other hand, it was statistically evident that the gibberellic acid concentration factor did not influence and that on the contrary, the effect of the interaction of the light factor and the gibberellic acid concentration factor did have a significant difference in the germination of the muña seeds, being the light treatment without application of AG3 the most favorable, reaching 83% of germination.

Key words: *Minthostachys spicata*, morphology, germination, light, AG3.

## I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1991), se estima que más del ochenta por ciento de la población mundial viene utilizando la medicina tradicional, siendo los extractos de plantas medicinales o sus principios activos, empleados en la mayoría de los tratamientos para cubrir las necesidades de atención primaria de salud (Akerlele *et al.*, 1993; citados en Bermúdez *et al.*, 2005).

Las montañas andinas del Perú poseen una gran variedad de hábitats, las cuales albergan distintas especies de plantas aromáticas entre silvestres y cultivadas (Torres y Parra, 2009; citados en Tello, 2017). Los fines de estas plantas son múltiples, ya sean en la alimentación, medicina y a nivel cultural, para el poblador peruano. El país ha aportado más de mil cuatrocientas especies de plantas aromáticas y medicinales al mundo, conociéndose los usos tradicionales y sus propiedades medicinales (Brack, 2005; citado en Tello, 2017).

En el género *Minthostachys*, se encuentran arbustos aromáticos, los cuales se extienden a lo largo de la cordillera de los Andes desde Venezuela hasta el noroeste de Argentina. Los géneros *Minthostachys* y *Mentha* L. poseen un parecido; sin embargo, estos dos géneros no se encuentran cercanamente relacionados (Wagstaff, Olmstead y Cantino, 1995; citados en Schmidt-Lebuhn, 2007).

Krenmayr *et al.* (2000), citado en Campillo (2003), indican que existen doce especies de *Minthostachys* y que, específicamente en el Perú, están las especies *setosa*, *mollis*, *andina*, *tomentosa* y *difusa*.

Por otro lado, Schmidt-Lebuhn (2008), citado en Schmidt-Lebuhn (2008), afirma que existen 17 especies del género *Minthostachys*.

La muña es una planta silvestre andina, que posee relevancia en el campo de la etnobotánica, bioquímica y diversidad genética (Tello *et al.*, 2012).

Debido a que la muña no se encuentra domesticada, no se cuenta con el manejo agronómico para preservar su uso ancestral y difundir su comercio; se debe recurrir a extraer las plantas de poblaciones silvestres, que generalmente resultan ser escasas (Tello *et al.*, 2012). Asimismo, existe poca información en cuanto a la germinación a partir de sus semillas (Arévalo, 1995; citado en Suarez *et al.*, 2011).

Aphane, Chadha y Oluoch, (2003); citado en Cruz-Garcia y Vael (2017), afirma que a pesar de la importancia de las plantas silvestres alimenticias, por lo general son ignoradas en el desarrollo de la investigación y las políticas alimentarias, y aún la atención es limitada. De acuerdo a Chweya y Eyzaguirre, (1999), citados en Cruz-Garcia y Vael (2017), en el ámbito científico las plantas silvestres y semidomesticadas han sufrido de poca atención en la investigación agrícola. Por ello, son erróneamente referidas como recursos vegetales "menores" o "suplementarios", asimismo como "no convencionales" o "subutilizadas" (Ogle 2001; citado en Cruz-Garcia y Vael, 2017).

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo principal**

Proponer las condiciones de laboratorio más adecuadas que permitan la germinación rápida y efectiva de las semillas de muña.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

a. Describir la morfología de la semilla de muña.

b. Determinar el efecto de la calidad de la luz fluorescente y la acción del ácido giberélico en la germinación de las semillas de muña.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Muña (*Minthostachys* spp.)

#### 2.1.1 Aspectos generales

Tapia, 1999; citado en Campillo (2003), indica que bajo el nombre de muña se reconocen al menos tres géneros diferentes de la familia de las Lamiáceas: *Minthostachys*, *Satureja* y *Hedeoma*.

La muña tiene diferentes nombres comunes tales como: “waycha”, “koa” según la región de procedencia (Ormachea, 1979; citado en Campillo, 2003).

Cobo menciona el nombre de “coa” proveniente de la lengua quechua y “huaycha” del aymara debido a las similitudes entre el poleo (*Mentha pulegium*) y el orégano (*Origanum vulgare*); además, añade que los españoles denominaron poleo silvestre, nombre que en algunos lugares se sigue utilizando (Villar, 1982; citado en Campillo, 2003).

La muña es un arbusto silvestre andino, el cual posee un aroma similar a la menta; se encuentra distribuida en los países ubicados en Sudamérica, presentándose diecisiete especies y se añade la presencia de un posible híbrido intergenérico (Tello *et al.*, 2010; citados en Tello, 2012).

#### 2.1.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la especie según el sistema APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016) es la siguiente (ver Anexo 1):

Clado	:	angiospermas (Angiospermae)
Clado	:	mesangiospermas (Mesangiospermae)
Clado	:	eudicotiledóneas (Eudicotyledoneae)
Clado	:	gunneríidas (Gunneridae)
Clado	:	pentapétalas (Pentapetalae)
Clado	:	superastéridas
Clado	:	astéridas
Clado	:	euastéridas (genciánidas)
Clado	:	lámidas
Orden	:	Lamiales
Familia	:	Lamiaceae
Género	:	<i>Minthostachys</i> (Benth.) Spach
Especie	:	<i>Minthostachys spicata</i> (Benth.) Epling

### 2.1.3 Características botánicas

La planta de muña se considera un arbusto ramoso llegando a medir entre 1-2 m de alto, posee ramas divaricadas, sus hojas opuestas poseen un borde aserrado de formas aovadas o aovado-lanceoladas de 2 a 5 cm, el ápice es agudo; las hojas son glabras arriba, en el envés son blando-tomentosas. Las flores se agrupan en cimas que forman verticilios ubicados en los extremos de las ramas superiores; sus flores son de coloración blanca-pilosas.

El cáliz es de forma cilíndrica, levemente bilabiado. La corola presenta entre 4 a 6 mm de largo, con una coloración blanca. El androceo está compuesto por 4 estambres fértiles, los cuales son sutilmente más cortos que la corola (Munares, 1983; citado en Campillo, 2003) (Fig. 1).

La muña presenta una raíz pivotante y de fuerte consistencia, con una corona de la cual emergen un gran número de tallos con abundantes hojas entre anchas y angostas distribuidas de manera alterna y simple, no poseen brácteas, de tallo cuadrangular (Fig. 2). En cuanto a sus flores se encuentran agrupadas en inflorescencias racimosas con 10 a 30 flores, formando glomérulos.

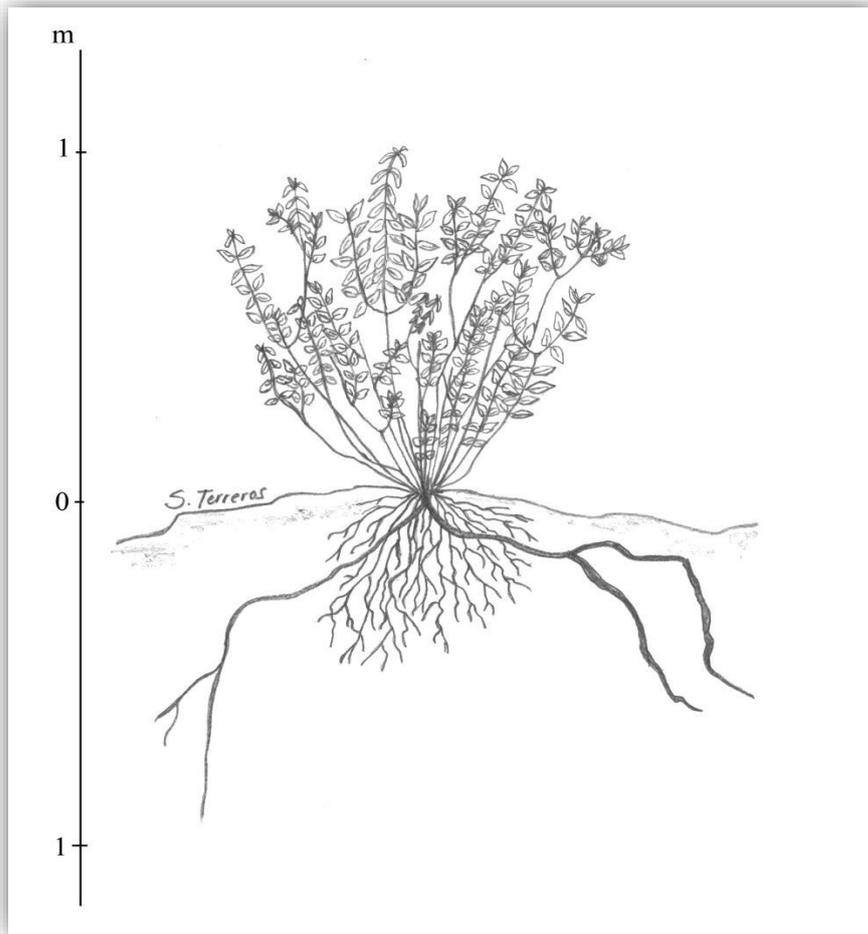
El androceo está conformado de 4 estambres, su gineceo es súpero, compuesto por 4 lóbulos y un estilo bifido; la semilla presenta una longitud de 0.5 a 1 mm y coloración marrón (Salamanca, 1986; citado en Campillo, 2003).

Otra descripción mencionada por Salamanca, (1986), citado en Campillo (2003) es que la planta presenta como particularidad dentro de las labiadas, la de albergar el aceite esencial en las glándulas odoríferas de las hojas, las cuales le otorgan el aroma característico de la muña.



**Figura 1: *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., A. Ramita terminal (x 1); Cáliz B1. Cara externa (x 7), B2. Cara interna (x 7); Flor C1. Vista exterior (x 8), C2. Corte longitudinal (x 10); D. Antera (x 30); E. Ovario (x 20).**

FUENTE: Terreros, 2016.



**Figura 2: Arquitectura de la copa y raíz de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb. (Escala 1/20)**

FUENTE: Terreros, 2016.

#### **2.1.4 Regiones del Fruto**

De acuerdo a Ryding (2010), la variación de la estructura del pericarpo dentro de la Tribu Mentheae está fuertemente influenciado por la variación del ADN, a continuación se menciona las características de las 4 regiones del fruto que propone el autor (Fig. 3).

##### a. Exocarpo

La capa única de células del exocarpo presenta un espesor de 2 a 100  $\mu\text{m}$ , siendo en su mayoría parenquimatosas, rara vez esclerénquima. Las células que se encuentran pueden ser mucilaginosas y no mucilaginosas.

Siendo las células mucilaginosas las cuales producen mucilago al humedecerse o pueden ser vestigiales, siempre son incoloras cuando son funcionales y a veces contienen cuerpos globosos sin almidón. Las células no mucilaginosas por lo general suelen ser más pequeñas que las células mucilaginosas en su mayoría de color marrón y tienen la pared más gruesa. Podría haber una relación entre el grosor del exocarpo y la cantidad de mucilago producido por las células mucilaginosas (Ryding, 1995; citado por Ryding 2010).

b. Mesocarpo

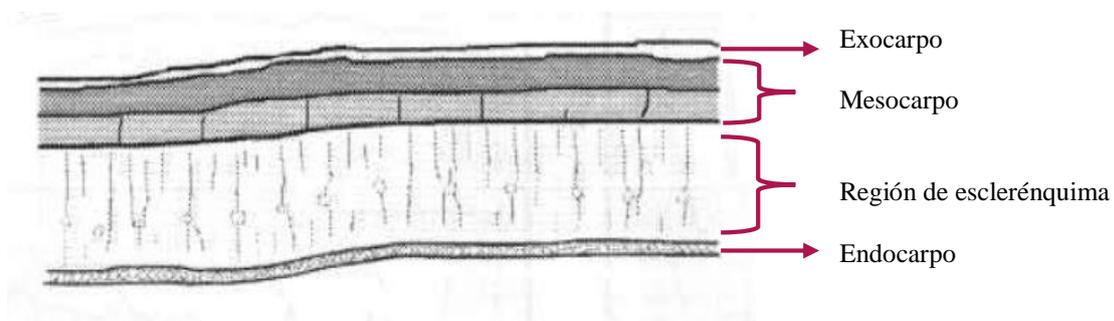
Consta de 1-15 capas de células y de espesor de 1-80  $\mu\text{m}$ . Las células pueden ser parenquimatosas o en algunos casos esclerenquimatosas, el color es pardusco, incoloro o raramente violeta. La capa más interna por lo general suele ser más gruesa a comparación de las demás capas, más pálida, puede contener cristales prismáticos o rara vez más delgado.

c. Región de esclerénquima

Consiste en una sola capa dispuestas verticalmente, posee un grosor de 5 a 140  $\mu\text{m}$ , incolora, o en algunos casos parduscos, con frecuencia posee cristales prismáticos. Posee un aspecto casi liso.

d. Endocarpo

Posee una capa única de células endocarpídicas de 1.5 a 40  $\mu\text{m}$  incolora y algunas veces de color ligeramente marrón, las paredes celulares están claramente reticuladas-escalariformes.



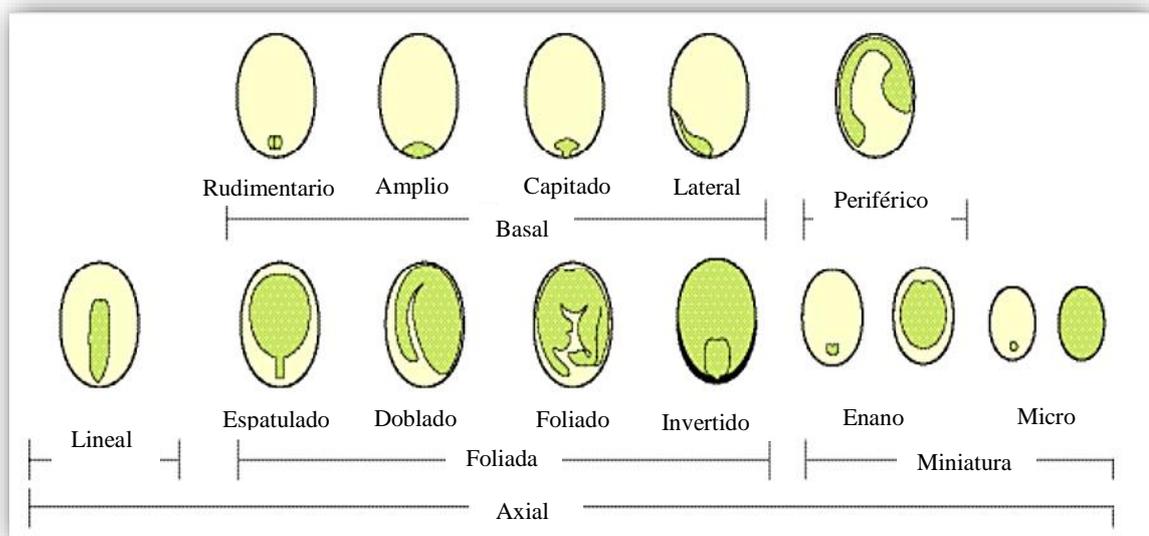
**Figura 3: Regiones del pericarpo de *Mentha cervina* (Wiik s.n.)**

FUENTE: Ryding, 2010.

Ryding (2010), señala que *Minthostachys* presenta el grosor de las células exocarpiales no mucilaginosas de 5µm para las especies *mollis* y *verticillata*, además el número aproximado de capas de células del mesocarpio es 2 para *mollis* y 3 para *verticillata*, el grosor de la capa más interna del mesocarpio en relación con las capas externas es muy similar, sin cristales, el grosor de la región de esclerénquima para la especie *mollis* es 13 µm y para *verticillata* 8 µm, no presenta cristales en la región de esclerénquima, siendo el espesor del endocarpo en *mollis* de 3 µm y en *verticillata* es 2 µm.

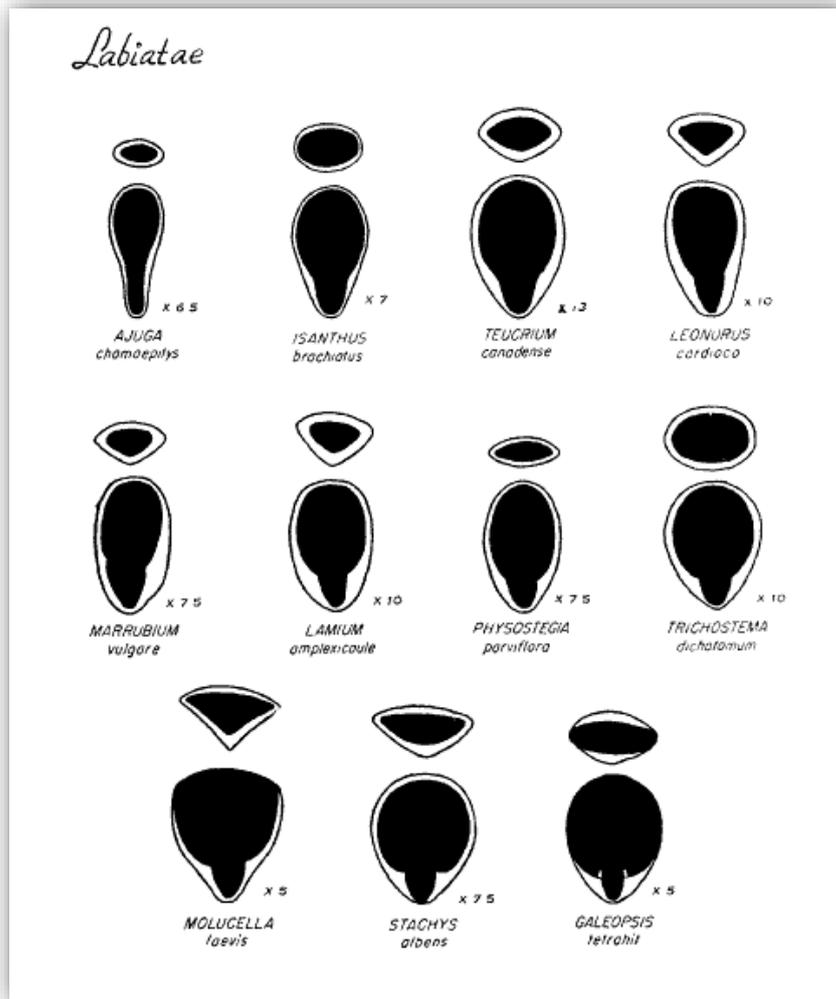
### 2.1.5 Clasificación del tipo de embrión

El tipo de embrión que posee la familia Lamiaceae, se encuentra dentro de la categoría axial, a su vez existen subdivisiones: Lineal, Miniatura y Foliada. Siendo la clasificación Foliada, la cual pertenece a las Lamiaceae, el embrión foliado se caracteriza por ser grande en relación al espacio, central, los cotiledones están expandidos y el endospermo no contiene almidón. Finalmente está en la subcategoría de invertidos, significa que el embrión es recto, con cotiledones gruesos, que se superponen y encierran un pequeño hipocotilo. Además, se caracteriza por la falta de endospermo o se encuentra muy reducido. En algunas ocasiones el embrión puede confundirse con los embriones de tipos doblados o espatulados (Fig. 4 y 5).



**Figura 4: Tipos de embriones de acuerdo a la posición**

FUENTE: Martin, 1946.



**Figura 5: Clasificación de embriones de la Familia *Lamiaceae***

FUENTE: Martin, 1946.

### 2.1.6 Fenología y propagación

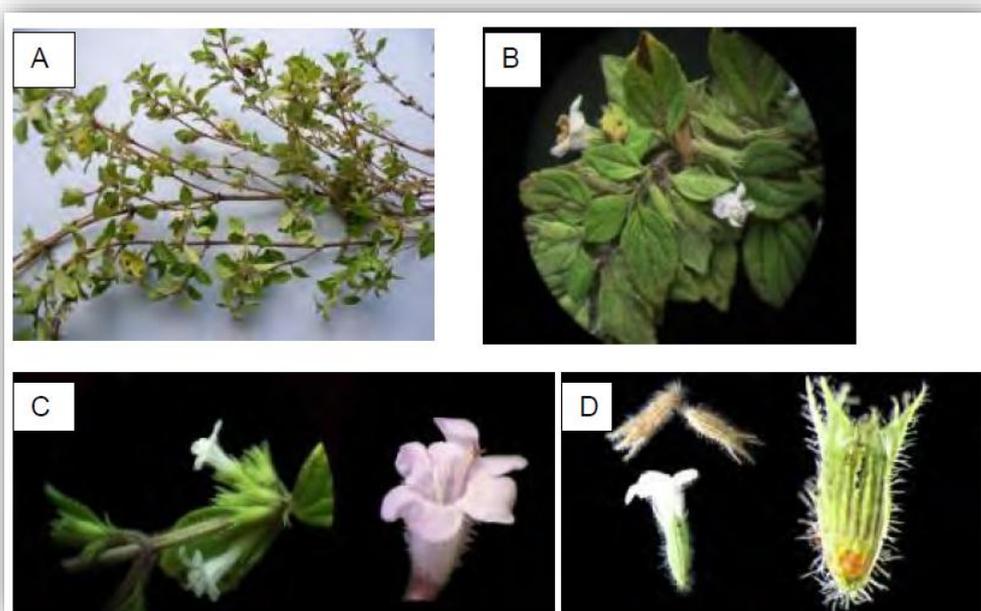
Tello (2012) menciona que los estados fenológicos en condiciones de secano son los siguientes: emergencia en almácigo (10 a 15 días), ramificación (de 90 a 180 días), floración-fructificación y defoliación-maduración. Asimismo, las formas de propagación más utilizadas son por estacas, por separación de matas y por semilla sexual (almácigo), siendo esta última la mejor. En sus ensayos, muestra que de una hectárea bajo secano se cosecha al año 11 600 kg de hoja fresca, obteniéndose 66 litros de aceite esencial.

Al poseer un crecimiento en grupos o matas, según Ormachea, (1979), citado en Campillo (2003), su propagación suele realizarse con mayor frecuencia a partir de estacas.

El autor propone que la germinación puede tomar menos días si se emplea semilla trillada (Tello *et al.*, 2012).

En el género *Minthostachys*, el cáliz es persistente en la planta con la finalidad de proteger a la flor y lograr dispersar los frutos. Se presenta principalmente la dispersión de los frutos por anemocoria, a través del viento (Schmidt-Lebuhn, 2008; citado en Tello, 2011). Además por epiantropocoria, cuando se adhieren a la ropa de las personas (Tello, 2011) (Fig. 6).

Suarez *et al.* (2011) concluyen que las semillas de la especie *Minthostachys mollis* resultan ser dependientes de la luz, es decir fotoblásticas positivas.



**Figura 6:** *Minthostachys* sp., A. Ramas. B. Hojas vistas al microscopio estereoscopio, C. inflorescencia y D. Cáliz y frutos.

FUENTE: Tello, 2011.

### **2.1.7 Hábitat natural**

Este arbusto perenne se desarrolla en pendientes rocosas, pedregosas, al lado de carreteras y caminos de herradura, en altitudes de 3000 hasta los 3600 msnm (Rodríguez, 1998; citado en Campillo, 2003). Mantilla, (2002), citado en Campillo (2003), plantea que el género *Minthostachys* puede desarrollarse entre los 2800 hasta 3800 msnm, Rodríguez y Mantilla coinciden que el ambiente propicio para su crecimiento es en pendientes poco secas y pedregosas.

*Minthostachys* spp. prefiere climas de abundantes lluvias y con alta luminosidad, donde las horas de luz diarias no deben ser menores a catorce horas (Morales, 1973; citado en Campillo, 2003).

### **2.2 Prueba con tetrazolio**

Según ISTA (2004), citado en Rodríguez *et al.* (2008), la prueba topográfica de tetrazolio es un análisis bioquímico basado en las reacciones de oxidación-reducción que se llevan a cabo en las células vivas del embrión u otros tejidos de la semilla cuando entran en contacto con la sal de tetrazolio. Las células vivas contienen unas enzimas llamadas hidrogenasas, que están involucradas en la respiración celular y son capaces de reaccionar con la solución de tetrazolio, generando un compuesto insoluble de color rojo (formazán) que permite identificarlas, diferenciándolas de las células muertas que pueden estar en la semilla.

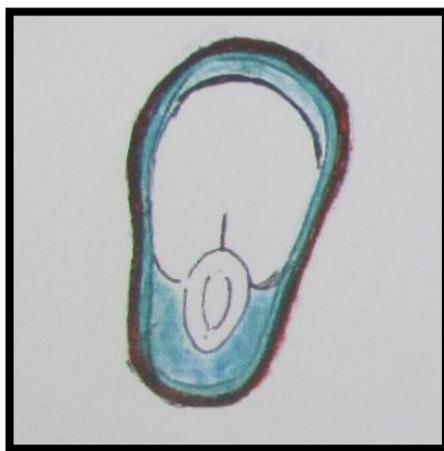
Esta prueba se puede emplear para una evaluación rápida de la viabilidad de las semillas, cuando se requiera que las semillas sean sembradas poco después de la cosecha, se tengan semillas con dormancia profunda o se presenten semillas con germinación lenta; además, cuando se urge una estimación rápida del potencial de germinación. Asimismo, se puede usar para evaluar la viabilidad individual de las semillas al finalizar la prueba de germinación (ISTA, 2016b).

El género *Minthostachys* spp. no posee un protocolo definido para la prueba de tetrazolio. Lo que se reporta son los requerimientos para dos géneros pertenecientes a la misma familia (ISTA, 2016b), (Tabla 1 y Tabla 2), (Figura 7, 8, 9, 10, 11 y 12)

**Tabla 1: Romero (*Rosmarinus officinalis*)**

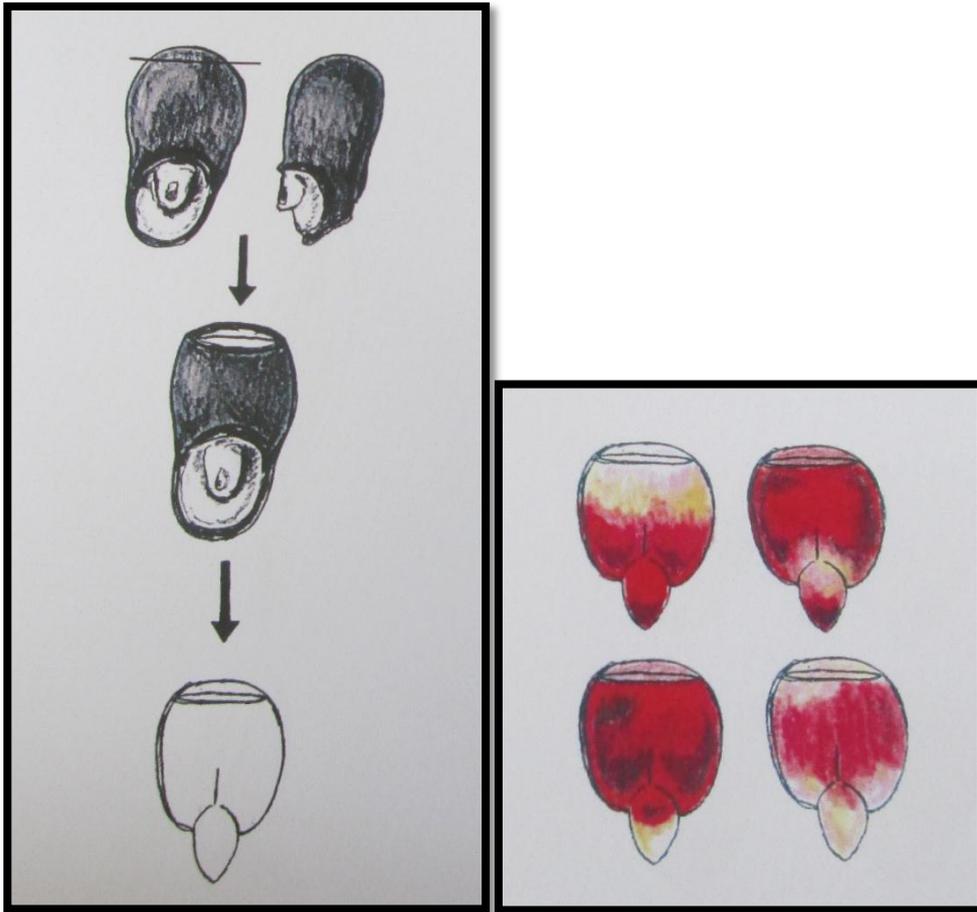
<b>Especie / género:</b>	<b>Rosmarinus, Lamiaceae</b>
<b>Instrumentos:</b>	Vasos (4 x 250 ml), aguja de disección (punta de lanceta), bisturí, papel de filtro, pinzas, soporte para la evaluación.
<b>Pretratamiento:</b>	Remojar 18 horas en agua a 20° C
<b>Preparación antes de la tinción:</b>	Corte una pequeña pieza transversalmente en el extremo distal
<b>Tinción:</b>	18 horas, 30°C, solución TZ al 1,0%
<b>Preparación para la evaluación:</b>	Exponer el embrión
<b>Evaluación (área máxima de tejido no teñido, flácido y / o necrótico permitido):</b>	1/3 de radícula, medida desde la punta de la radícula, 1/3 del extremo distal de los cotiledones
<b>Observaciones:</b>	Ninguna

FUENTE: ISTA, 2003.



**Figura 7: Tejido de la semilla de romero**  
**(*Rosmarinus officinalis*) (vista lateral)**

FUENTE: ISTA, 2003.



**Figura 8:** Prueba con tetrazolio de *Rosmarinus officinalis*, A. Pasos de la preparación B. Evaluación, ejemplos de semillas no viables

FUENTE: ISTA, 2003.



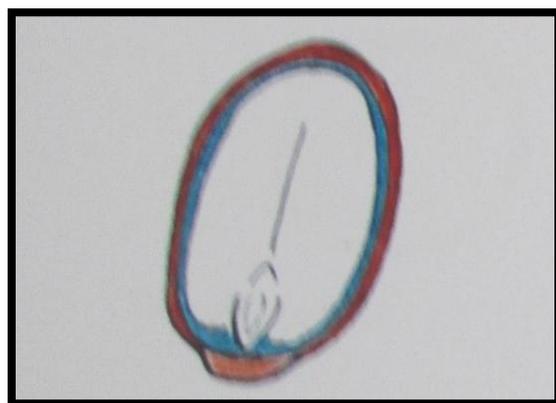
**Figura 9:** Núculas de *Rosmarinus officinalis*

FUENTE: ISTA, 2010.

**Tabla 2: Lavanda (*Lavandula angustifolia*)**

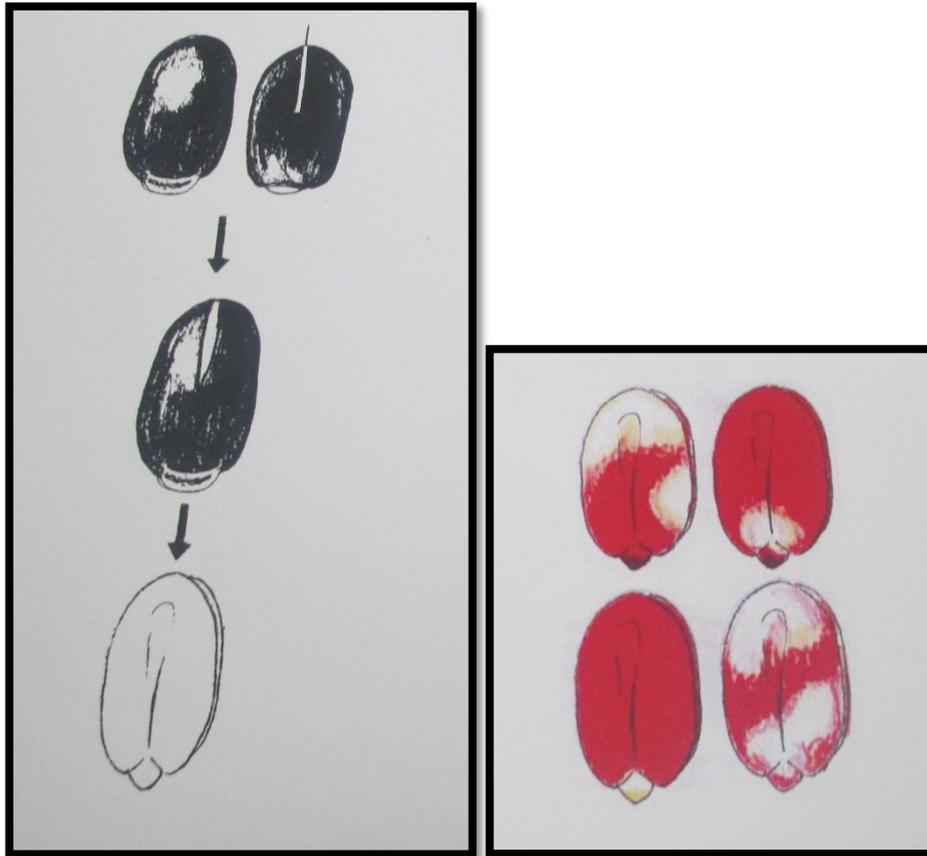
<b>Especie / género:</b>	<b>Lavándula; Lamiaceae</b>
<b>Instrumentos:</b>	Vasos de precipitados (4 x 50 ml), cuenco pequeño, cuchillas de afeitar, aguja de disección (punta de lanceta), bisturí, papel de filtro, pinzas, soporte para evaluación, binocular.
<b>Pretratamiento:</b>	Remojar 18 horas en agua a 20° C
<b>Preparación antes de la tinción:</b>	Corte longitudinalmente 1/3 a través del extremo distal del endosperma (a través del centro de la semilla)
<b>Tinción:</b>	16 horas, 30°C, 1,0% de solución TZ
<b>Preparación para la evaluación:</b>	Extracción de embrión
<b>Evaluación (área máxima de tejido no teñido, flácido y / o necrótico permitido):</b>	1/3 de radícula, medida desde la punta de la radícula, 1/3 del extremo distal de los cotiledones
<b>Observaciones:</b>	Ninguna

FUENTE: ISTA, 2003.



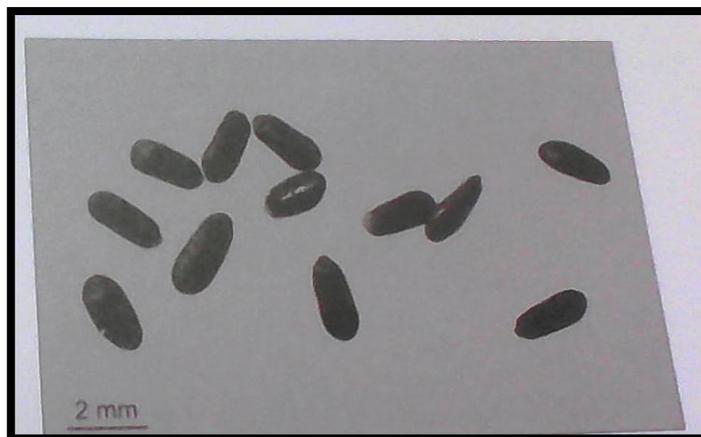
**Figura 10: Tejido de la semilla de lavanda (*Lavandula angustifolia*) (sección longitudinal)**

FUENTE: ISTA, 2003.



**Figura 11: Prueba con tetrazolio de *Lavandula angustifolia*, A. Pasos de la preparación. B. Evaluación, ejemplos de semillas no viables**

FUENTE: ISTA, 2003.



**Figura 12: Núculas de *Lavandula angustifolia***

FUENTE: ISTA, 2010.

## **2.3 Germinación**

La germinación es el proceso fisiológico que se inicia con la semilla y conlleva a la emergencia y el desarrollo de las estructuras esenciales para la obtención de una planta normal (Delouche, 2002; citado en Morales-Santos *et al.*, 2017).

Según Pérez y Pita (1998), el proceso de germinación se inicia con la entrada de agua en la semilla (imbibición) y finaliza con el comienzo de la elongación de la radícula. Además menciona que, en condiciones de laboratorio, se considera que la germinación ha tenido lugar cuando se da la posterior rotura de las cubiertas seminales por la radícula, siguiendo un criterio fisiológico. En cambio, en condiciones de campo se espera que ocurra la emergencia y desarrollo de una planta normal, para que se considere que la germinación ha finalizado, siguiendo un criterio agronómico.

El test de emergencia de radícula o prueba de germinación fisiológica ofrece a los pequeños laboratorios la oportunidad de obtener información temprana acerca del recuento final de plántulas normales (Mavi *et al.*, 2016; citado en Ozden *et al.*, 2018). Ozden *et al.* (2018) sugiere que este test puede aplicarse a varias especies y puede ser investigado más en pruebas de rutina. Además, menciona que los métodos automáticos aplicados en el recuento de la emergencia de la radícula podrían facilitar los recuentos iniciales de emergencia de radícula, en lotes de semilla a gran escala.

### **2.3.1 Factores que intervienen en la germinación**

#### **a. Factores externos**

Se consideran como factores externos a la temperatura, el agua, el oxígeno y la luz, los cuales influyen directamente en la germinación de las semillas. La emergencia de la plántula está directamente influenciada por las características fisiológicas y bioquímicas propias de las semillas, así como también por el comportamiento de las semillas, ante condiciones externas y el grado de eficiencia de la utilización de sus reservas en el proceso de germinación (Peña-Valdivia *et al.* citados por Morales-Santos *et al.* 2017).

## **b. Factores internos**

Dentro de los factores internos se encuentra la madurez de la semilla se logra cuando esta ha alcanzado su completo desarrollo tanto morfológico como fisiológico. Se alcanza la madurez morfológica cuando las distintas estructuras de las semillas están completas y se culmina esta fase cuando el embrión ha obtenido su máximo desarrollo (Alzugaray, Carnevale, Salinas y Pioli, 2007; citado en Doria, 2010).

Asimismo de acuerdo a la viabilidad de las semillas, siendo el período en el cual estas van a conservar su capacidad para germinar. Este tiempo va ser variable y va depender del tipo de semilla que se trate y las condiciones de su almacenamiento. De acuerdo a la longevidad de las semillas, entendiéndose como el periodo en que las semillas van a permanecer aún viables, se pueden presentar semillas que germinen luego de decenas o centenas de años, con una cubierta seminal dura; esto se da por ejemplo en las leguminosas. Una semilla será catalogada como más longeva cuando su metabolismo sea menos activo. A su vez va desencadenar la producción de sustancias perjudiciales, que al almacenarse en las semillas producen efectos negativos en el embrión. Cuando se tiene bajas temperaturas se propicia a que el metabolismo sea más lento, ocasionando que las semillas almacenadas bajo esta condición, lleguen a vivir más tiempo, en comparación con haber sido sometidas a temperatura ambiente. Otra condición que permite que las semillas alarguen su vida es la deshidratación, en relación a que si se conservan a una humedad normal. Los valores por debajo del 2 al 5 por ciento en humedad van a implicar una alteración en el agua que forma parte de la semilla, siendo nocivo para esta (Alzugaray, Carnevale, Salinas y Pioli, 2007; citado en Doria, 2010).

### **2.3.2 Tipos de germinación**

Alzugaray, Carnevale, Salinas y Pioli, 2007; citado en Doria (2010), señala que las semillas de acuerdo a la ubicación de los cotiledones respecto a la superficie del sustrato pueden diferenciar su germinación, en epígea o hipógea.

- Epígea se presenta cuando los cotiledones van a emerger del suelo debido al crecimiento del hipocótilo (llamada así a la porción comprendida entre la radícula y el punto de inserción de los cotiledones). En los cotiledones se van a diferenciar los

cloroplastos, convirtiéndose en órganos fotosintéticos. Finalmente, comienza el desarrollo del epicótilo (es aquella porción del eje ubicada entre el punto de inserción de los cotiledones y las primeras hojas).

- Hipógea se presenta cuando los cotiledones permanecen enterrados, siendo la plúmula la única que atraviesa el suelo. El hipocótilo es muy corto, casi imperceptible. Luego, prosigue el alargamiento del epicótilo, emergiendo así las primeras hojas verdaderas, que van a ser los primeros órganos fotosintetizadores de la plántula.

### **2.3.3 Ensayo de germinación en el laboratorio**

#### **a. Plántulas normales**

Las plántulas normales muestran su potencial para desarrollarse en plantas de manera continua y satisfactoria, cuando se cultivan en suelos de buena calidad y bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y luz (ISTA, 2016a).

Para ser calificada como normal, una plántula debe cumplir con una de las siguientes categorías, según el ISTA (2016a):

- Plántulas intactas: aquellas con todas sus estructuras esenciales correctamente desarrolladas, completas, en proporción y saludables.
- Plántulas con defectos leves: aquellas que muestran ciertos defectos leves de sus estructuras esenciales, siempre que muestren un desarrollo equilibrado y satisfactorio, comparable al de las plántulas intactas de la misma prueba.
- Plántulas con infección secundaria: aquellas que pudieron ser clasificadas en una de las categorías anteriores, pero que se han visto afectadas por hongos o bacterias de fuentes distintas a la semilla original.

## **b. Plántulas anormales**

Según el ISTA (2016a), las plántulas anormales no muestran el potencial de convertirse en una planta normal, cuando se cultivan en suelos de buena calidad y en condiciones favorables de humedad, temperatura y luz. Las siguientes plántulas se clasifican como anormales:

- Dañadas: aquellas con alguna de las estructuras esenciales ausentes o tan graves e irreparablemente dañadas, que no pueden tener un desarrollo equilibrado.
- Deformadas o desequilibradas: aquellas con desarrollo débil o alteraciones fisiológicas, con estructuras esenciales deformadas o desproporcionadas.
- Descompuestas: aquellas con alguna de sus estructuras esenciales enfermas o descompuestas, como resultado de una infección primaria, la cual impide su desarrollo normal.

## **c. Unidades de semillas múltiples**

Según el ISTA (2016a), se pueden presentar varios tipos de unidades de semillas que generen más de una plántula, siendo las categorías:

- Unidades que contienen más de una semilla verdadera (por ejemplo, múltiples unidades de semilla en *Dactylis*, *Festuca*, *x Festulolium* y *Lolium*; esquizocarpos no separados de *Apiaceae*: racimos de *Beta vulgaris* y frutos de *Tectona grandis*).
- Semillas verdaderas que contienen más de un embrión. Esto puede ocurrir normalmente en ciertas especies que presentan poliembrionía o excepcionalmente en otras especies (gemelos). En este caso, con frecuencia una de las plántulas es débil o delgada, pero ocasionalmente ambas son de tamaño casi normal.
- Embriones fusionados. Ocasionalmente, dos plántulas fusionadas se producen a partir de una semilla.

Cuando una unidad produce más de una plántula, estas se evalúan por separado. Una plántula normal se considera suficiente para clasificar la unidad como normal. Si una unidad produce más de una plántula normal, solo se cuenta una para determinar el porcentaje de germinación.

#### **d. Semillas no germinadas**

Las semillas que no han germinado al final del ensayo, cuando han sido evaluadas bajo las condiciones dadas en los métodos específicos para cada especie, se clasifican según ISTA (2016a) como:

-Semillas duras: aquellas que permanecen duras al término del periodo de ensayo, porque no han absorbido agua, a razón de la impermeabilidad de la cubierta. La dureza es una forma de latencia.

-Semillas frescas o latentes: aquellas distintas de semillas duras, que no han germinado bajo las condiciones del ensayo de germinación, pero que permanecen sanas y firmes y presentan el potencial para convertirse en una plántula normal. Las semillas frescas pueden embeberse de agua cuando se les proporciona las condiciones establecidas, pero su proceso de germinación está obstruido.

-Semillas muertas: aquellas que al finalizar la prueba de ensayo no están ni duras ni frescas, ni han producido ninguna estructura de la plántula. Las semillas muertas normalmente están blandas, decoloradas, frecuentemente con mohos.

-Otras categorías: en algunas circunstancias o para determinados grupos de especies, semillas vacías y no germinadas podrían clasificarse en otras categorías, como:

\*Semillas vacías: aquellas que están completamente vacías o contienen solamente el tejido residual.

\* Semillas sin embrión: aquellas que presentan endospermo fresco o tejido gametofítico en el cual no poseen, aparentemente, cavidad embrional ni embrión.

\*Semillas dañadas por insectos: aquellas que contienen larvas, restos o excrementos de insectos o presentan otras evidencias de daños que afectan la capacidad de las semillas para germinar.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar**

La descripción morfológica de la semilla se realizó en el Laboratorio de Taxonomía y Anatomía Vegetal del Departamento Académico de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina ubicado en el distrito de La Molina, provincia y región Lima.

El ensayo de germinación se llevó a cabo en el Laboratorio Oficial de Análisis de Semillas del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) y la prueba de viabilidad se realizó en el Laboratorio de Semillas del Departamento Académico de Fitotecnia de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

#### **3.2 Materiales**

##### **3.2.1 Material biológico**

Se utilizaron semillas de *Minthostachys spicata* provenientes de plantas silvestres que habitan en las laderas de las parcelas destinadas al pastoreo de ganado, ubicadas en la provincia de Lima, Canta (Fig. 13 y 14). En un primer momento se estudió la fenología de la especie para conocer la época de floración, fructificación y dispersión de las semillas durante dos salidas de campo. La colecta de frutos se realizó en agosto del 2018.



**Figura 13: Zona de estudio, provincia de Canta, Lima**



**Figura 14: Planta de muña, *Minthostachys spicata***

### **3.2.2 Materiales y reactivos de laboratorio**

- Ácido giberélico (AG3)
- Agua destilada
- Azul de cresilo al 1%
- Bisturí

- Dos envases de 1L
- Cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio al 0.5%
- Estiletes
- Etiquetas
- Hojas de bisturí
- Lugol
- Papel toalla
- Papel milimetrado
- Picetas
- Pinzas
- Pipetas
- Placas Petri (24 unidades)
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Safranina
- 1410 semillas de muña *Minthostachys spicata*
- Sudan III
- 12 vasos de precipitado (beaker) 100ml

### **3.2.3 Equipos**

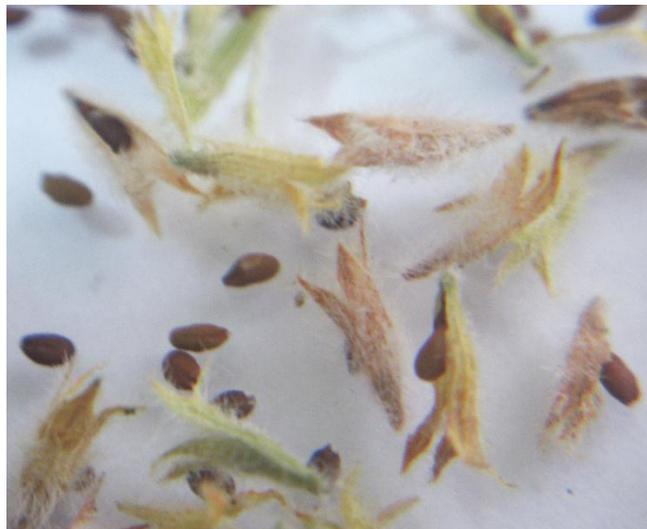
- Cámara germinadora 25°C ± 2° constante (Electrolab)
- Cámara digital (Canon Zoom Lens 5x IS)
- Microscopio estereoscópico Greenough (Leica S8 APO)
- Estéreo-microscopio Greenough compacto (ZEISS Stemi 305) con cámara Wi-Fi de 1.2 MPx conectada a un iPad
- Microscopio estereoscópico LW Scientific

- Lector de temperatura y luz (Mini Environmental Quality Meter SPER SCIENTIFIC 850070)
- Microscopio binocular compuesto (MICROS Petunia MCX50)

### 3.3 Método de extracción de la semilla

Los frutos que encierran a las semillas de *Minthostachys spicata* se pudieron extraer con la ayuda de un microscopio estereoscópico LW Scientific, estiletes y pinzas para facilitar la visualización y el manejo de las diminutas núculas maduras y así lograr su pronta separación del receptáculo floral persistente. Según Tello (2011), dentro del género *Minthostachys* los frutos persisten adheridos por el tálamo o receptáculo (Fig. 15).

Luego se almacenaron en un recipiente de vidrio a temperatura de 4°C aproximadamente en una refrigeradora hasta el momento en que se diera inicio a los ensayos.



**Figura 15: Frutos extraídos y frutos adheridos al tálamo de muña**  
*Minthostachys spicata*

### 3.4 Caracterización morfo-anatómica de la semilla y fruto

Se utilizaron 180 frutos o unidades de diseminación, de los cuales 10 se destinaron para realizar las mediciones propiamente dichas: ancho y largo, aproximadamente 30 para realizar la reacción de mixocarpia, 50 para describir la morfología de la estructura interna de

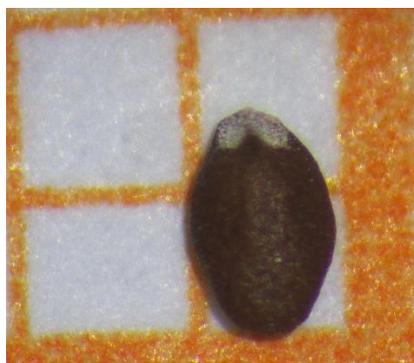
la semilla, 60 para evaluar la composición química del endospermo y 30 para la descripción morfológica del proceso de germinación.

### 3.4.1 Características externas

#### a) Fruto

Se evaluaron 10 frutos con el fin de estudiar las características morfo-métricas, se midió el largo y el ancho del fruto de la vista dorsal, siendo el ancho medido en la porción céntrica más ancha de este, con papel milimetrado, expresado en milímetros (Fig. 16).

También se empleó estéreo-microscopio Stemi 305 y pinzas para la visualización de las dimensiones y otras características como forma, color, superficie del epicarpo, características del pericarpo, el hilio cárpico (presencia de ceras).



**Figura 16: Semilla de *Minthostachys spicata* en papel milimetrado**

#### b) Reacción de mixocarpia

Se estudiaron aproximadamente 30 frutos para evidenciar la producción de mucílagos en contacto con el agua, según la siguiente metodología propuesta por Bonzani *et al.* (2011), citado en Scandaliaris (2017).

Los frutos fueron sumergidos en agua destilada por 24 horas, cabe mencionar que el tiempo máximo que indican los autores Bonzani *et al.*, (2011), citado en Scandaliaris (2017), fue de 72 horas, luego se produjo la tinción con azul de cresilo al 1% y se evaluó con la ayuda de un microscopio compuesto MICROS.

La reacción se calificó según el tamaño del halo de mucílago, se consideró fuerte cuando el halo era mayor a 0.5 mm, moderadamente fuerte cuando el halo se encontraba entre 0.1- 0.5 mm, débil cuando era menor a 0.1 mm y muy débil cuando era menor a 0.05 mm, asimismo si se encontraba el mucílago expuesto o no; siendo este encerrado dentro de las células mucilaginosas (Bonzani *et al.*, citados por Scandaliaris 2017).

Se midió el halo de mucílago producido con una cámara Canon Zoom Lens 5x IS.

### 3.4.2 Anatomía interna de la semilla

Se realizó el estudio de la estructura interna con 50 semillas que fueron remojadas en agua por 24 horas, por la dureza de la testa. Luego se procedió a separar el episperma a partir de cortes longitudinales y transversales realizados con la ayuda del bisturí, pinzas y el colorante de safranina expuesto al estéreo-microscopio Stemi 305 con iPad para identificar la forma, color, posición de los cotiledones, el eje embrionario y partes de la semilla (Fig. 17). Asimismo, se tuvo como referencia la estructura del tejido de las semillas de romero (Fig. 7) y lavanda (Fig. 10) y el tamaño de las mismas (Fig. 9 y 12).

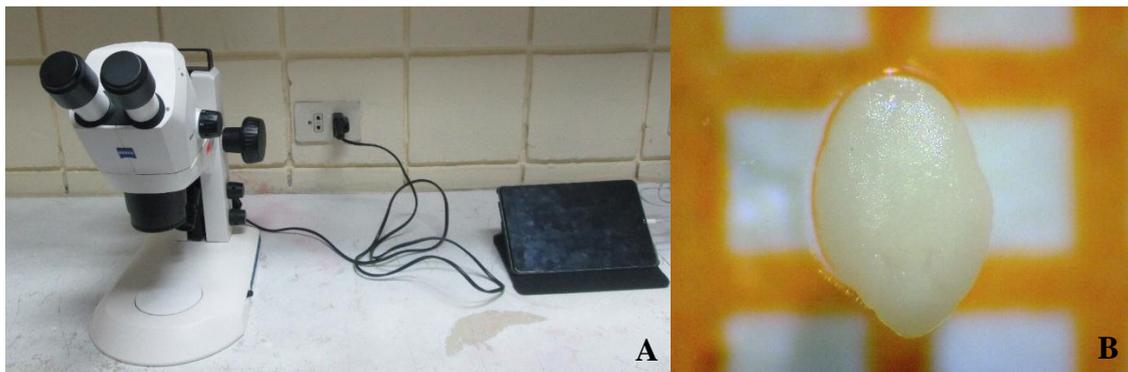


Figura 17: A. Estéreo-microscopio Stemi 305 con iPad. B. Embrión de *Minthostachys spicata*

### 3.4.3 Estudio histoquímico

Se utilizó un promedio de 60 semillas, para determinar la composición química del endospermo, realizando cortes transversales a las semillas sin cubierta seminal (episperma) y se llevaron a cabo tinciones específicas.

- a. Para reconocer la presencia de lípidos se aplicó Sudan III a las semillas por un rango de 10 minutos, luego se lavaron con agua destilada para que se impregne el reactivo dentro de la estructura.

Siendo la reacción positiva cuando se torna de una coloración rojo-anaranjado.

- b. Para detectar la presencia de almidones se utilizó lugol, colocando entre 4-5 gotas del reactivo en las semillas.

La reacción resulta positiva cuando la tinción es de color azul y negativa cuando es de color marrón.

Las observaciones se hicieron con un estéreo-microscopio Stemi 305 con cámara incorporada de 1.2 MPx.

### **3.5 Procedimiento del ensayo de germinación**

La prueba de germinación se realizó con 1200 semillas (y un examen preliminar con 60 semillas para observar los efectos del fungicida con ingrediente activo y concentración de 50% Thiophanate methyl + 30% Thiram en polvo mojable (WP) en la germinación a nivel del laboratorio). Las semillas fueron recolectadas de la provincia de Canta, distribuidas al azar en placas Petri, colocando 50 semillas por repetición conformando 6 tratamientos con 4 repeticiones. Las semillas estuvieron sobre el papel (TP), como indica el ISTA (2016a) a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$  de temperatura constante y fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad dentro de la cámara de germinación (Fig. 18).

- a. Se procedió a preparar una solución de 5ppm de AG3 disolviendo 5 mg de IA de AG3 en 1 litro de agua destilada. Y de la misma manera se preparó una solución de 7ppm de ácido giberélico (AG3).
- b. Se ubicó el papel sobre la superficie de la parte inferior de las placas Petri y se aplicaron las concentraciones de AG3 de 0, 5ppm y 7 ppm, según el tratamiento, luego se sembraron las 50 semillas.
- c. Después se aplicaron los factores de luz fluorescente y oscuridad, para lo cual se forraron 12 placas Petri con papel aluminio para asemejar condiciones de oscuridad y las 12 placas restantes se mantuvieron con luz fluorescente.

- d. Las placas Petri fueron llevadas al germinador y luego se procedió a la evaluación de las plántulas normales y anormales, las semillas frescas, y muertas de acuerdo a las normas ISTA (2016a) para una especie perteneciente a la familia *Lamiaceae*.

Los riegos fueron diarios, aplicando aproximadamente 1.5 ml de agua destilada en cada placa Petri con 50 semillas.



**Figura 18: Cámara de germinación 25°C ± 2° constante**

- e. Evaluación:

En el ensayo de germinación se realizaron dos conteos, el primero al octavo día y el conteo final se propuso en el día 21, teniendo como referencia el Tabla 3 (ISTA, 2016a). Sin embargo, durante el experimento se presentó una alta velocidad de germinación, por lo cual el conteo final se adelantó al día 11.

**Tabla 3: Métodos detallados para las pruebas de germinación en especies pertenecientes a la familia *Lamiaceae***

<b>Especie</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Primer conteo</b>	<b>Conteo final</b>	<b>Recomendaciones para romper la latencia</b>
<i>Melissa officinalis</i>	TP	20↔30, 20	4-7	21	Pre enfriamiento
<i>Mentha x piperita</i>	TP	20↔30	7-14	21	KNO <sub>3</sub> ; Pre enfriamiento
<i>Rosmarinus officinalis</i>	TP	20↔30, 20	7	28	-

FUENTE: ISTA (2016a)

**TP:** Sobre papel

**20↔30:** 20°C por 16 horas y 30°C por 8 horas

Las plántulas fueron evaluadas con la ayuda de un microscopio estereoscópico Leica, siguiendo la clasificación de plántulas normales y anormales, semillas frescas, y muertas, obteniéndose un porcentaje total de 100. Además, se consideraron las características particulares de las plántulas pertenecientes al Grupo A 2.1.1.1. en condiciones de laboratorio (ISTA, 2006).

El porcentaje de plántulas normales se redondeó al número entero más próximo y en el caso que se encontró decimales iguales, se dio el orden de prioridad de plántulas anormales, semillas duras, frescas y muertas.

Para la evaluación de la germinación fisiológica se realizó un conteo diario de semillas germinadas (con emergencia de la radícula), el parámetro utilizado para considerarse como germinadas fue el mismo que se utiliza para pruebas de germinación de alfalfa; 2mm de longitud de radícula, de acuerdo a Gallo *et al.* (2017), debido a que la muña se encuentra en la misma categoría de desarrollo de plántulas (Grupo 2.1.1.1.) con relación al cultivo de alfalfa, perteneciente al género *Medicago*.

La velocidad de germinación fue observada a partir del día 3 después de la instalación del ensayo hasta el día 15, siendo el día 11, el último día que terminó el crecimiento.

### 3.6 Variables evaluadas

**3.6.1 Porcentaje de plántulas normales (PPN):** El número de plántulas normales en relación al número total de semillas utilizadas en la repetición por cien. Se utilizaron los criterios de ISTA (2016).

$$\text{PPN} = P_n/N \times 100$$

Donde:

$P_n$  = Número de plántulas normales

$N$  = Número de total de semillas por repetición

**3.6.2 Porcentaje de semillas no germinadas (SNG):** El número de semillas no germinadas (frescas y muertas) en relación al número total de semillas en la repetición por cien. Se utilizaron los criterios de ISTA (2016).

$$\text{SNG} = N_g/N \times 100$$

Donde:

$N_g$  = Número de semillas no germinadas (frescas y muertas)

$N$  = Número de total de semillas por repetición

**3.6.3 Porcentaje de germinación fisiológica (PGF):** El número de semillas germinadas (emergencia de radícula) en relación al número total de semillas en la repetición por cien. Según Mavi *et al.*, (2016), citado en Ozden *et al.* (2018).

$$\text{PGF} = [G_n/N_n] \times 100$$

Donde:

$G_n$  = Número de semillas germinadas

$N_n$  = Número de total de semillas por repetición

**3.6.4 Velocidad de germinación:** Se calculó por medio del índice de velocidad de germinación (IVG).

$$IVG = \sum (n_i/t_i)$$

Donde:

$n_i$ = número de semillas germinadas en el  $i$ -ésimo día.

$t_i$ = tiempo en días.

### 3.7 Procedimiento del ensayo de tetrazolio

Se encontraron 6 semillas frescas en las pruebas de germinación, las cuales fueron evaluadas mediante la prueba de tetrazolio para distinguir las semillas latentes de las muertas. La metodología seguida fue la propuesta por ISTA (2016b), se tomó como referencia los pasos de la preparación y ejemplos de semillas no viables para romero (Fig. 8) y lavanda (Fig. 11).

- a. Como las semillas se encontraban húmedas luego del ensayo de germinación, no fue necesario humedecerlas. A continuación se colocaron las semillas en beakers de 100 ml y se rotularon los vasos precipitados, según el tratamiento al que pertenecían (Fig. 19).
- b. Luego se realizaron ligeros cortes longitudinales para facilitar el ingreso de la sal de trifenil tetrazolio al tejido, sin dañar el embrión.
- c. Las semillas se sumergieron en la solución de tetrazolio, la cual permaneció en oscuridad para evitar que se reduzca, colocando los vasos precipitados en un espacio cerrado para que no reciba directamente la luz.
- d. Se colocaron en oscuridad por un rango de 16 horas, de acuerdo a lo que indica el ISTA (2016) para el género *Lavandula* de la familia Lamiaceae (Tabla 2).



**Figura 19: Vasos precipitados con semillas frescas de *Minthostachys spicata***

e. Evaluación:

Transcurrido el tiempo de exposición al reactivo, las semillas se lavaron, manteniéndolas húmedas. Se procedió a realizar cortes transversales con bisturí y pinza bajo microscopio estereoscópico LW Scientific con el fin de evaluar el patrón de tinción (Fig. 20).

Se comenzó por analizar individualmente cada semilla, observando el patrón de tinción y la intensidad de la coloración del embrión, después se clasificaron como viable o no viable (Ruiz, 2009).

Además se identificó el grado de daño de la semilla.



**Figura 20: Semilla de *Minthostachys spicata* luego de la tinción con la sal de tetrazolio**

### **3.8 Diseño experimental**

#### **3.8.1 Prueba de germinación**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con dos factores, dos niveles para el primer factor y tres niveles para el segundo factor, los cuales fueron los siguientes:

Factor A: Luz

a1: luz fluorescente

a2: oscuridad

Factor B: Concentración de ácido giberélico

b1:0ppm

b2:5ppm

b3:7ppm

El ensayo tuvo seis tratamientos, 4 repeticiones por tratamiento y 50 semillas colocadas en placas Petri por repetición.

T1: Semillas de muña en luz fluorescente.

T2: Semillas de muña en luz fluorescente con 5ppm de AG3.

T3: Semillas de muña en luz fluorescente con 7ppm de AG3.

T4: Semillas de muña en oscuridad.

T5: Semillas de muña en oscuridad con 5ppm de AG3.

T6: Semillas de muña en oscuridad con 7ppm de AG3.

### **3.9 Análisis de varianza**

El análisis de varianza se realizó considerando un nivel de significancia del 5%, siendo el modelo aditivo lineal del arreglo factorial 2x3 en DCA el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

i=1, 2 niveles de luz

$j=1, 2, 3$  niveles de concentración de AG3

$k= 1, 2, 3, 4$  repeticiones

Donde:

$Y_{ijk}$  = Variable respuesta que se obtiene de la unidad experimental que recibió el  $i$ -ésimo nivel de luz,  $j$ -ésimo nivel de concentración de AG3,  $k$ -ésima repetición.

$\mu$  = Efecto de la media general de la variable respuesta.

$\alpha_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo nivel de luz.

$\beta_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo nivel de concentración de AG3.

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción en el  $i$ -ésimo nivel de luz,  $j$ -ésimo nivel de concentración de AG3.

$\mu_{ij}$  = Efecto de la media de la combinación (tratamiento)  $ij$ .

$\epsilon_{ijk}$  = Efecto del error experimental en el  $i$ -ésimo nivel de luz,  $j$ -ésimo nivel de concentración de AG3,  $k$ -ésima repetición.

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa R versión 3.4.2.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Descripción morfológica de *Minthostachys spicata*, Muña

La flor de *Minthostachys spicata* presenta el cáliz bilabiado, sépalos fusionados formando un tubo, la corola bilabiada, pubescente en la cara interior y en el dorso de los labios, el labio superior tiene dos lóbulos y el inferior 3 lóbulos. De acuerdo a Salamanca, (1986) citado en Campillo (2003), afirma que el gineceo de *Minthostachys spp*, está compuesto por 4 lóbulos, y su semilla es de 0.5 a 1mm de longitud, en la especie *Minthostachys spicata* se observó 5 lóbulos en cada flor, además la semilla fue ligeramente más grande, 1.4 mm en promedio.

El androceo tiene 4 estambres didínamos soldados a la corola, anteras usualmente con dos tecas. El gineceo tiene ovario súpero, bicarpelar y tetralocular, en cada lóculo contiene un óvulo, el estilo es ginobásico y el estigma bífido. El fruto es un tetraquenio acompañado por el cáliz persistente. Tello (2011), afirma que en el género *Minthostachys*, el cáliz persiste en la planta acompañado al fruto que en la madurez es dispersado por el viento (anemocoria) y puede adherirse a la ropa de personas (epiantropocoria).

El fruto en la madurez se separa en 4 núculas, se caracteriza por poseer un fruto tipo esquizocarpo, se observó que de las 4 mericarpos o núculas solo maduran 1-2 y en pocos casos se vio 3 por fruto. Según Tello (2011), de las especies evaluadas de *Minthostachys sp*, *mollis*, *spicata* presentaron una clusa refiriéndose a cada mericarpo, como mínimo de las cuatro a formarse. Y de acuerdo a su ubicación los frutos presentan una cara convexa y una cara casi plana. Las semillas están provistas de escaso endospermo (Fig. 21).



**Figura 21: *Minthostachys spicata*. A. Inflorescencia, B. Flor, C. y D. Frutos inmaduros, E. Fruto maduro**

#### **4.1.1. El fruto**

El fruto o unidad de diseminación es una núcula. La núcula o mericarpo está formada solo por medio carpelo y encierra a la semilla. Esta presenta tres partes: epicarpo, mesocarpo y endocarpo. De acuerdo a la descripción de Ryding (2010) en cuanto a la estructura del pericarpo se define 4 regiones: exocarpo (epidermis externa), mesocarpo, región de esclerénquima y endocarpo (epidermis interna) señalando que en ocasiones se observa vasos solitarios o pequeños haces vasculares entre el mesocarpo y la región de esclerénquima.

Para la caracterización morfológica de la núcula se utilizó un microscopio estereoscópico con zoom 1x a 4x y un microscopio compuesto con objetivos 4x, 10x, 40x y 100x.

##### **a. Características de los frutos**

###### **- Forma**

La núcula es elipsoidea, presentando dos vistas: dorsal y ventral. Externamente presenta dos depresiones, cubiertas de ceras blanquecinas (Fig. 22).



**Figura 22: Frutos de *Minthostachys spicata*. a. vista dorsal, dos depresiones con ceras blanquecinas (d), b. vista ventral**

**- Tamaño**

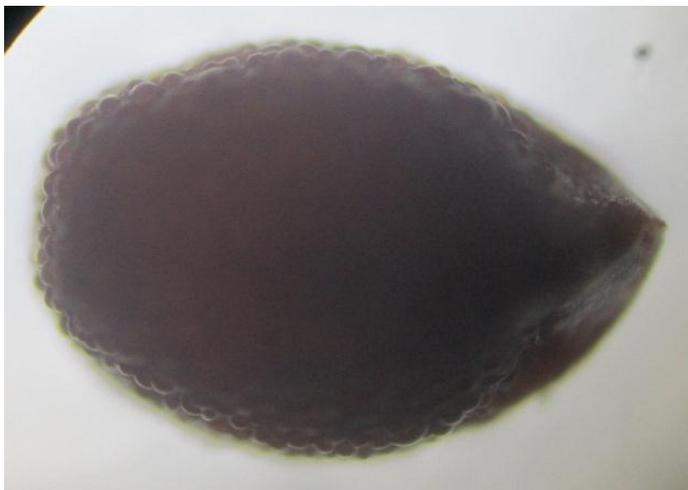
Para obtener el tamaño de la núcula, se midieron 10 núculas y el promedio fue de 1.4mm x 0.96mm. Se midió el largo y el ancho de la cara más plana (ventral). Ver Anexo 2.

**- Color**

Los frutos presentan una coloración uniforme desde marrón claro a marrón oscuro.

**- Superficie**

El epicarpo es reticulado poco profundo (Tello, 2011) (Fig. 23).



**Figura 23: Superficie del epicarpo de *Minthostachys spicata*, observación al microscopio compuesto, 100x**

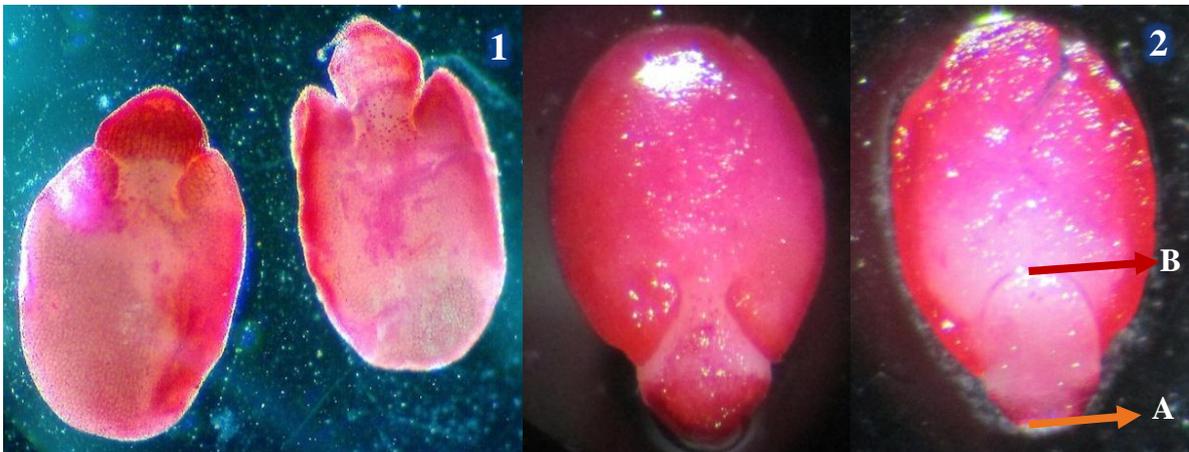
#### 4.1.2. Descripción de la semilla

La semilla de *Minthostachys spicata* es completa consta de episperma, endospermo y embrión (Fig. 24, 25 y 26).

##### a. Forma

La semilla es ovoide, el embrión tiene posición axial, pues se ubica en el eje central de la semilla, además es foliada, pues los cotiledones están expandidos y finalmente pertenecen a la subcategoría de inversos (Martin, 1946) (Fig. 24).

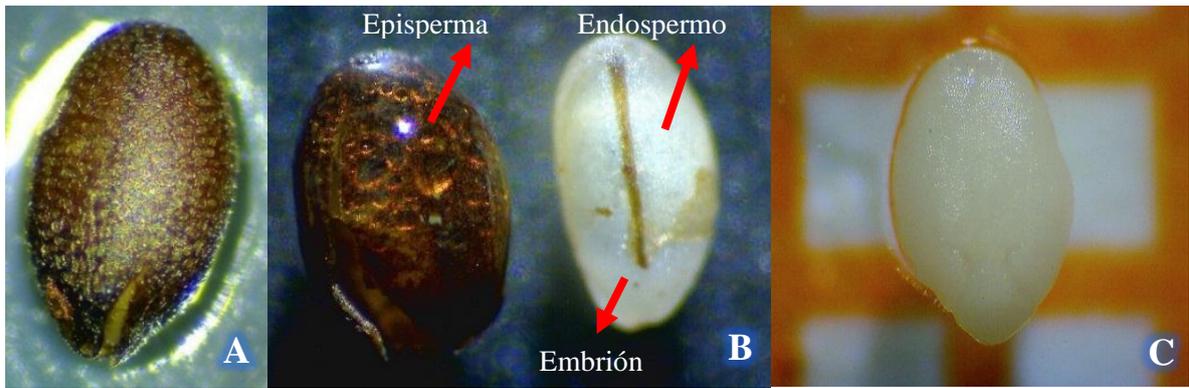
Además Martin (1946), menciona que se caracterizan por tener cotiledones gruesos, que se superponen y encierran un pequeño hipocótilo al menos la mitad del embrión. Endospermo limitado o está muy reducido, estas características coinciden con lo observado en las muestras (Fig. 25).



**Figura 24:** *Minthostachys spicata*. 1. Posición del embrión axial, 2. Embriones con cotiledones gruesos, (A) Radícula, (B) Plúmula

##### b. Color

Cuando se retira el episperma la semilla poseen una coloración blanquecina, al igual que el embrión, este además se encuentra cubierto por una fina capa (endospermo) (Fig. 25).



**Figura 25:** *Minthostachys spicata*. A. Semilla con episperma, B. Semilla sin episperma (partes de la semilla), C. Embrión

### c. Endospermo

Según Wunderlich, (1967), citado en Cantino y Sanders (1986), 41 géneros de los 42 géneros estudiados de la subfamilia Nepetoideae tienen semillas exalbuminosas, a excepción del género *Bystropogon*, el cual posee una pequeña cantidad de endospermo, sin embargo en *Minthostachys spicata* se ha observado una capa de tejido débilmente desarrollado que podría ser considerado como endospermo. El endospermo es fino, se mantiene adherido al episperma (Fig. 26). La naturaleza del endospermo fue verificada a través de dos reacciones químicas, una con SUDAN III y otra con Lugol.

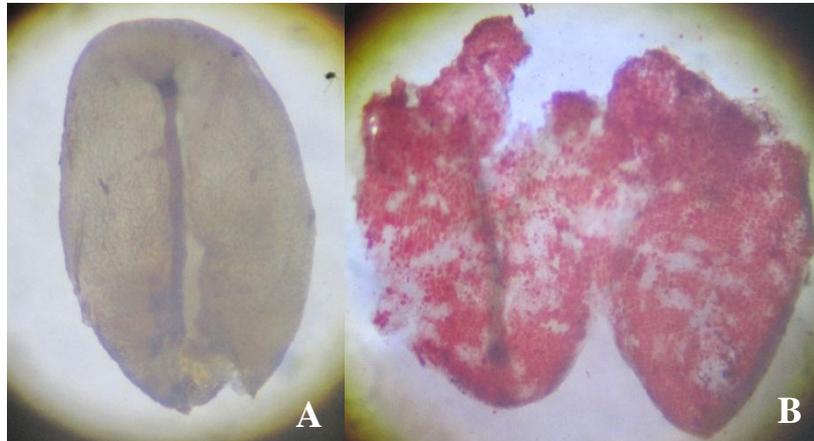


**Figura 26:** A. Corte longitudinal de la semilla. B. Corte transversal con cotiledones C. Con el endospermo

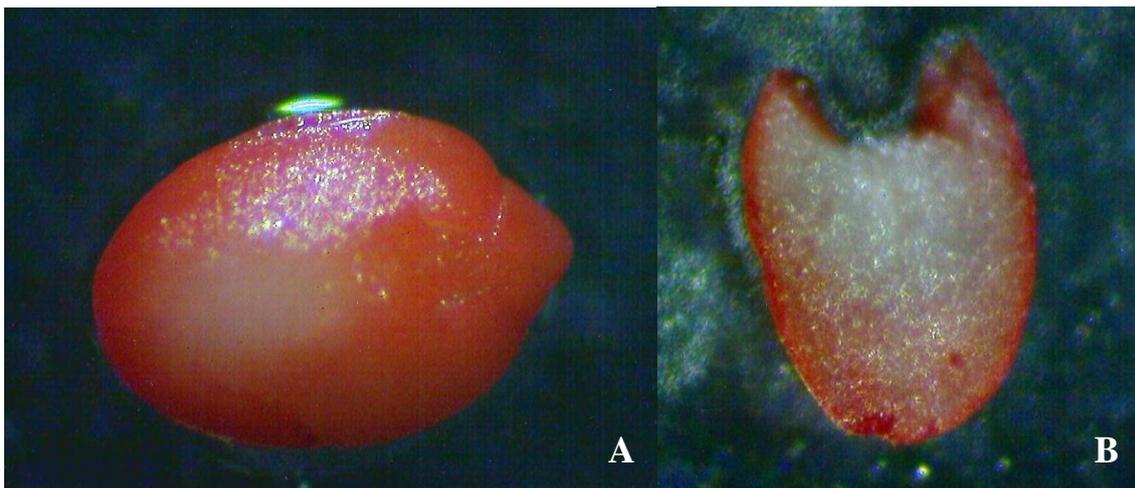
### 4.1.3 Evaluación del endospermo

#### a. Con Sudan III

En la prueba con Sudan III se obtuvo una reacción positiva, tiñéndose de rojo-anaranjado, evidenciando la presencia de grasas en el endospermo de la semilla (Fig. 27 y 28).



**Figura 27: A. Endospermo sin coloración. B. Endospermo con coloración, rojo-anaranjado, reacción con Sudan III, microfotografía con estereoscopio 20X**



**Figura 28: Tinción con Sudan III, A. Vista dorsal, B. Se observa por transparencia los cotiledones**

## b. Con Lugol

La reacción fue negativa, obteniéndose una coloración amarilla del endospermo, con lo cual se descarta la presencia de almidones en el endospermo de la semilla (Fig. 29).

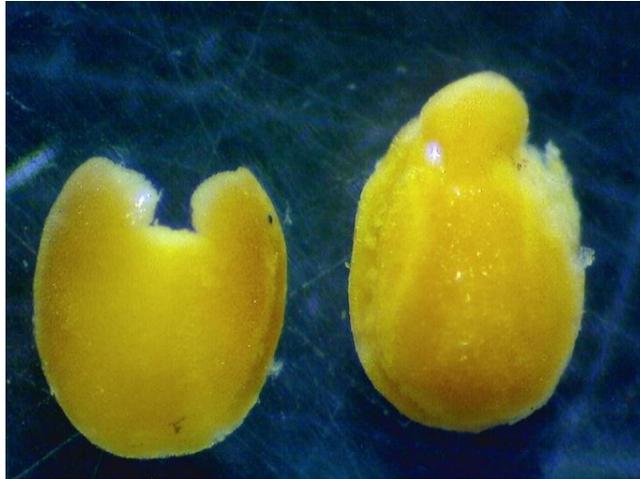
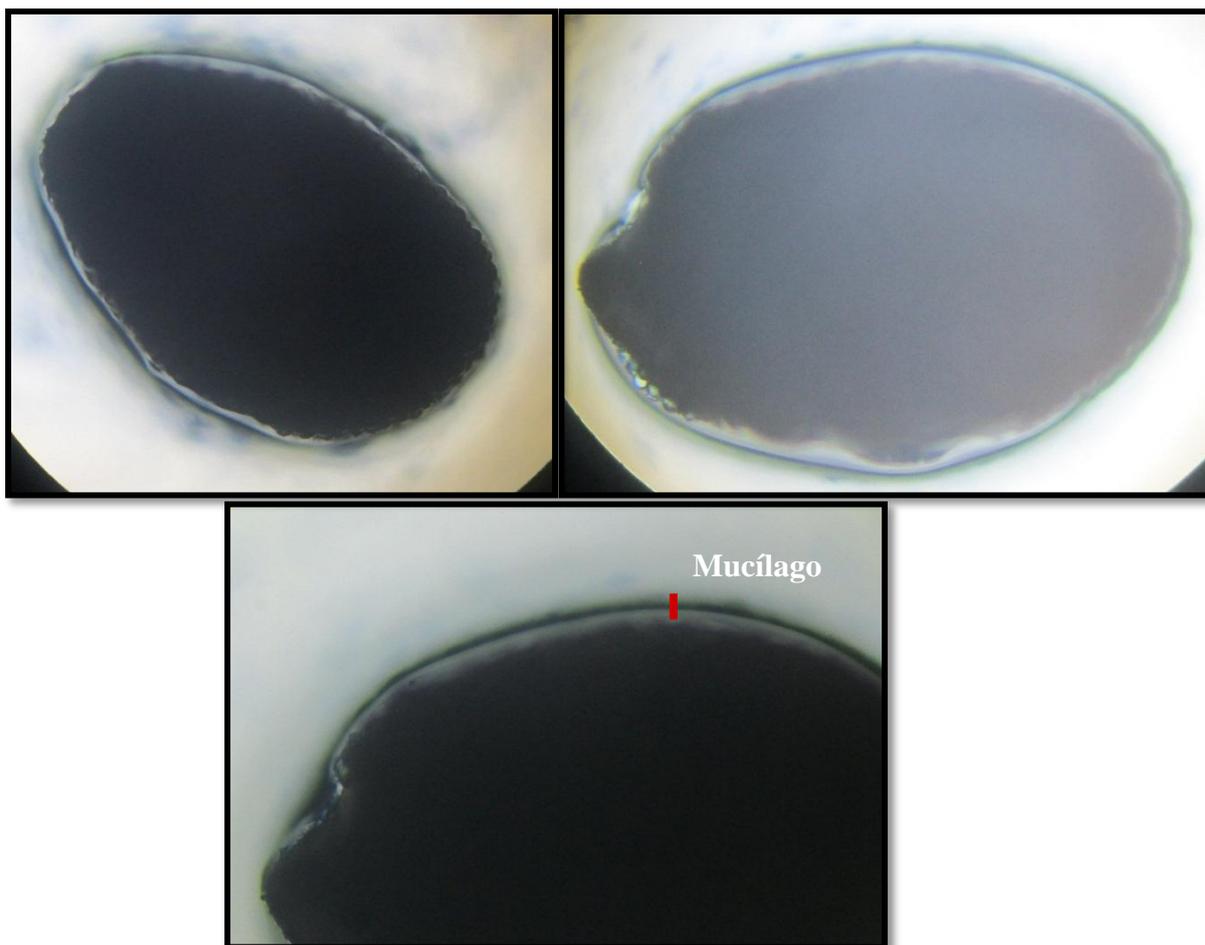


Figura 29: Tinción negativa para almidón

### 4.1.4 Mixocarpia

La reacción de mixocarpia, basada en los parámetros de Duletiæ-Lauseviae y Marin, (1999), citado en Bonzani *et al.* (2011), se manifestó como débil (menor a 0,1 mm), siendo la capa de mucílago transparente, continua, recubriendo todo el epicarpo de la núcula (Fig. 30). Este resultado coincide con la investigación realizada por Ryding (1992), en la especie *Minthostachys tomentosa* (Benth.) Epling obtuvo una reacción de mixocarpia débil (células mucilaginosas menores a 0.1 mm de longitud luego de ser hidratadas), por otro lado Fernandez *et al.* (2009), afirma que dentro de los géneros puede existir variabilidad en cuanto a la presencia de mucílago como señala para los géneros *Hyssopus*, *Mentha* y *Satureja*.



**Figura 30: Reacción de mixocarpia en frutos de *Minthostachys spicata*, a partir de un microscopio compuesto de 100x**

#### **4.1.5 Examen preliminar**

Se instaló el ensayo preliminar el 16 de octubre del 2018.

Se realizó un ensayo preliminar de germinación con 6 placas Petri las cuales contenían 10 semillas de muña (*Minthostachys spicata*) cada una, siendo un total de 60 semillas empleadas para evaluar la germinación con la previa aplicación del fungicida con ingrediente activo y concentración de 50% Thiophanate methyl + 30% Thiram en polvo mojable (WP) directamente a las semillas.

Las semillas fueron dispuestas en los siguientes tratamientos:

T1: Semillas sin AG3 con fungicida
T2: Semillas con 5ppm de AG3 con fungicida
T3: Semillas con 7ppm de AG3 con fungicida
T4: Semillas sin AG3 sin fungicida
T5: Semillas con 5ppm de AG3 sin fungicida
T6: Semillas con 7ppm de AG3 sin fungicida

Se midió la intensidad de luz en grados Lux, siendo 281.5 lx para luz proveniente del fluorescente, la luz difusa fue 927 lx además se tomaron datos de la temperatura (°C) 27.2 y humedad relativa (HR%) 54.73 durante el mes de diciembre del 2018.

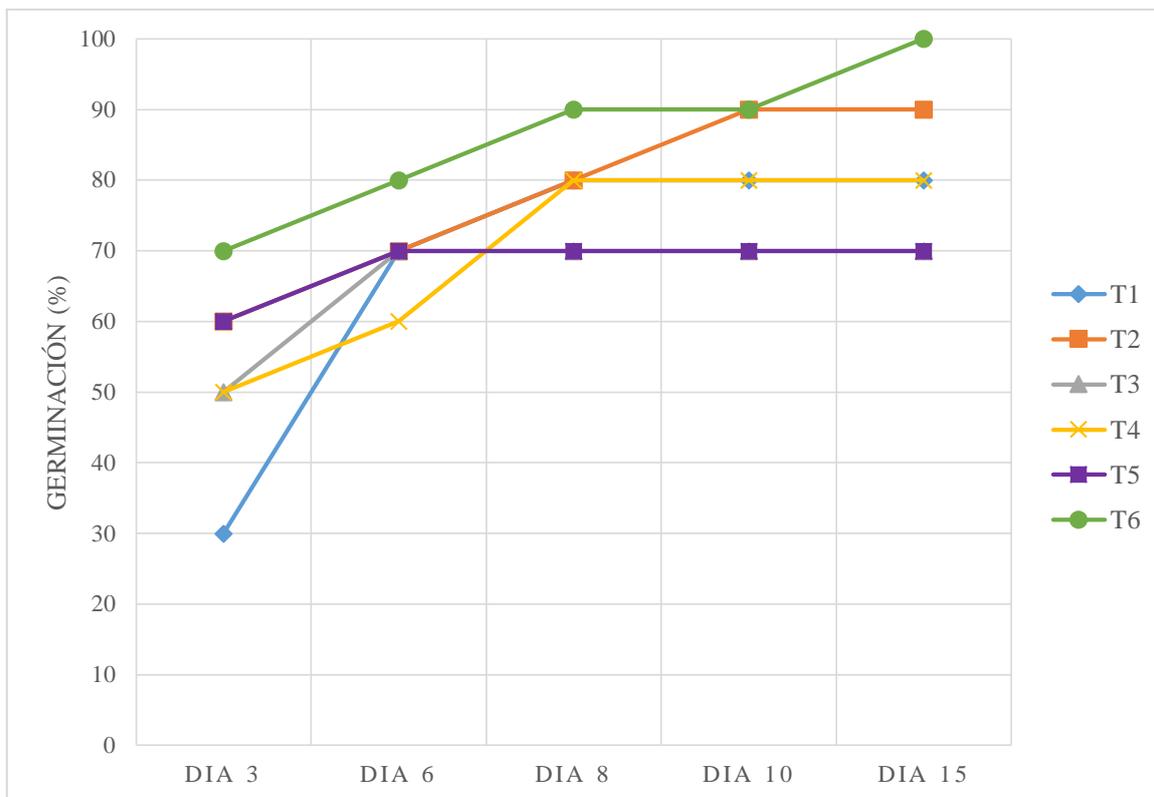
Las plántulas que recibieron la dosis de fungicida presentaron anomalías, como plántulas muy pequeñas y necrosis en la parte apical de la radícula.

Además se observó clorosis para aquellas semillas expuestas a dosis de AG3.

**Tabla 4: Examen preliminar de germinación por tratamiento**

Día/ Tratamiento	3	6	8	10	15
T1(Sin AG3 con fungicida)	30	70	80	80	80
T2(5ppm AG3 con fungicida)	60	70	80	90	90
T3(7ppm AG3 con fungicida)	50	70	70	70	70
T4(Sin AG3 sin fungicida)	50	60	80	80	80
T5(5ppm AG3 sin fungicida)	60	70	70	70	70
T6(7ppm AG3 sin fungicida)	70	80	90	90	100

FUENTE: Elaboración propia.



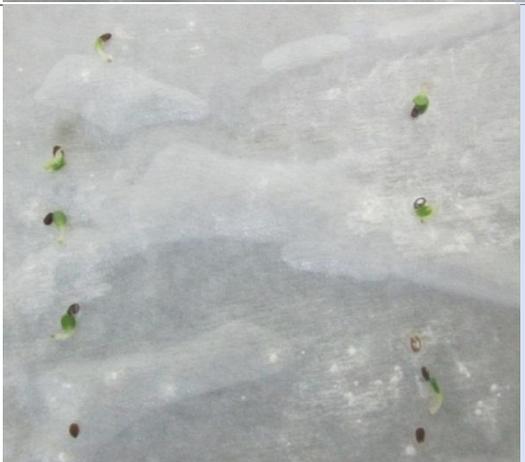
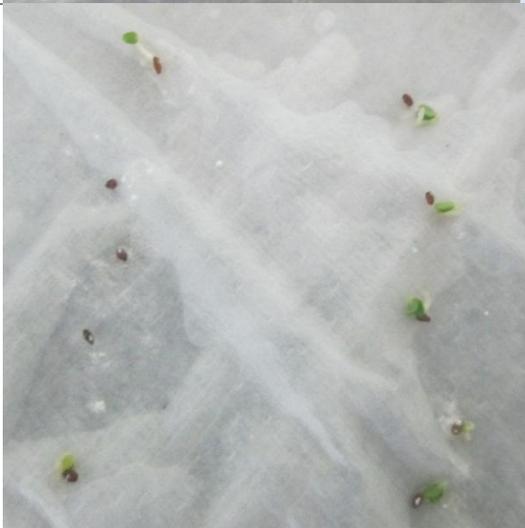
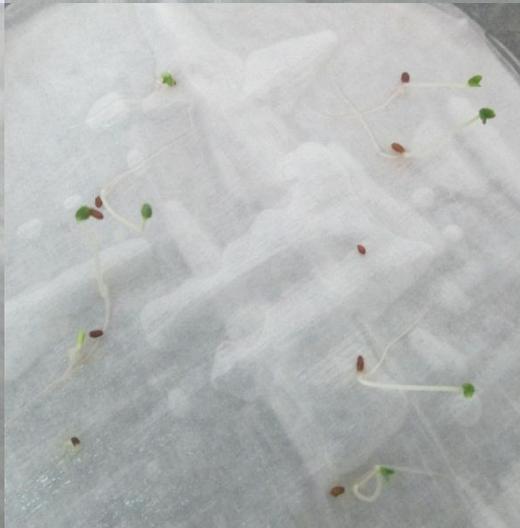
**Figura 31: Germinación del examen preliminar de muña con fungicida y AG3**

En el examen preliminar se observó que en el día 3 después de la siembra se dio el inicio de la emergencia de la radícula, teniendo como parámetro  $\geq 1\text{mm}$  de longitud, en los tratamientos 5 y 6 presentaron mayor longitud de radícula. Luego a partir del día 6 después de la siembra, las semillas que recibieron el fungicida y dosis de AG3 de 0ppm (T1), 5ppm (T2) y 7ppm (T3) presentaron alteraciones en su desarrollo, como necrosis en la porción apical de la radícula de la plántula, acortamiento del tamaño de las hojas cotiledonales y engrosamiento de las mismas, con una coloración verde claro, amarillento, las plántulas fueron pequeñas. (Fig. 32 y Tabla 6). En cambio, en los tratamientos que no recibieron fungicida y dosis de AG3 de 0ppm (T4), 5ppm (T5), 7ppm (T6), se visualizó un crecimiento normal de las plántulas. En el día 15 el tratamiento que solo recibió el ácido giberélico 7ppm (T6) las plántulas lograron un mayor porcentaje de germinación (100%). El menor porcentaje de germinación fue para el tratamiento con fungicida y dosis de AG3 de 7ppm y para el tratamiento sin fungicida y dosis de AG3 de 5ppm (Fig. 31 y Tabla 4).



**Figura 32: Anomalías de las plántulas con fungicida**

Tabla 5: Tratamientos del ensayo preliminar en el día 6 (22/10/2018) después de la siembra

		Aplicación	
AG3	Con fungicida	Sin fungicida	
0ppm			
5ppm			
7ppm			

FUENTE: Elaboración propia.

## 4.2. Ensayo de germinación de *Minthostachys spicata*

### 4.2.1. Proceso de germinación

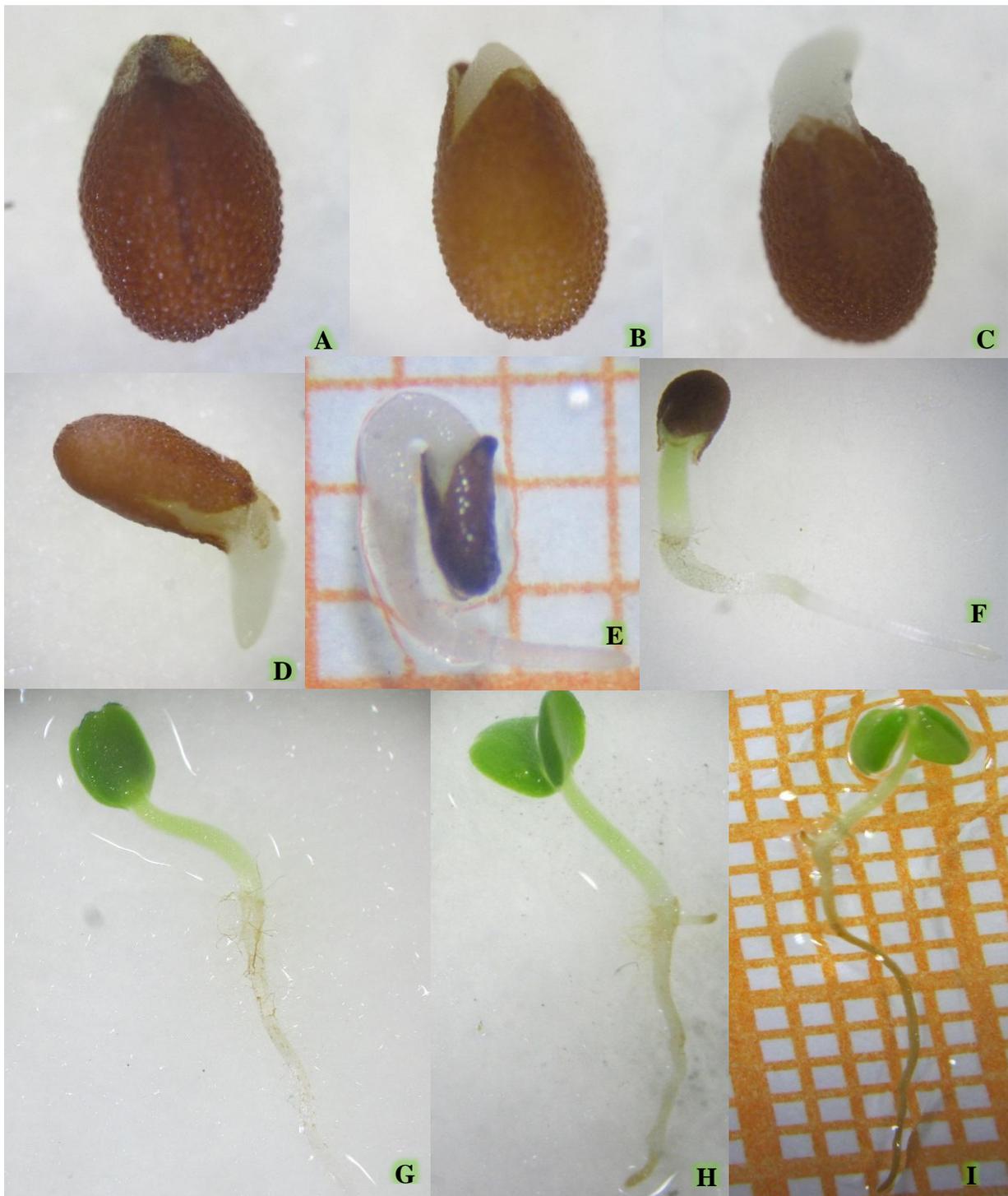


Figura 33: Proceso de germinación de *Minthostachys spicata* A) día 1, semilla embebida y B) día 2, semilla con ruptura de la cubierta seminal, C) día 3, semilla con ligero desarrollo de la radícula D) día 4, emergencia de la radícula, E) elongación de la raíz primaria, F) desarrollo de pelos absorbentes, G) día 9, separación de la testa y salida de hojas cotiledonales, H) día 11, plántula con raíz secundaria, I) plántula completa

La etapa de imbibición se inicia con el ingreso del agua a la semilla desde el medio exterior, luego se produce la hidratación de los tejidos con una duración que varía según la especie a evaluar. En el caso de las leguminosas, la entrada del agua se encuentra dificultada por las cubiertas seminales, por lo que se suele alterar por medio mecánico; sin embargo, la entrada del agua para el *Apium graveolens* se da en los primeros 30 minutos. Cuando se logra que la semilla se encuentre hidratada se produce la activación de una serie de procesos metabólicos que son vitales para las siguientes etapas de la germinación (Pérez y Pita, 1998).

La etapa de hidratación en *Minthostachys spicata* se dio en los primeros 3 días, se observó la ruptura de la cubierta seminal y el inicio de la emergencia de la radícula, el cual aún no alcanzaba el criterio de 2mm de longitud para ser considerada como emergida (Fig. 33 A, B y C). En los días 3 y 4 se produjo el inicio de la emergencia de la radícula (Fig. 33 D). En el día 7, la raíz primaria alcanzó una longitud de 5mm (Fig. 33 E), posteriormente a este suceso se desarrollaron los pelos absorbentes de la raíz en el día 8 (Fig. 33 F), donde se visualizó un epicótilo verde, fotosintéticamente activo.

La emergencia de las primeras hojas cotiledonales u hojas verdaderas, se produjeron aproximadamente a los 7 hasta los 12 días después de la siembra. A partir del día 9 se presentaron gran número de plántulas completas con presencia de raíces secundarias (Fig. 33 I).

De acuerdo a ISTA (2016), el porcentaje de germinación se expresa como el porcentaje de plántulas normales, el cual se planificó realizar hasta el día 20 de acuerdo a lo recomendado para *Lamiaceas*; sin embargo debido a que se utilizaron semillas frescas de plantas silvestres, estas fueron evaluadas diariamente hasta el día 11. En el ensayo T6 (oscuridad con 7ppm de AG3), se presentó el máximo porcentaje de germinación acumulado con 84%, seguido del T1 (luz fluorescente, 0ppm de AG3) con 83% (Tabla 6).

En la gráfica de la curva de germinación (Fig. 34) se observa una alta tasa de germinación a partir del día 4 hasta el día 8, siendo el día 8 el pico más alto alcanzado y a partir del día 9 germinan pocas semillas.

Los tratamientos fueron los siguientes:

T1: Luz fluorescente con 0ppm de AG3

T2: Luz fluorescente con 5ppm de AG3

T3: Luz fluorescente con 7ppm de AG3

T4: Oscuridad con 0ppm de AG3

T5: Oscuridad con 5ppm de AG3

T6: Oscuridad con 7ppm de AG3

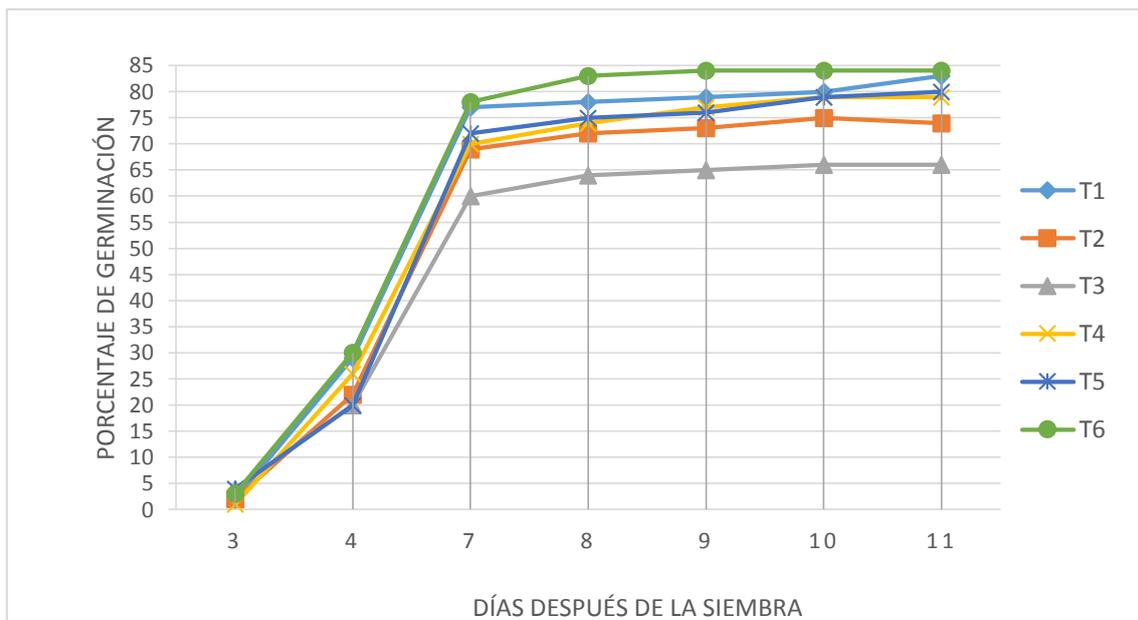


Figura 34: Curvas de germinación de *Minthostachys spicata*

Tabla 6: Porcentaje y tiempo de germinación por tratamiento

Día/ Tratamiento	3	4	7	8	9	10	11
T1	2	29	77	78	79	80	83
T2	2	22	69	72	73	75	74
T3	4	20	60	64	65	66	66
T4	1	26	70	74	77	79	79
T5	4	20	72	75	76	79	80
T6	3	30	78	83	84	84	84

FUENTE: Elaboración propia.

#### 4.2.2. Evaluación de plántulas

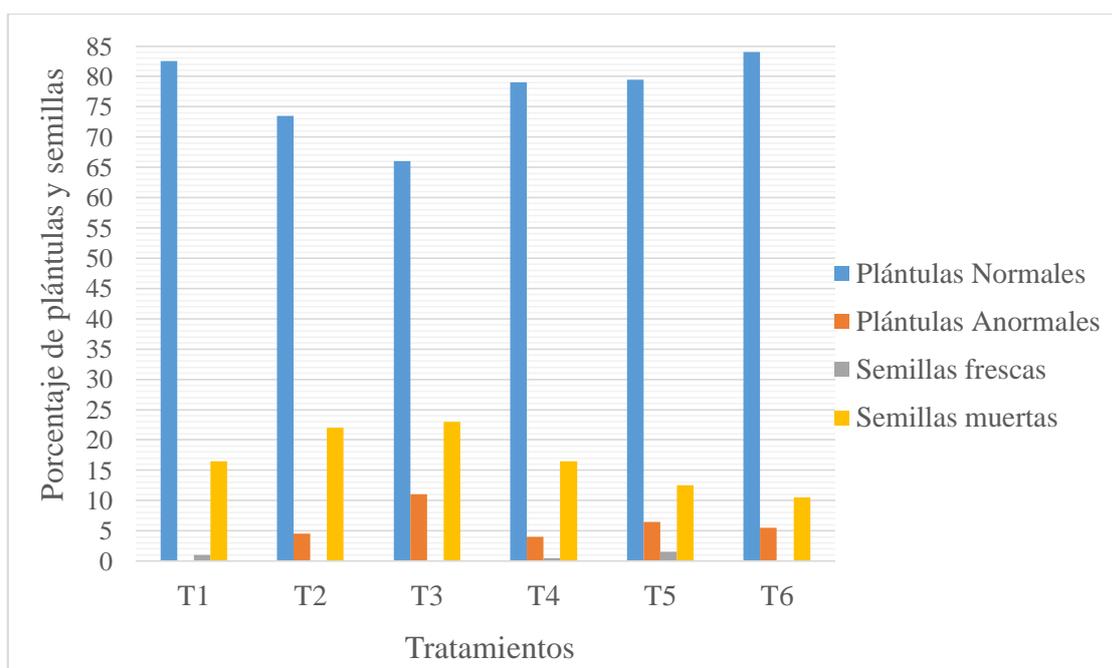
Se prosiguió con el análisis de plántulas, siguiendo la clasificación de plántulas normales y anormales, semillas muertas, y frescas (ISTA, 2016) realizado durante el conteo final del ensayo de germinación (Tabla 7 y Fig. 35).

El segundo conteo se realizó a los 11 días después de iniciada la siembra.

**Tabla 7: Porcentaje de plántulas y semillas por tratamiento a los 11 días**

Tratamientos	Plántulas germinadas		Semillas	
	Normales	Anormales	Frescas	Muertas
T1	83	0	1	16
T2	74	4	0	22
T3	66	11	0	23
T4	79	4	1	16
T5	80	7	1	12
T6	84	6	0	10

FUENTE: Elaboración propia.



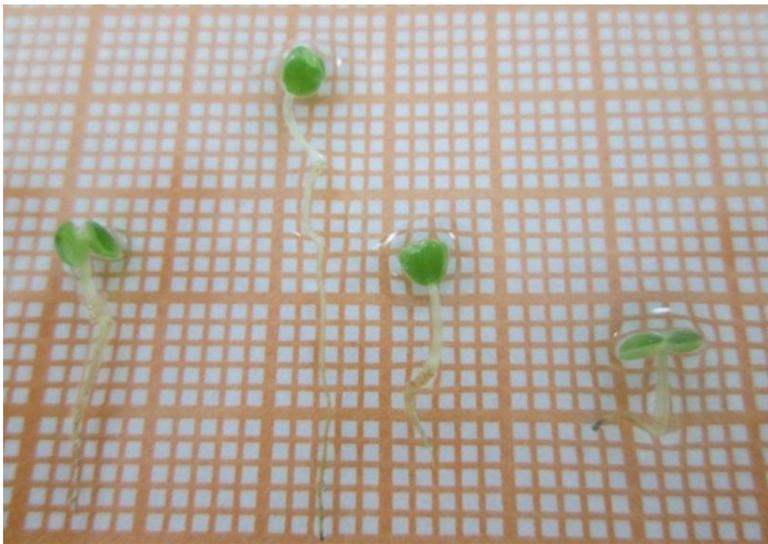
**Figura 35: Porcentaje de plántulas y semillas por tratamiento**

En la Fig. 35 y el Tabla 7, se observa que el porcentaje de plántulas normales fue alto en relación a las plántulas anormales para todos los tratamientos y varió de 66 a 84%, obteniéndose 0% de plántulas anormales en el T1 (luz fluorescente, 0ppm de AG3). El

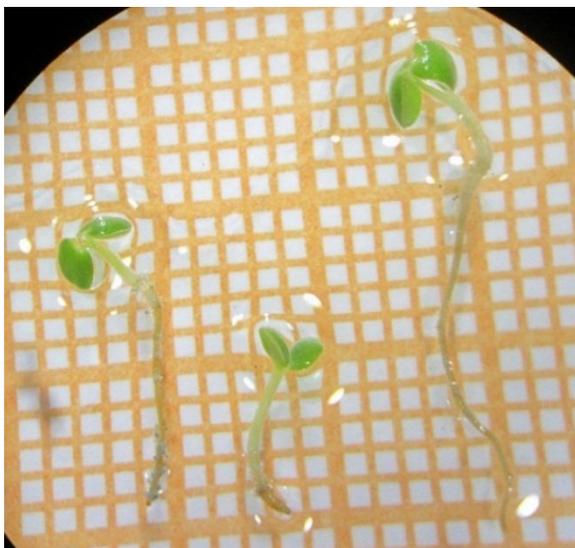
número de semillas frescas tuvo un rango de apenas 0 a 1%, las semillas muertas fueron numerosas para los tratamientos T2 (luz fluorescente, 5ppm de AG3) con 22% y T3 (luz fluorescente, 7ppm de AG3) con 23%.

#### a. Plántulas normales

Las plántulas normales presentaron todas sus estructuras esenciales completas y en algunos casos presentaron ligeros defectos como clorosis (para los tratamientos en los que se forraron las placas con papel aluminio), leve infección secundaria y zonas necróticas (Fig. 36 y 37).



**Figura 36:** Plántulas normales con ligera zona necrótica de *Minthostachys spicata* con el tratamiento 1 (Luz fluorescente y 0ppm de AG3)

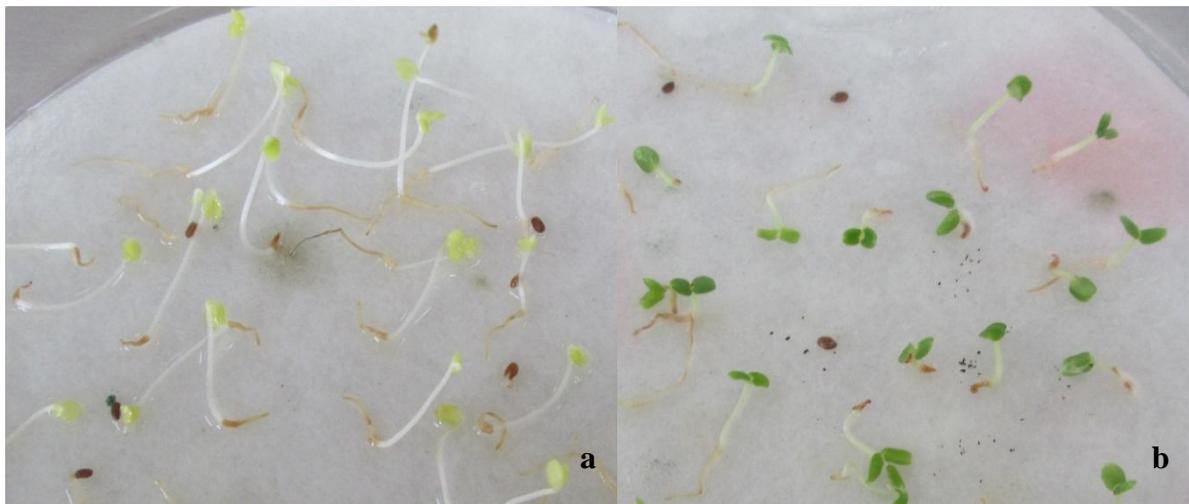


**Figura 37:** Plántulas normales con ligera infección secundaria de *Minthostachys spicata* con el tratamiento 1 (Luz fluorescente y 0ppm de AG3)

En el tratamiento T6 en condiciones de oscuridad y dosis de 7 ppm de AG3, se obtuvo un mayor porcentaje de plántulas normales, es decir de germinación (84%), en contraste con el T1 en condiciones de luz fluorescente y dosis de 7 ppm de AG3 (66%).

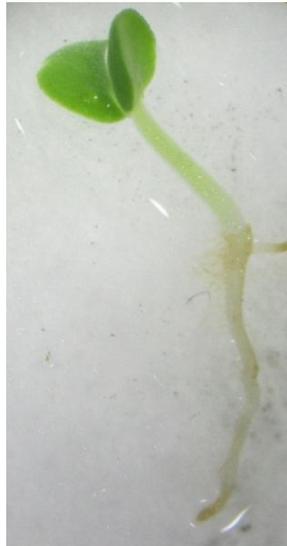
Además, se observó que en los tratamientos donde se aplicaron el ácido giberélico (AG3) y la oscuridad, se encontró un mayor desarrollo de los tallos en cuanto a longitud y desarrollo de raíces secundarias, en comparación al tratamiento que estuvo con luz y AG3, debido posiblemente a la falta de luz, por la que los tallos se elongaron como mecanismo para captar la luz; sin embargo, presentaron hojas pálidas, amarillentas como síntoma de la clorosis en las hojas cotiledonales (Fig. 38 a y b). Según Curtis *et al.* (2008), se denomina plántulas etioladas, a aquellas plántulas que crecen en oscuridad que se caracterizan por ser alargadas con hojas pequeñas, además presentan coloración pálida, ya que los cloroplastos no sintetizan clorofila hasta que sean expuestos a la luz, siendo una ventaja para su supervivencia ya que incrementa la oportunidad de la plántula de alcanzar la luz evitando agotar sus reservas de energía almacenadas.

Los tratamientos 1 y 6 presentaron elevados porcentajes de germinación: 83% y 84%, respectivamente.



**Figura 38: Plántulas normales a) con hojas cloróticas desarrolladas en oscuridad y con AG3. b) con hojas verdes desarrolladas en luz y con AG3**

Las plántulas normales alcanzaron una longitud máxima de 20 mm con raíces secundarias a los 15 días después de la siembra (Fig. 39).



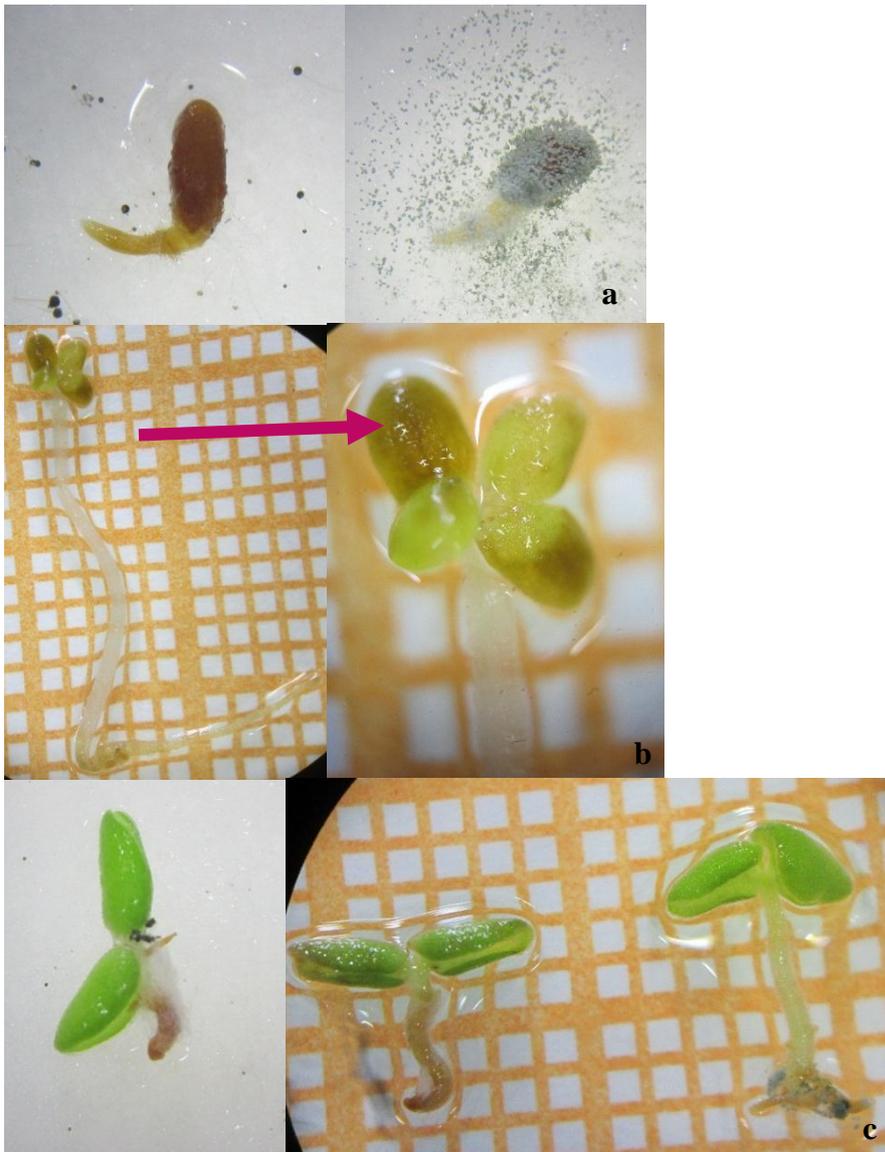
**Figura 39: Plántula normal con raíz secundaria**

#### **b. Plántulas anormales**

Las plántulas anormales obtenidas en el ensayo de germinación presentaron en su mayoría una raíz primaria atrofiada, necrosada y podrida; y en pocos casos, hojas cotiledonales divididas en cuatro (Fig. 40 a y 40 b).

En el T3, donde se expuso a la luz fluorescente del germinador y se aplicaron dosis de ácido giberélico de 7 ppm se observa una mayor predominancia de plántulas pequeñas con raíz primaria atrofiada y presencia de hongos (11%) (Fig. 40 c).

En cambio en el tratamiento T6, el cual estaba cubierto con papel aluminio y se utilizaron dosis de AG3 de 7 ppm, se observó un menor porcentaje de plántulas anormales (6%), mostrando un mayor porcentaje de germinación de 84% en relación a los demás tratamientos.



**Figura 40: Plántulas anormales, a. Plántula anormal con raíz primaria atrofiada y podrida de *Minthostachys spicata* b. Plántula anormal con yema terminal y 4 hojas cotiledonales, c. Plántula anormal con raíz primaria atrofiada y necrosada**

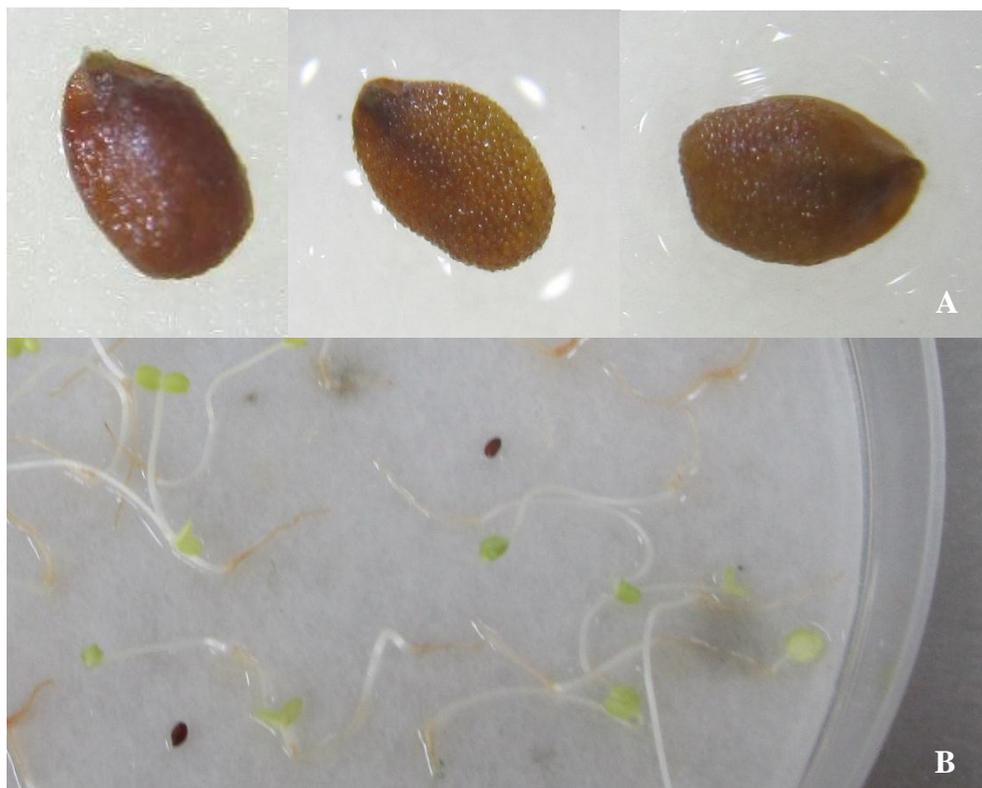
### **c. Semillas frescas**

En relación a las semillas que no lograron germinar, se observó que todas se encontraron hinchadas, debido a la absorción de agua, ya que se colectaron las semillas de muña (*Minthostachys spicata*) de plantas silvestres frescas (Fig. 41).

En la Fig. 41 se aprecian las semillas frescas, siendo el tratamiento 5, el que estuvo expuesto a la oscuridad y una dosis de 5ppm de AG3, con mayor número de semillas frescas (1%).

Las semillas frescas que se encontraron en estado de latencia, pudieron presentar algunas de las posibles causas, tales como: la inmadurez del embrión, las restricciones mecánicas para el desarrollo del embrión, la impermeabilidad de las cubiertas seminales al agua y al oxígeno, la presencia de sustancias inhibitoras en diferentes tejidos de la semilla o requerimientos especiales de temperatura y luz (Prisco *et al.*, 1992; citado en Doria, 2010).

En general, se obtuvo un porcentaje bajo de semillas frescas de 0 a 1% para todos los seis tratamientos.



**Figura 41: A) Semillas frescas, B) Semilla frescas en placas Petri**

#### **d. Semillas muertas**

Las semillas muertas evaluadas durante el ensayo de germinación fueron retiradas en el primer conteo y algunas se quedaron en la placa Petri, ya que su presencia no afectaba la integridad sanitaria de las demás semillas.

Se observó la presencia de sustancias mucilaginosas, nube de moho verde y en algunos casos hifas negras, que evitaron posiblemente que se produzca la germinación (Fig. 42).

El mayor porcentaje de semillas muertas fue para el tratamiento 3 con 23%, esto podría explicarse por el uso de una dosis alta de AG3 de 7 ppm. De acuerdo a Duran *et al.* (2016), quién trabajó con variedades del género *Ocimum*, obtuvo que los tratamientos que recibieron una dosis de ácido giberélico de 250 y 500 ppm, una mayor infestación de patógenos causando un alto porcentaje de semillas muertas de 17,9% para la dosis de 250 ppm de AG3 y 15,9% para la dosis de 500 ppm de AG3; en cambio para los tratamientos con KNO3 al 0.2% presentó un bajo porcentaje de semillas muertas (8.3%).

Además, debido a que se evaluó diariamente el crecimiento de la radícula, esto pudo causar la contaminación de las semillas.

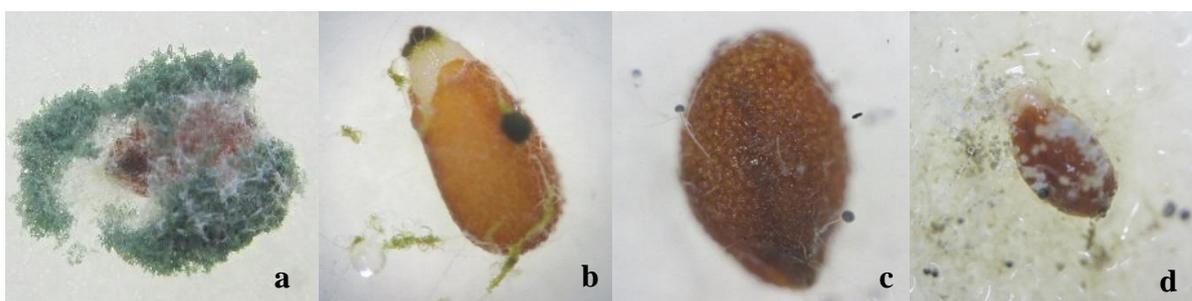


Figura 42: Semillas muertas, a. Semillas con nube algodonosa verde, b. Semillas con cuerpos verdes, c. Semillas con hifas de color negro, d. Semillas con cristales blancos y plomos

### 4.3 Análisis estadístico

#### 4.3.1 Porcentaje de plántulas normales

Tabla 8: Análisis ANVA para el porcentaje de plántulas normales

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Signif.
<b>ConcentraciónAG3</b>	2	142.33	71.167	2.6855	0.095355	.
<b>Luz</b>	1	280.17	280.167	10.5723	0.004431	**
<b>ConcentraciónAG3: Luz</b>	2	464.33	232.167	8.7610	0.002203	**
<b>Residuals</b>	18	477.00	26.500			

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

MSerror	Mean	Min	Max	SDev	CV
<b>26.50</b>	77.42	60.00	90.00	7.70	6.65

FUENTE: Elaboración propia.

De acuerdo al análisis de variancia para plántulas normales (Tabla 8), existen diferencias significativas para el factor luz y la interacción entre el factor luz y el factor concentración de ácido giberélico; además el efecto del factor concentración de ácido giberélico no presentó diferencias significativas en los tratamientos, por lo tanto no influyó en el ensayo de germinación.

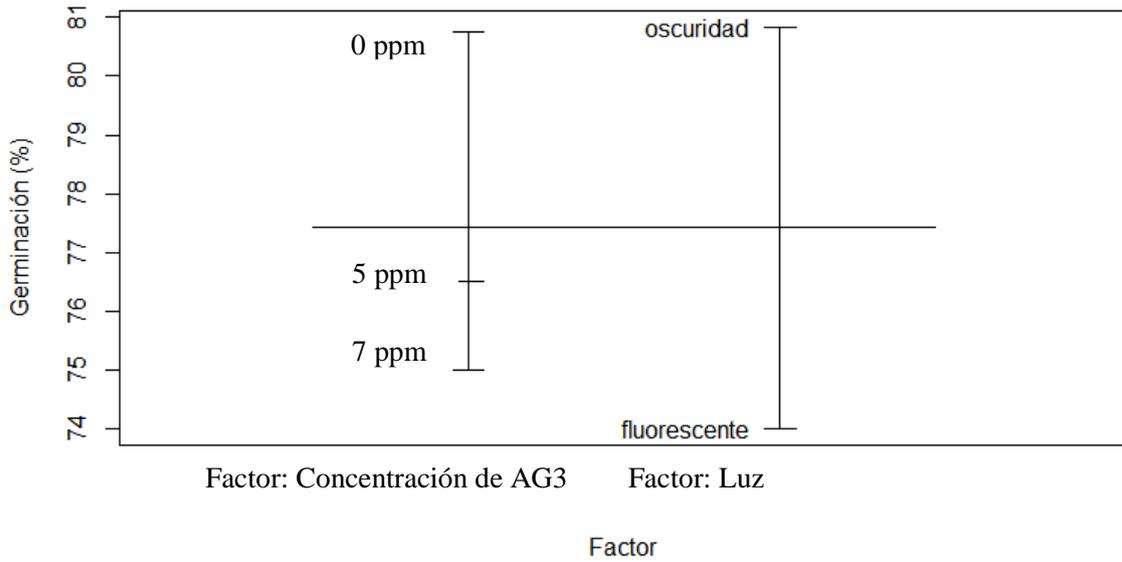
En la investigación realizada por Suarez *et al.* (2011), menciona que no se observaron efectos significativos con la aplicación de AG3 (con dosis de 0, 5, 15 y 25 ppm) en la germinación de *Minthostachys mollis*.

En la comparación de medias se utilizaron las pruebas de Tukey al 0.05 para plántulas normales. Se observa que dentro del nivel de factor oscuridad no se presentan diferencias para las tres concentraciones de ácido giberélico (0, 5, 7 ppm). En cambio, para el nivel de factor luz fluorescente se obtuvo diferencias en cuanto a la aplicación de las tres dosis de AG3. Siendo el tratamiento de luz fluorescente y concentración 0 ppm de AG3, el que presentó un mayor porcentaje de germinación (Tabla 9).

El coeficiente de variación resultó 6.65% para la variable plántulas normales (%).

Se logró un mayor porcentaje de germinación cuando fue sometido en oscuridad y a tratamiento pregerminativo de AG3 en contraste cuando estuvo en luz fluorescente.

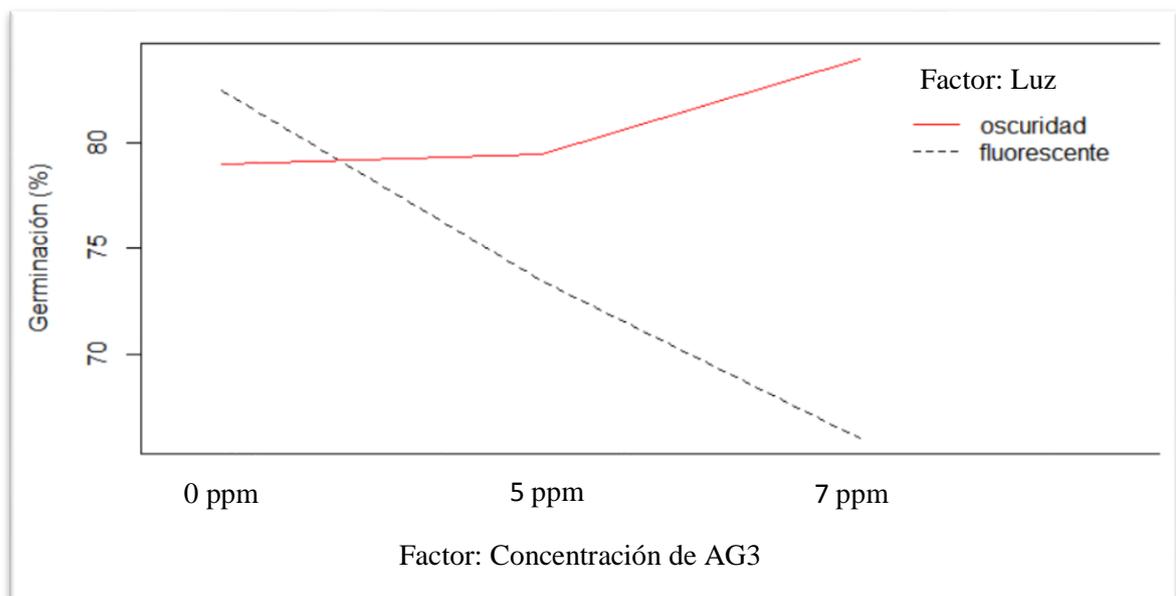
En la Fig. 43 se visualiza una mayor variabilidad del porcentaje de plántulas normales en el factor luz en relación al efecto del factor dosis de AG3.



**Figura 43: Gráfica de efectos principales para plántulas normales**

En la Fig. 44 se visualiza que existe una interacción entre los factores concentración de AG3 y el factor luz, debido a que las gráficas se logran cruzar. Además conforme aumenta la dosis de AG3 de 0 a 7 ppm en condiciones de luz fluorescente, el porcentaje de germinación disminuye.

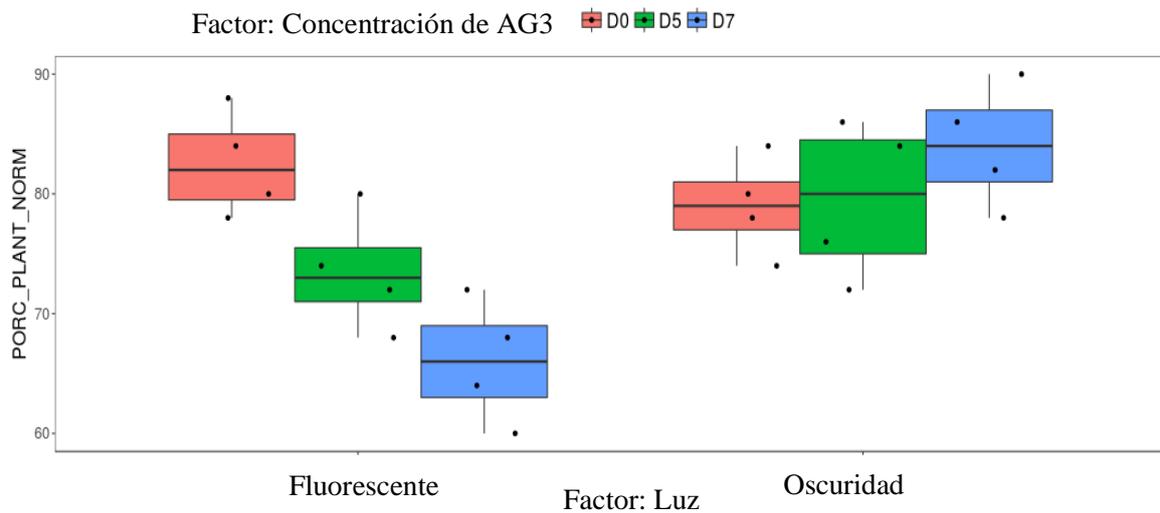
En cambio en condiciones de oscuridad cuando se proporciona dosis de 0 ppm y 5 ppm de AG3 se mantiene casi constante el porcentaje de germinación, luego cuando se tiene una concentración de 7 ppm se produce un incremento notorio en el porcentaje de germinación.



**Figura 44: Grafica de interacción para plántulas normales**

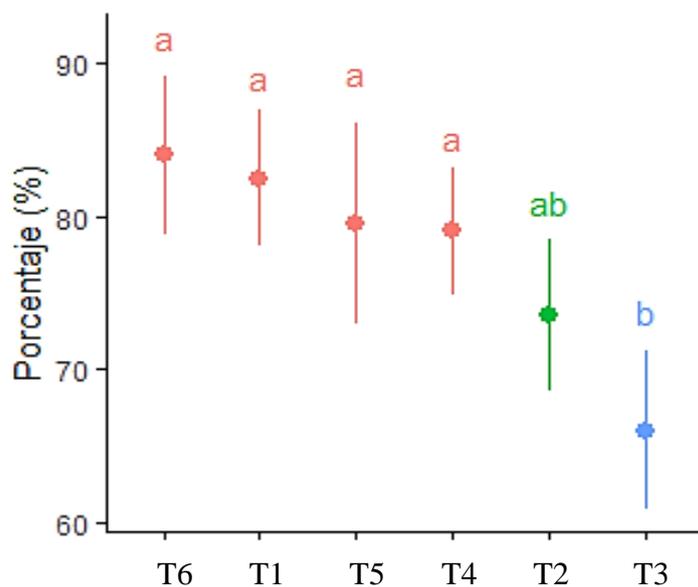
En el diagrama de cajas (Fig. 45), se visualiza que para condiciones de luz fluorescente las cajas van desplazándose hacia abajo, lo que indica que conforme se aumenta la dosis de AG3 el porcentaje de plántulas normales sufrirá una disminución. Pero, en condiciones de oscuridad las cajas manifiestan un ligero desplazamiento hacia arriba conforme se les aplica más AG3 a las semillas de muña, lo que conllevará a un aumento del porcentaje de plántulas normales.

Asimismo, se puede concluir que sin la aplicación de AG3 en presencia de luz fluorescente se lograría conseguir un alto porcentaje de plántulas normales o germinación de semillas de muña.



**Figura 45: Diagrama de cajas para plántulas normales**

En la Fig. 46 se observa a un nivel de significancia del 0.05, que no existe diferencia significativa entre los tratamientos: T6 (7 ppm de AG3 en oscuridad), T1 (0 ppm de AG3 en luz fluorescente), T5 (5 ppm de AG3 en oscuridad), T4 (0 ppm de AG3 en oscuridad) y si existe diferencia significativa con los demás tratamientos. Por lo que se concluye que estos tratamientos son los que producen mejor efecto en la variable porcentaje de plántulas normales.



**Figura 46: Gráfica de puntos de las medias para plántulas normales**

En el Tabla 9, muestra que la variable porcentaje de plántulas normales entre los tratamientos con concentración de AG3 de 7 ppm, 5 ppm, 0 ppm en oscuridad y 0 ppm de AG3 en luz fluorescente tuvieron el mismo comportamiento, siendo el tratamiento con concentración de AG3 de 5ppm en oscuridad el más variable como se aprecia en el gráfico, asimismo el tratamiento recomendado sería el tratamiento 1 (0ppm de AG3 en luz fluorescente), debido a que posee uno de los más altos porcentaje de plántulas normales en promedio (83%) con menos variabilidad, además que no se invertiría en la compra de la hormona vegetal AG3.

En el tratamiento 3 (7ppm de AG3 en luz fluorescente) se obtuvo el menor porcentaje de plántulas normales en promedio (66%), y si existe diferencia significativa con los demás tratamientos agrupándolo con la letra b.

**Tabla 9: Comparación de medias para plántulas normales**

Tratamiento	AG3	Luz	Mean	Min	Max	r	std	ste	sg
T6	7ppm	Oscuridad	84%	78	90	4	5.164	2.582	a
T1	0ppm	Fluorescente	82.5%	78	88	4	4.435	2.217	a
T5	5ppm	Oscuridad	79.5%	72	86	4	6.608	3.304	a

<b>T4</b>	0ppm	Oscuridad	79%	74	84	4	4.163	2.082	a
<b>T2</b>	5ppm	Fluorescente	73.5%	68	80	4	5	2.5	ab
<b>T3</b>	7ppm	Fluorescente	66%	60	72	4	5.164	2.582	b

\*Tratamientos con distintas letras indican diferencias significativas (Prueba Tukey, al 0.05).

FUENTE: Elaboración propia.

En el ensayo realizado por Gastón de Iriarte y Esperanza (2017), se evaluaron dos factores: iluminación (luz, oscuridad) y los tratamientos para romper la dormancia (estratificación, calor y AG3) en dos especies, pertenecientes a la familia *Lamiaceae*; se encontró que en *Teucrium freynii* la oscuridad continua promueve significativamente la germinación para los tratamientos donde se aplicó AG3 y en el control, siendo el tratamiento con aplicación de 500 ppm de AG3 (95%), y el tratamiento control sin AG3 (83%) en oscuridad, aquellos que obtuvieron altos porcentajes de germinación, en comparación con los resultados en el tratamiento control en luz (12 horas luz) 55% y en el tratamiento con aplicación de AG3 en condiciones de luz 66% de germinación.

Sin embargo, Suarez *et al.* (2010) reportan que la especie *Minthostachys mollis* germina bajo condiciones de luz; mientras que la germinación fue menor en condiciones de oscuridad, siendo esta última desfavorable.

#### 4.3.2 Porcentaje de semillas no germinadas

Tabla 10: Análisis ANVA para el porcentaje de semillas no germinadas

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Signif.
<b>ConcentraciónAG3</b>	2	6.33	3.167	0.1326	0.876699	
<b>Luz</b>	1	294.00	294.000	12.3070	0.002511	**
<b>DosisAG3: Luz</b>	2	147.00	73.5000	3.0767	0.070898	.
<b>Residuals</b>	18	430.00	23.889			

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

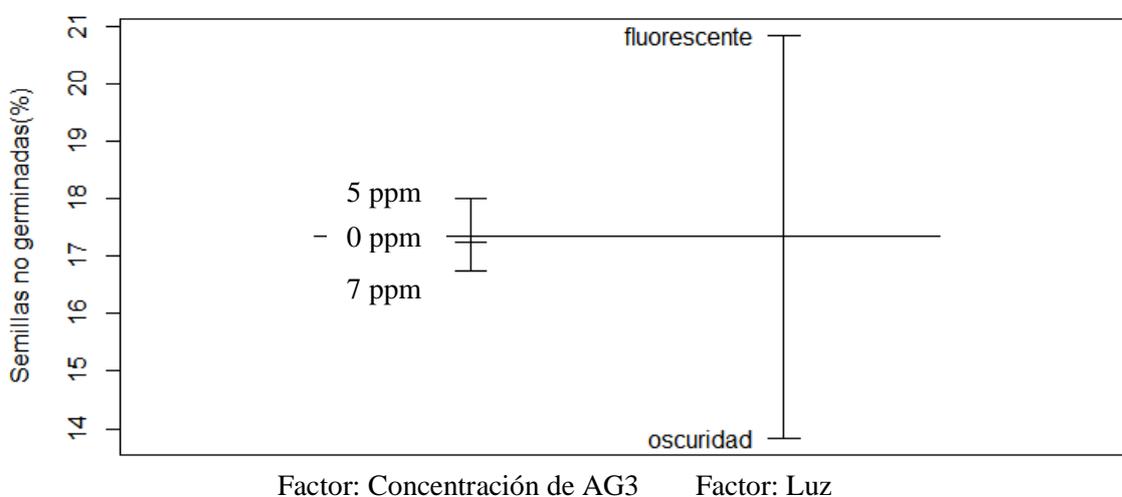
MSerror	Mean	Min	Max	SDev	CV
<b>23.89</b>	17.33	6.00	28.00	6.18	28.20

FUENTE: Elaboración propia.

Según el análisis de variancia para semillas no germinadas presentado en la Tabla 10, se puede observar que para el efecto del factor principal luz resulta significativo; en cambio, existe suficiente evidencia estadística para aceptar que no hay interacción entre el factor luz y el factor concentración de ácido giberélico (AG3), ni para el efecto del factor principal, concentración de AG3 (0, 5 y 7 ppm), es decir que no hay influencia del ácido giberélico en el porcentaje de semillas no germinadas.

En la Fig. 47 se muestran los efectos principales, se observa claramente que el factor luz es más relevante y que produce un mayor efecto en el porcentaje de semillas no germinadas, comparado al efecto del factor concentración de AG3.

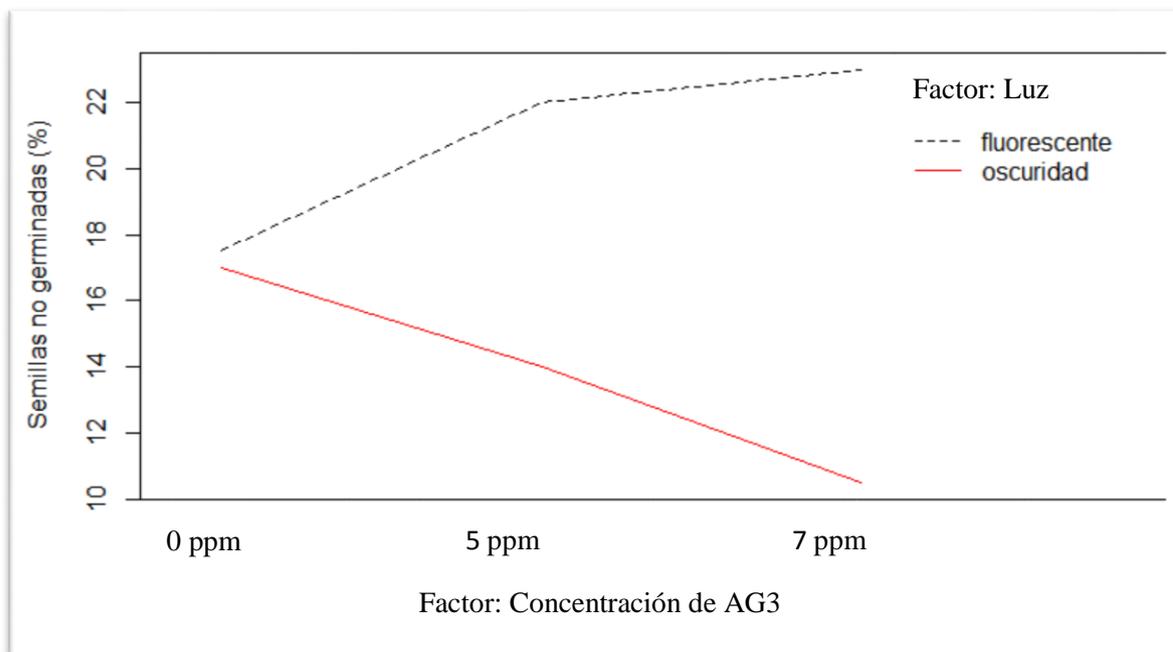
El coeficiente de variación fue 28,20% para la variable semillas no germinadas (%).



**Figura 47: Grafica de efectos principales para semillas no germinadas**

En la Fig. 48 se observa que no existe interacción entre el factor concentración de AG3 y el factor luz, ya que en la gráfica no se cruzan las líneas, lo que significa que la diferencia de medias de los tres niveles del factor dosis de AG3 es igual en todos los niveles del factor luz.

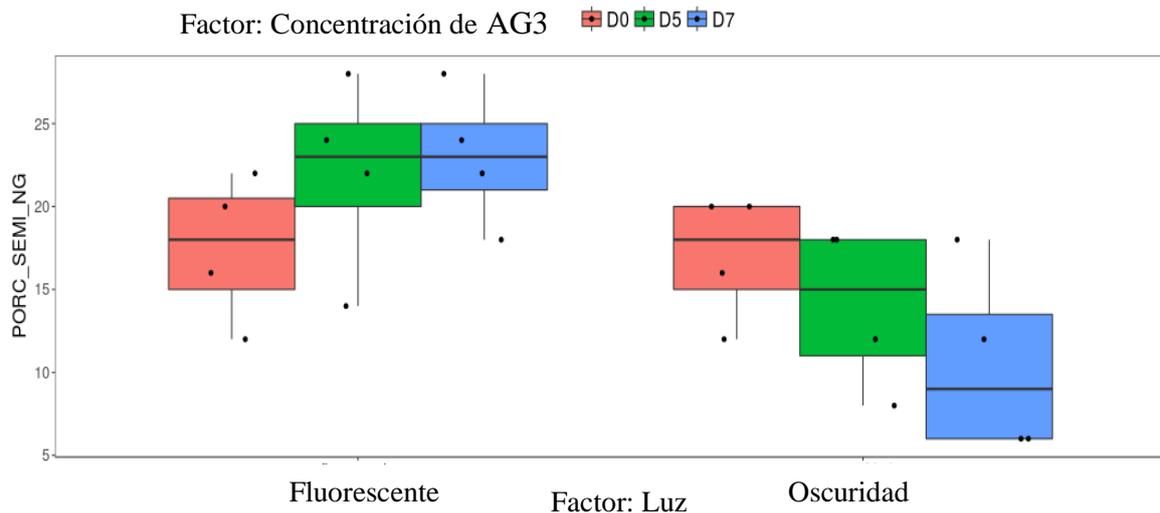
Se concluye que según se incrementa la concentración de AG3 en condiciones de oscuridad disminuye el porcentaje de semillas no germinadas, lo cual es favorable durante las pruebas de germinación. Por otro lado, mientras se aumenta la dosis de AG3 en condiciones de luz se eleva el porcentaje de semillas no germinadas.



**Figura 48: Grafica de interacción para semillas no germinadas**

En el diagrama de cajas (Fig. 49) se aprecia para el nivel del factor fluorescente, las cajas presentan un desplazamiento hacia la derecha, según aumenta la concentración de AG3, para el nivel de factor oscuridad las cajas muestran un desplazamiento hacia abajo de manera decreciente, esto quiere decir que según aumenta la aplicación de AG3 de 0-7ppm se obtendrá un menor porcentaje de semillas no germinadas. Por el contrario, cuando se aplica dosis de AG3 de 5 ppm a 7 ppm en presencia de luz fluorescente se tiene la misma mediana y similar porcentaje de semillas no germinadas.

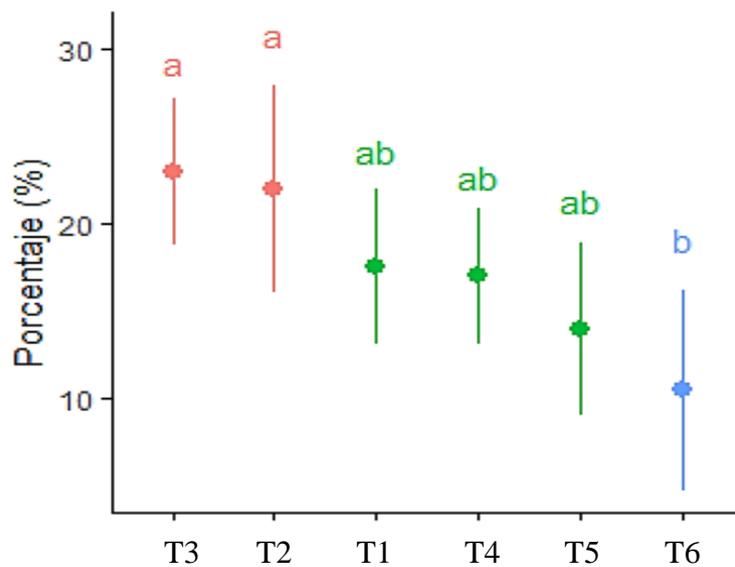
Entonces se puede concluir del análisis, que el tratamiento concentración de AG3 de 7ppm en oscuridad es adecuado para obtener el menor porcentaje de semillas no germinadas de muña.



**Figura 49: Diagrama de cajas para semillas no germinadas**

En la Fig. 50, se aprecia a un nivel de significancia del 0.05, que si existe diferencia significativa para el tratamiento 6 (7 ppm de AG3 en oscuridad), en relación con los demás tratamientos, este tratamiento produce mejor efecto en la variable porcentaje de semillas no germinadas.

Para lograr un menor número de semillas no germinadas se recomendaría una concentración de AG3 de 7ppm en oscuridad.



**Figura 50: Grafica de puntos de medias para semillas no germinadas**

En cambio, los porcentajes más altos de semillas no germinadas fueron para los tratamientos: T3, donde se utilizaron 7 ppm de AG3 (23%) y T2 con 5 ppm de AG3 (22%) en luz fluorescente. Estos fueron agrupados con la misma letra a y presentó mayor variabilidad el tratamiento T2 (5 ppm de AG3 en luz fluorescente). Por lo tanto, no se recomendaría el uso de AG3 en 5-7ppm en presencia de luz fluorescente (Tabla 11).

**Tabla 11: Comparación de medias para semillas no germinadas**

Tratamiento	AG3	Luz	Mean	Min	Max	r	std	ste	sg
T3	7ppm	Fluorescente	23%	18	28	4	4.163	2.082	a
T2	5ppm	Fluorescente	22%	14	28	4	5.888	2.944	a
T1	0ppm	Fluorescente	17.5%	12	22	4	4.435	2.217	ab
T4	0ppm	Oscuridad	17%	12	20	4	3.83	1.915	ab
T5	5ppm	Oscuridad	14%	8	18	4	4.899	2.449	ab
T6	7ppm	Oscuridad	10.5%	6	18	4	5.745	2.872	b

\*Tratamientos con distintas letras indican diferencias significativas (Prueba Tukey, al 0.05).

FUENTE: Elaboración propia.

#### 4.3.3 Porcentaje de germinación fisiológica

**Tabla 12: Análisis ANVA para el porcentaje de germinación fisiológica**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Signif.
DosisAG3	2	6.33	3.167	0.1326	0.876699	
Luz	1	294.00	294.000	12.3070	0.002511	**
DosisAG3: Luz	2	147.00	73.5000	3.0767	0.070898	.
Residuals	18	430.00	23.889			

Signif. codes: 0 ‘\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*’ 0.01 ‘\*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

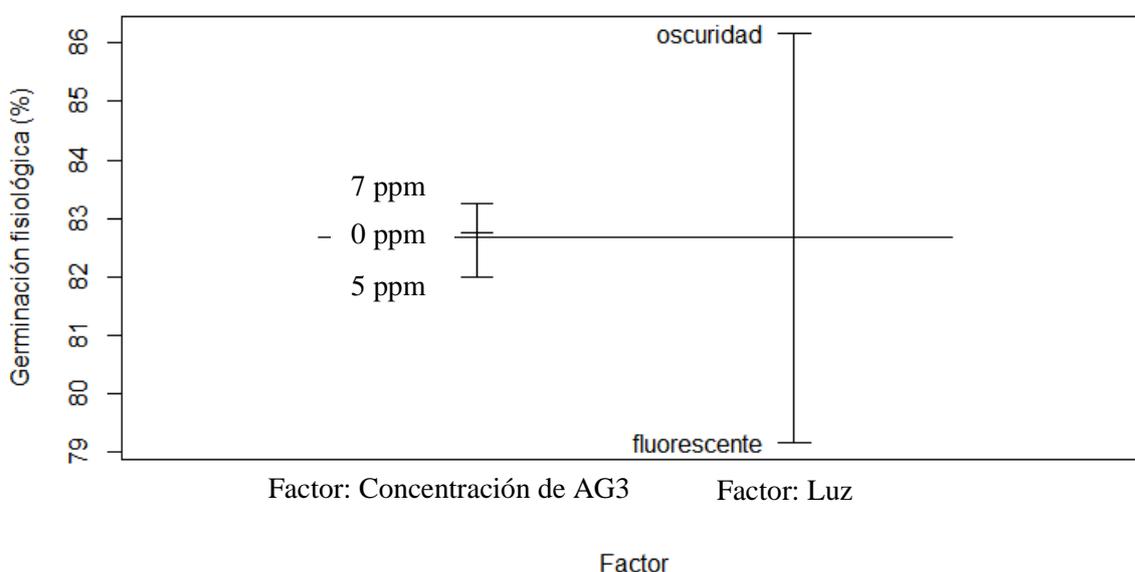
MSerror	Mean	Min	Max	SDev	CV
23.89	82.67	72.00	94.00	6.18	5.91

FUENTE: Elaboración propia.

Con respecto al análisis de varianza mostrado en el Tabla 12, se observa que el efecto principal del factor luz fue significativo para el porcentaje de germinación fisiológica; por el contrario hay suficiente evidencia estadística para aceptar que no hay interacción entre el factor luz y el factor concentración de AG3. Esto quiere decir, que el porcentaje de germinación fisiológica se vio influenciado por la luz, mas no por la aplicación de AG3 (0, 5 y 7ppm).

En la Fig. 51 se observa los efectos principales, siendo el factor luz el más importante debido a que produce un mayor efecto en el porcentaje de germinación fisiológica comparado al factor concentración de AG3.

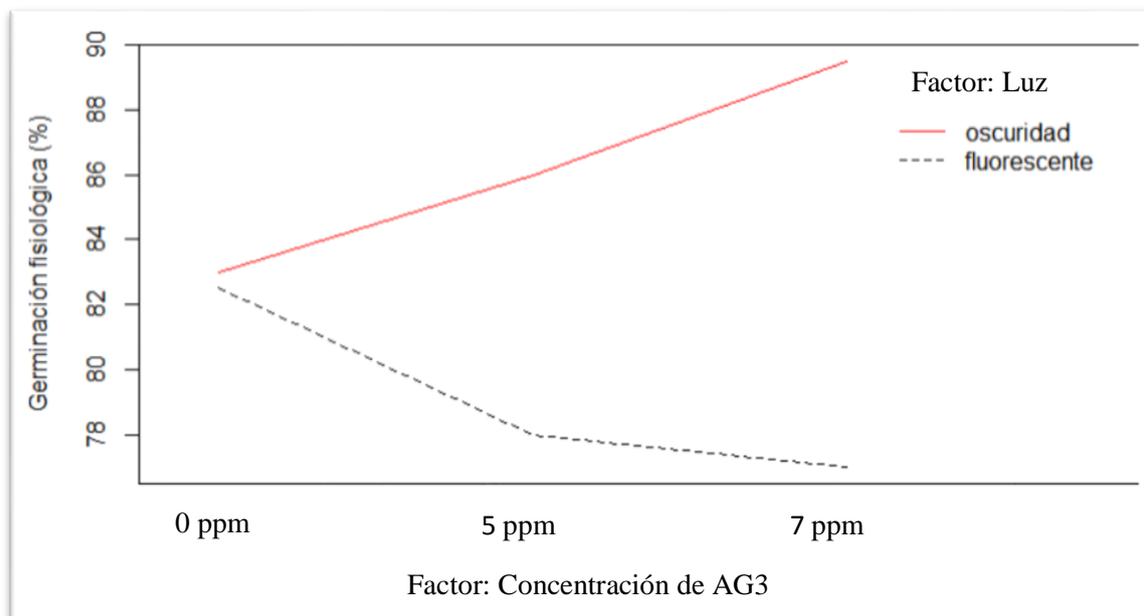
El coeficiente de variación fue 5.91% para la variable germinación fisiológica (%).



**Figura 51: Efectos principales para germinación fisiológica**

En la Fig. 52 se observa que no existe interacción entre el factor concentración de AG3 y el factor luz, ya que en la gráfica no se cruzan las líneas, lo que significa que la diferencia de medias de los tres niveles del factor dosis de AG3 es igual en todos los niveles del factor luz.

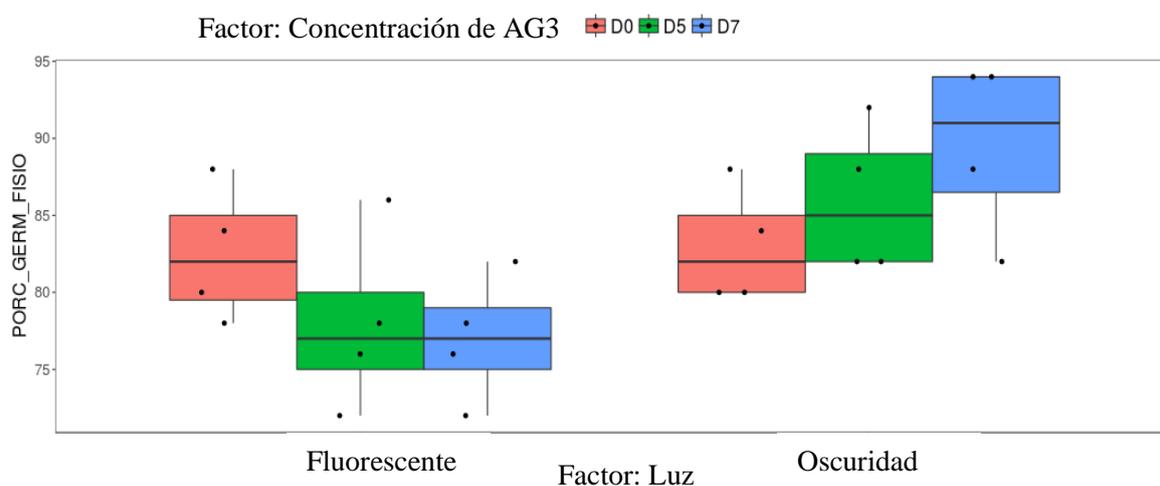
Se considera que mientras aumenta la dosis de AG3 en la oscuridad se produce un incremento del porcentaje de germinación fisiológica; en cambio cuando se aplica a las semillas de muña concentraciones de 0 a 7 ppm en presencia de luz fluorescente, se refleja en una disminución del porcentaje de germinación fisiológica.



**Figura 52: Gráfica de interacción para germinación fisiológica**

En la Fig. 53 se observa que las cajas tienen un desplazamiento hacia arriba para el nivel de factor oscuridad; por lo tanto conforme aumenta las concentraciones de AG3 se obtendrá un mayor porcentaje de germinación fisiológica; en cambio para el nivel de factor fluorescente las cajas presentan un desplazamiento hacia abajo y que a partir de la aplicación de dosis de 5 hasta 7 ppm, la mediana resulta igual (77%) y el promedio es similar (77% y 78%, respectivamente) para la variable porcentaje de germinación fisiológica.

Del análisis se infiere que el tratamiento que recibió concentración de AG3 de 7ppm en oscuridad alcanzo un mayor porcentaje de germinación fisiológica.



**Figura 53: Diagrama de cajas para germinación fisiológica**

En la Fig. 54, se muestra que a un nivel de significancia del 0.05, si existe diferencia significativa en el tratamiento 6 (7 ppm de AG3 en oscuridad) y no existe diferencia significativa entre los tratamientos: T2 (5 ppm de AG3 en luz fluorescente) y T3 (7 ppm de AG3 en luz fluorescente), pero si con los demás tratamientos. Por lo que se concluye que el tratamiento 6 (7ppm de AG3 en oscuridad), es aquel que produce mejor efecto en la variable porcentaje de germinación fisiológica.

El tratamiento que alcanzó un mayor porcentaje de germinación fisiológica fue la interacción de la concentración de 7ppm de AG3 en oscuridad.

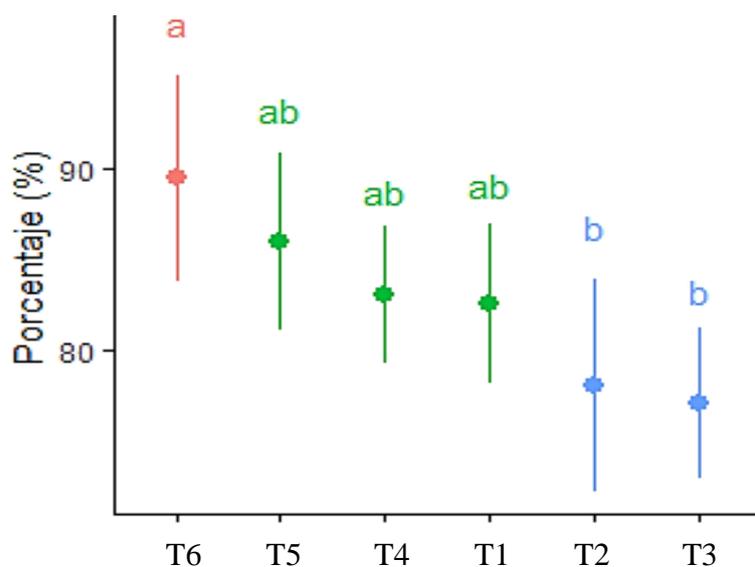


Figura 54: Gráfica de puntos de medias para germinación fisiológica

Por el contrario, los tratamientos con concentraciones de AG3 de 5ppm (78%), 7ppm (77%) en presencia de luz fluorescente obtuvieron los menores porcentajes de germinación fisiológica en promedio (Tabla 13).

Tabla 13: Comparación de medias para germinación fisiológica

Tratamiento	AG3	Luz	Mean	Min	Max	r	std	ste	sg
T6	7ppm	Oscuridad	89.5%	82	94	4	5.745	2.872	a
T5	5ppm	Oscuridad	86%	82	92	4	4.899	2.449	ab
T4	0ppm	Oscuridad	83%	80	88	4	3.83	1.915	ab

<b>T1</b>	0ppm	Fluorescente	82.5%	78	88	4	4.435	2.217	ab
<b>T2</b>	5ppm	Fluorescente	78%	72	86	4	5.888	2.944	b
<b>T3</b>	7ppm	Fluorescente	77%	72	82	4	4.163	2.082	b

\*Tratamientos con distintas letras indican diferencias significativas (Prueba Tukey, al 0.05).

FUENTE: Elaboración propia.

#### 4.3.4 Velocidad de germinación

En cuanto a la velocidad de germinación, se llevó a cabo un conteo de emergencia de radícula por 15 días (Anexo 9), en donde se obtuvo un alto índice de velocidad de germinación (7.62) para las placas que se encontraba en oscuridad y a una dosis de 7ppm de AG3.

En la Fig. 55 se observa que el IVG aumenta conforme aumenta la dosis de AG3, en condiciones de oscuridad, siendo la germinación más rápida; en cambio el IVG disminuye en relación que aumenta la dosis de AG3 en luz fluorescente.

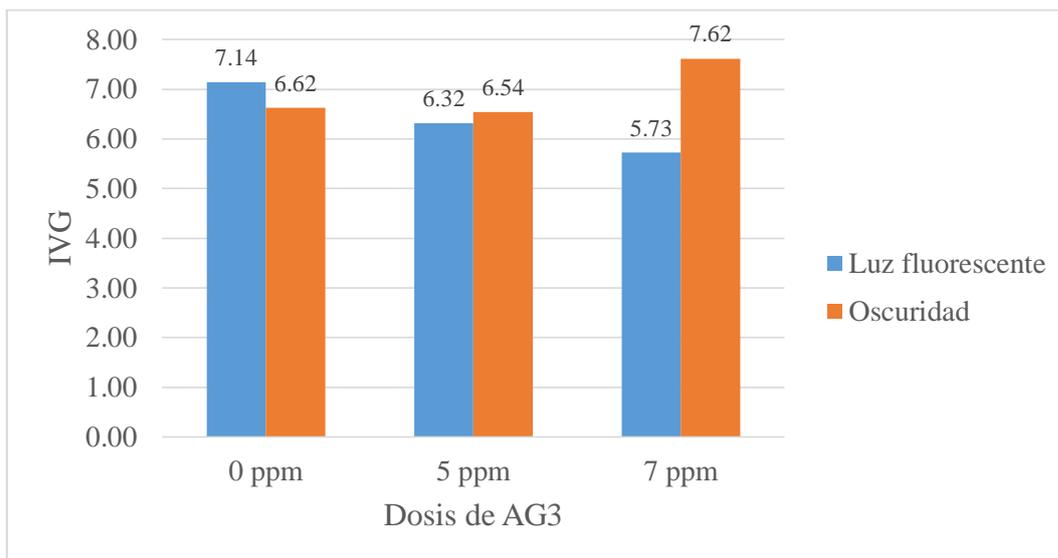


Figura 55: Índice de velocidad de germinación

#### 4.4 Ensayo de viabilidad

Se llevó a cabo el ensayo de viabilidad al finalizar el conteo de germinación de la muña, con aquellas semillas que no lograron germinar.

Para clasificar a las semillas viables y no viables de muña, se tomó como referencia la prueba de tetrazolio para semillas de lavanda y romero, según lo propuesto por el ISTA (2003).

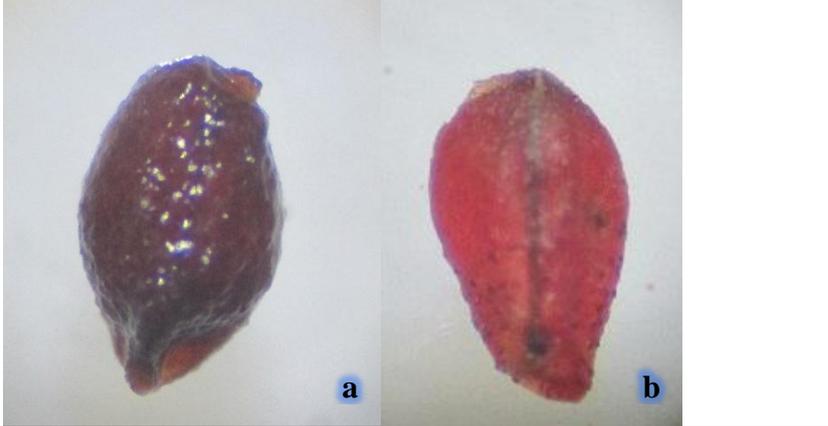
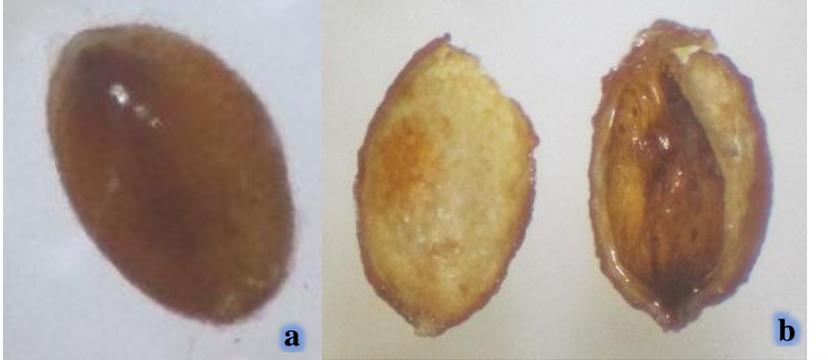
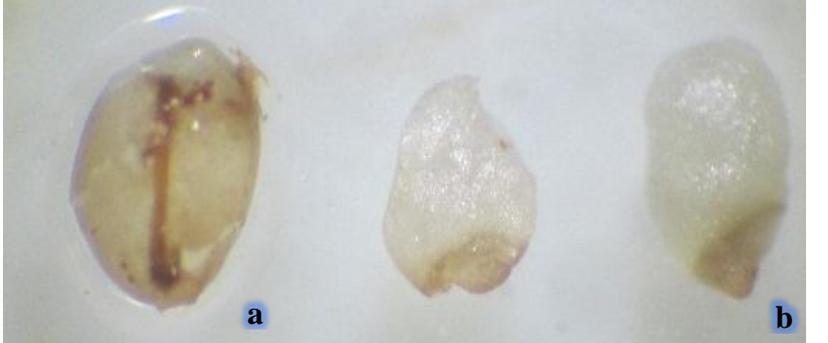
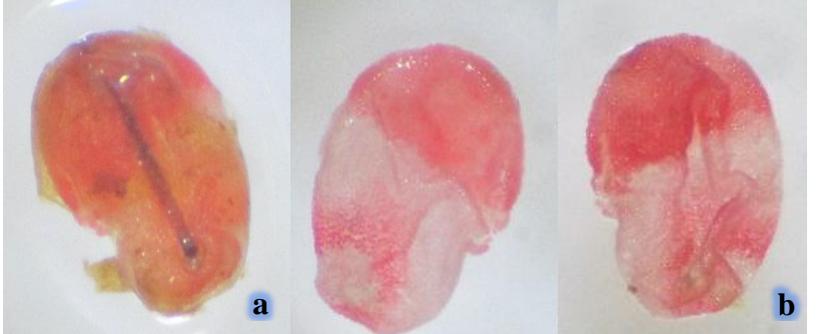
De acuerdo al Tabla 2, el ISTA (2013) menciona los criterios para la evaluación de semillas viables, siendo el área máxima de tejido no teñido, flácido y/o necrótico permitido el siguiente: 1/3 de radícula, medida desde la punta de la radícula, 1/3 del extremo distal de los cotiledones para considerarse como semillas viables.

Se visualizaron coloraciones desde el rosa intenso, para aquellas semillas que resultaron viables y para las semillas no viables se tuvieron un color rosa pálido hasta blanco-amarillento.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas de germinación se analizó la estructura del embrión, tanto el daño como la inmadurez de éste.

De las seis semillas frescas evaluadas, solo una fue viable, presentando una coloración rosa intensa, las restantes semillas fueron no viables, de las cuales, en tres semillas se observó la falta de desarrollo del embrión, y tejido necrosado, no presentando tinción alguna, y dos semillas con coloración rosa pálido (Tabla 14).

Tabla 14: Clasificación de la semilla *Minthostachys spicata*, según patrón de tinción

Característica	Semilla viable
<p>a. Semilla con cubierta seminal</p> <p>b. Semilla sin cubierta seminal teñida de color rosa</p>	
<b>Semillas no viables</b>	
<p>a. Semilla con cubierta seminal</p> <p>b. Semilla luego de realizar el corte, se observa inmadurez del embrión</p>	
<p>a. Endospermo</p> <p>b. Semilla dañada con más de 1/3 no teñido, necrótico.</p>	
<p>a. Semilla con endospermo</p> <p>b. Semilla con más de un 1/3 teñido</p>	

FUENTE: Elaboración propia.

## V. CONCLUSIONES

1. Las semillas de *Minthostachys spicata*, son completas es decir, poseen episperma, endospermo y embrión; el episperma es de color marrón, cuando se retira esta capa se observa una coloración blanca del embrión. El embrión es pequeño, ovoide de posición axial ubicado en la región central de la semilla.
2. En la prueba de germinación se encontró que la interacción entre el factor luz y el factor concentraciones de AG3 es significativo, presentando los tratamientos T4 (oscuridad y 0 ppm de AG3), T5 (oscuridad y 5ppm de AG3), T6 (oscuridad y 7ppm de AG3) y el T1 (Luz fluorescente y 0 ppm de AG3) el mismo comportamiento.
3. Las condiciones controladas de laboratorio que permitieron la germinación rápida y efectiva de las semillas de *Minthostachys spicata* fueron un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con luz fluorescente y sin AG3.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Se utilizaron solo 50 semillas por repetición debido a que los frutos se encuentran unidos al cáliz persistente, característica de la familia *Lamiceae*. Para futuras investigaciones del ensayo de germinación se recomienda emplear 100 semillas.
2. Como no se contó con protocolos específicos para las pruebas de germinación, de tetrazolio y un estudio de las características morfológicas de las semillas y frutos para el género *Minthostachys* se sugiere una mayor investigación en los parámetros que se deben tomar en cuenta.
3. Para el análisis morfológico de la semilla se recomienda utilizar un reactivo proveniente de laboratorios de buena referencia para que la tinción se produzca de manera ideal.
4. Para el ensayo de germinación de *Minthostachys spicata* se sugiere diferenciar de forma práctica entre los frutos maduros y sin desarrollar.
5. Se recomienda que una vez realizada la cosecha de semillas de *Minthostachys spicata* se proceda a una pronta prueba de germinación con los tratamientos para comparar su comportamiento.
6. En todo momento es importante mantener la asepsia de los ensayos de germinación para no contaminar las muestras.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181(1):1-20.
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, MA., & Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30(8), 453-459. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33910703.pdf>
- Bonzani N.E., Bravi V.S. & Barboza G.E. (2011). Estudios morfo-anatómicos de gineceo y fruto en especies de *Mentha* (Lamiaceae) de Argentina. *Caldasia* 33(2): 349-366. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0366-52322011000200004&lng=en&tlng=](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-52322011000200004&lng=en&tlng=)
- Campillo, M.S. (2003). *Minthostachys* spp: estudio básico de la planta y su cultivo (Tesis de pregrado). UNALM, Lima-Perú. 6-10.
- Cantino, P., & Sanders, R. (1986). Subfamilial Classification of Labiatae. *Systematic Botany* 11(1):163-185. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/2418955>
- Cruz-García, G.S., & Vael, L. (2017). El manejo de plantas silvestres alimenticias en escenarios de deforestación, ilustrado por una comunidad mestiza de la Amazonía Peruana. En A. Casas, J. Torres-Guevarra & F. Rondinel (Eds.), *Domesticación en el continente americano* (v.2, pp. 327-344). Morelia, México:

Editorial Morevalladolid. Recuperado de [http://www.iies.unam.mx/wp-content/uploads/2017/08/DOMESTICACION\\_VOL.-2-COMPLETO\\_digital-2.pdf](http://www.iies.unam.mx/wp-content/uploads/2017/08/DOMESTICACION_VOL.-2-COMPLETO_digital-2.pdf)

- Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A., & Massarini, A. (2008). *Biología* (7a ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- De Felipe, I., Briz, T., & Briz, J. (2010). Introducción, Marco Agrosocial y Metodología. En T. Briz, J. Briz, I. De Felipe, M. Flores, J. M. Gabriel y Galán, V. Gómez, M. J. Pérez, M. Puelles, S. Siura (Ed.), *Las plantas medicinales de Perú Etnobotánica y viabilidad comercial* (pp. 144). Madrid, España: Catarata. Recuperado de <http://www.reduniversitaria.es/ficheros/Plantas%20medicinales.%20LIBRO.pdf>
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Revista de Cultivos Tropicales*, 31(1), 74-85. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362010000100011&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000100011&lng=es&tlng=es)
- Duran, L. A., Castro, D. F., Sánchez, M. S., & Bonilla, C. R. (2016). Calidad fisiológica de semillas de variedades de *Ocimum* producidas bajo condiciones del Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(1), 38-43. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v65n1/v65n1a06.pdf>
- Fernández-Alonso, J. L., Vega, N., & Pérez, G. (2009). Lectin prospecting in colombian labiatae. A systematic-ecological approach - III. Mainly exotic species (cultivated or naturalised). *Caldasia*, 31(2), 227-245. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0366-52322009000200003&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-52322009000200003&lng=en&tlng=en)
- Flores, E. (2002). Chapter 1: Seed Biology. En J. A. Vozzo (Ed), *Tropical Tree Seed Manual* (pp. 74-93). United States Department of Agriculture Forest Service

Recuperado de <https://rngr.net/publications/ttsm/chapter-1-pages-82-106-seed-biology>

- Gallo, K., Arango, M., & Craviotto, R. (2017). Una prueba nueva para estimar el vigor en lotes de semillas: Prueba de Emergencia de Radícula. Para mejorar la producción, *56-INTA EEA Oliveros*, 9-13. Recuperado de <https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta.prueba-nueva-estimar-vigor-lotes-semillas.prueba-emergencia-radicula.pdf>
- Gastón de Iriarte, C. E. (2017). *Estudio de la germinación de dos especies de Teucrium protegidas en la región de Murcia* (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica de Cartagena, España. Recuperado de <http://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/7353/tfg-gas-est.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- ISTA (International Seed Testing Association). (2003). *Working Sheets on Tetrazolium Testing. Agricultural, Vegetable and Horticultural Species* (1 ed, v. 1, p. 176). Switzerland.
- ISTA (International Seed Testing Association). (2006). *Handbook for Seedling Evaluation. ISTA Germination Committee* (3 ed, p. 1-3). Switzerland.
- ISTA (International Seed Testing Association). (2010). *Handbook on Pure Seed Definitions. ISTA Purity Committee*. (3 ed., p. 18-21) Switzerland.
- ISTA (International Seed Testing Association). (2016a). Chapter 5: The Germination test. En *International Rules for Seed Testing* (p. 1-47). Switzerland.
- ISTA (International Seed Testing Association). (2016b). Chapter 6: The Tetrazolium test. En *International Rules for Seed Testing* (p. 1-10). Switzerland.

- Martin, A.C. (1946). The Comparative Internal Morphology of Seed. *The American Midland Naturalist*. 36(3), 518-521. doi: 10.2307/2421457
- Morales-Santos, M. E., Peña-Valdivia, C. B., García-Esteva, A., Aguilar-Benítez, G., & Kohashi-Shibata, J. (2017). Características físicas y de germinación en semillas y plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre, domesticado y su progenie. *Revista Agrociencia*, 51(1), 43-62. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30249773005>
- Ozden, E., Ozdamar, C., & Demir, I. (2018). Radicle Emergence Test Estimates Predictions of Percentage Normal Seedlings in Standard Germination Tests of Aubergine (*Solanum melongena* L.) Seed Lots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1), 177-182. doi: 10.15835/nbha46110871
- Pérez, F., & Pita, J. M. (1998). Germinación de semillas. *Ministerio Agricultura pesca y alimentación*, N.º 2090 HD, 1-20. Recuperado de [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1998\\_2090.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1998_2090.pdf)
- Quispe, E. (2012). *Morfología, germinación y viabilidad de semillas de Tigridia sp. (Iridaceae)* (Tesis de pregrado). UNALM, Lima-Perú.
- Rodríguez, I., Adam, G., & Durán, J. M. (2008). Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. *Agricultura Revista Agropecuaria* 78(912), 836-842. Recuperado de [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_Agri/Agri\\_2008\\_912\\_836\\_842.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Agri/Agri_2008_912_836_842.pdf)
- Ruiz, M. (2009). El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. *EEA INTA Anguil-Argentina*, 77: 5-7. Recuperado de [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-el\\_analisis\\_de\\_tetrazolio\\_en\\_el\\_control\\_de\\_calidad\\_de\\_.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-el_analisis_de_tetrazolio_en_el_control_de_calidad_de_.pdf)

- Ryding, O. (1992). The distribution and evolution of myxocarpy in Lamiaceae. En R. M. Harley & T. Reynolds (Eds.), *Advances in Labiatae Science* (pp. 85-96). Londres: The Royal Botanic Gardens. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/282862072\\_The\\_distribution\\_and\\_evolution\\_of\\_myxocarpy\\_in\\_Lamiaceae](https://www.researchgate.net/publication/282862072_The_distribution_and_evolution_of_myxocarpy_in_Lamiaceae)
- Ryding, O. (2010). Pericarp structure and phylogeny of tribe Mentheae (Lamiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 285(3), 165-175. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/227056617\\_Pericarp\\_structure\\_and\\_phylogeny\\_of\\_tribe\\_Mentheae\\_Lamiaceae](https://www.researchgate.net/publication/227056617_Pericarp_structure_and_phylogeny_of_tribe_Mentheae_Lamiaceae)
- Scandaliaris, M. (2017). *Caracterización morfológica de las núculas In Caracterización morfo-histológica de las núculas y su valor taxonómico en Lamiaceae nativas de argentina* (Tesis doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Recuperado de <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/4865/Scandaliaris%20Melina%20Caracterizaci%C3%B3n%20morfo-histol%C3%B3gica%20de%20las%20n%C3%BAculas%20y%20su%20valor%20taxon%C3%B3mico....pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Schmidt-Lebuhn, A. N. (2007). Using amplified fragment length polymorphism (AFLP) to unravel species relationships and delimitations in *Minthostachys* (Labiatae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 153(1):9-19. doi: 10.1111/j.1095-8339.2007.00588.x
- Schmidt-Lebuhn, A. N. (2008). Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 118(3), 343-353. doi: 10.1016/j.jep.2008.05.030
- Suárez, D. F., Fernández, J. L., & Melgarejo, L. M. (2011). Efecto de la luz y del ácido giberélico (AG3) en la germinación de *Minthostachys mollis* Kunth. Griseb. (Labiatae). *Acta biológica colombiana*, 16(2), 149-154. Recuperado de

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-548X2011000200012&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2011000200012&lng=en&tlng=es)

- Tello, M. (2011). *Morfología de cálices y clusas en tres especies de Minthostachys de Huánuco, Perú* (Tesis doctoral, Colegio de Postgraduados Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Montecillo, México). Recuperado de <http://text-mx.123dok.com/document/ozln4l6q-distribucion-y-diversidad-de-las-munas-genero-minthostachys-lamiaceae-en-huanuco-peru.html>
- Tello, M., Maquera, D., Romero, S., & Cotacallapa, D. (2012). Avances en la domesticación de la "muña" *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. con fines de explotación comercial en Huánuco, Perú. Simposio de mejoramiento de cultivos subutilizados, Huánuco, Perú. 48-50.
- Tello, M. (2017). Las plantas aromáticas en los Andes peruanos. En A. Casas, J. Torres-Guevarra & F. Rondinel. *Domesticación en el continente americano*. Morelia, México, Editorial Morevalladolid. v. 2, p. 345- 374. Recuperado de [http://www.iies.unam.mx/wp-content/uploads/2017/08/DOMESTICACION\\_VOL.-2-COMPLETO\\_digital-2.pdf](http://www.iies.unam.mx/wp-content/uploads/2017/08/DOMESTICACION_VOL.-2-COMPLETO_digital-2.pdf)
- Terreros, S.L. (2016). *Caracterización morfológica de arbustos con potencial para práctica de protección de suelos en las provincias de Jauja y Concepción, Junín* (Tesis de pregrado). UNALM, Lima-Perú. Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2224>
- Valdivia, C. (2015). *Prueba de tetrazolio en semillas de espárrago (Asparagus officinalis L.)* (Tesis de pregrado) UNALM, Lima, Perú. Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1627/TESIS%20PRUEBA%20DE%20TETRAZOLIO%20EN%20SEMILLAS%20DE%20ESPARRAGO%20%20CINTHIA%20VALDIVIA%20TRUJILLO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Certificado



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Departamento Académico de Biología**

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

La Molina, 8 de agosto de 2018

**CONSTANCIA**  
011-2018-HM-UNALM

Mediante la presente se informa que la muestra de "muña" proveniente de la provincia de Canta, (departamento de Lima), remitida por la Srta. Luz Fiorela Astocóndor Espinoza, ha sido estudiada en el Herbario del Dpto. de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOI) para su determinación taxonómica. El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en tal espécimen permiten concluir que corresponde a la especie *Minthostachys spicata* (Benth.) Epling de la familia Lamiaceae. La clasificación taxonómica de la especie según el sistema APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016) es la siguiente:

Clado	:	angiospermas (Angiospermae)
Clado	:	mesangiospermas (Mesangiospermae)
Clado	:	eudicotiledóneas (Eudicotyledoneae)
Clado	:	gunneríidas (Gunneriidae)
Clado	:	pentapétalas (Pentapetalae)
Clado	:	superastéridas
Clado	:	astéridas
Clado	:	euastéridas (gencianíidas)
Clado	:	lámidas
Orden	:	Lamiales
Familia	:	Lamiaceae
Género	:	<i>Minthostachys</i> (Benth.) Spach
Especie	:	<i>Minthostachys spicata</i> (Benth.) Epling

Atentamente,

  
**Mercedes Flores Pimentel**  
Jefe  
Herbario del Dpto. de Biología (MOI)  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Agraria La Molina



  
**Arturo Granda Paucar**  
Investigador Adjunto  
Herbario del Dpto. de Biología (MOI)  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Agraria La Molina

---

↑ Av. La Molina s/n La Molina – Lima – Perú    ☎ Telf: 349 6015 / 614 7800 anexo 271  
✉ fciencias@lamolina.edu.pe    📧 dptobiologia@lamolina.edu.pe

**Anexo 2. Medida de semillas de *Minthostachys spicata***

<b>Unidades (mm)</b>		
<b>Muestras</b>	<b>Largo</b>	<b>Ancho</b>
<b>N1</b>	1.5	1
<b>N2</b>	1.4	1
<b>N3</b>	1.3	1
<b>N4</b>	1.3	0.9
<b>N5</b>	1.4	0.8
<b>N6</b>	1.3	1
<b>N7</b>	1.5	1
<b>N8</b>	1.4	1
<b>N9</b>	1.4	0.9
<b>N10</b>	1.5	1
<b>Promedio</b>	1.4 mm	0.96 mm

**Anexo 3. Análisis ANVA para el porcentaje de plántulas normales**

<b>Observación</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Plántulas Normales</b>	<b>%</b>
<b>1</b>	T1R1	42	84
<b>2</b>	T1R2	44	88
<b>3</b>	T1R3	40	80
<b>4</b>	T1R4	39	78
<b>5</b>	T2R1	34	68
<b>6</b>	T2R2	37	74
<b>7</b>	T2R3	40	80
<b>8</b>	T2R4	36	72
<b>9</b>	T3R1	36	72
<b>10</b>	T3R2	34	68
<b>11</b>	T3R3	32	64
<b>12</b>	T3R4	30	60
<b>13</b>	T4R1	42	84
<b>14</b>	T4R2	39	78
<b>15</b>	T4R3	40	80
<b>16</b>	T4R4	37	74
<b>17</b>	T5R1	43	86
<b>18</b>	T5R2	38	76
<b>19</b>	T5R3	36	72
<b>20</b>	T5R4	42	84
<b>21</b>	T6R1	39	78
<b>22</b>	T6R2	41	82
<b>23</b>	T6R3	43	86
<b>24</b>	T6R4	45	90

## Anexo 4. Porcentaje de plántulas normales

Prueba de Tukey

	PORC_PLANT_NORM	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
D0:fluorescente	82.5	4.434712	4	78	88	79.5	82	85.0
D0:oscuridad	79.0	4.163332	4	74	84	77.0	79	81.0
D5:fluorescente	73.5	5.000000	4	68	80	71.0	73	75.5
D5:oscuridad	79.5	6.608076	4	72	86	75.0	80	84.5
D7:fluorescente	66.0	5.163978	4	60	72	63.0	66	69.0
D7:oscuridad	84.0	5.163978	4	78	90	81.0	84	87.0

Study: PORC\_PLANT\_NORM ~ DOSIS\_AG

HSD Test for PORC\_PLANT\_NORM

Mean Square Error: 26.5

DOSIS\_AG,means

	PORC_PLANT_NORM	std	r	Min	Max
D0	82.5	4.434712	4	78	88
D5	73.5	5.000000	4	68	80
D7	66.0	5.163978	4	60	72

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Value of Studentized Range: 3.609304

Minimum Significant Difference: 9.290014

Treatments with the same letter are not significantly different.

	PORC_PLANT_NORM	groups
D0	82.5	a
D5	73.5	ab
D7	66.0	b

Study: PORC\_PLANT\_NORM ~ DOSIS\_AG

HSD Test for PORC\_PLANT\_NORM

Mean Square Error: 26.5

DOSIS\_AG,means

	PORC_PLANT_NORM	std	r	Min	Max
D0	79.0	4.163332	4	74	84
D5	79.5	6.608076	4	72	86
D7	84.0	5.163978	4	78	90

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Value of Studentized Range: 3.609304

Minimum Significant Difference: 9.290014

Treatments with the same letter are not significantly different.

	PORC_PLANT_NORM	groups
D7	84.0	a
D5	79.5	a
D0	79.0	a

**Anexo 5. Análisis ANVA para el porcentaje de semillas no germinadas**

<b>Observación</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Semilla Fresca</b>	<b>Semilla muerta</b>	<b>Suma Total</b>	<b>%</b>
<b>1</b>	T1R1	1	7	8	16
<b>2</b>	T1R2	0	6	6	12
<b>3</b>	T1R3	0	10	10	20
<b>4</b>	T1R4	1	10	11	22
<b>5</b>	T2R1	0	14	14	28
<b>6</b>	T2R2	0	11	11	22
<b>7</b>	T2R3	0	7	7	14
<b>8</b>	T2R4	0	12	12	24
<b>9</b>	T3R1	0	9	9	18
<b>10</b>	T3R2	0	14	14	28
<b>11</b>	T3R3	0	11	11	22
<b>12</b>	T3R4	0	12	12	24
<b>13</b>	T4R1	0	6	6	12
<b>14</b>	T4R2	0	10	10	20
<b>15</b>	T4R3	0	8	8	16
<b>16</b>	T4R4	1	9	10	20
<b>17</b>	T5R1	0	4	4	8
<b>18</b>	T5R2	1	8	9	18
<b>19</b>	T5R3	0	9	9	18
<b>20</b>	T5R4	2	4	6	12
<b>21</b>	T6R1	0	9	9	18
<b>22</b>	T6R2	0	6	6	12
<b>23</b>	T6R3	0	3	3	6
<b>24</b>	T6R4	0	3	3	6

## Anexo 6. Porcentaje de semillas no germinadas

Prueba de Tukey

	PORC_SEMI_NG	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
D0:fluorescente	17.5	4.434712	4	12	22	15	18	20.5
D0:oscuridad	17.0	3.829708	4	12	20	15	18	20.0
D5:fluorescente	22.0	5.887841	4	14	28	20	23	25.0
D5:oscuridad	14.0	4.898979	4	8	18	11	15	18.0
D7:fluorescente	23.0	4.163332	4	18	28	21	23	25.0
D7:oscuridad	10.5	5.744563	4	6	18	6	9	13.5

Study: PORC\_SEMI\_NG ~ DOSIS\_AG

HSD Test for PORC\_SEMI\_NG

Mean Square Error: 23.889  
DOSIS\_AG,means

	PORC_SEMI_NG	std	r	Min	Max
D0	17.5	4.434712	4	12	22
D5	22.0	5.887841	4	14	28
D7	23.0	4.163332	4	18	28

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Value of Studentized Range: 3.609304

Minimum Significant Difference: 8.820484

Treatments with the same letter are not significantly different.

PORC_SEMI_NG groups		
D7	23.0	a
D5	22.0	a
D0	17.5	a

Study: PORC\_SEMI\_NG ~ DOSIS\_AG

HSD Test for PORC\_SEMI\_NG

Mean Square Error: 23.889  
DOSIS\_AG,means

	PORC_SEMI_NG	std	r	Min	Max
D0	17.0	3.829708	4	12	20
D5	14.0	4.898979	4	8	18
D7	10.5	5.744563	4	6	18

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Value of Studentized Range: 3.609304

Minimum Significant Difference: 8.820484

Treatments with the same letter are not significantly different.

PORC_SEMI_NG groups		
D0	17.0	a
D5	14.0	a
D7	10.5	a

**Anexo 7. Análisis ANVA para el porcentaje de germinación fisiológica**

<b>Observación</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Plántula normal</b>	<b>Plántula anormal</b>	<b>Suma total</b>	<b>%</b>
<b>1</b>	T1R1	42	0	42	84
<b>2</b>	T1R2	44	0	44	88
<b>3</b>	T1R3	40	0	40	80
<b>4</b>	T1R4	39	0	39	78
<b>5</b>	T2R1	34	2	36	72
<b>6</b>	T2R2	37	2	39	78
<b>7</b>	T2R3	40	3	43	86
<b>8</b>	T2R4	36	2	38	76
<b>9</b>	T3R1	36	5	41	82
<b>10</b>	T3R2	34	2	36	72
<b>11</b>	T3R3	32	7	39	78
<b>12</b>	T3R4	30	8	38	76
<b>13</b>	T4R1	42	2	44	88
<b>14</b>	T4R2	39	1	40	80
<b>15</b>	T4R3	40	2	42	84
<b>16</b>	T4R4	37	3	40	80
<b>17</b>	T5R1	43	3	46	92
<b>18</b>	T5R2	38	3	41	82
<b>19</b>	T5R3	36	5	41	82
<b>20</b>	T5R4	42	2	44	88
<b>21</b>	T6R1	39	2	41	82
<b>22</b>	T6R2	41	3	44	88
<b>23</b>	T6R3	43	4	47	94
<b>24</b>	T6R4	45	2	47	94

## Anexo 8. Porcentaje de germinación fisiológica

Prueba de Tukey

	PORC_GERM_FISIO	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
D0:fluorescente	82.5	4.434712	4	78	88	79.5	82	85
D0:oscuridad	83.0	3.829708	4	80	88	80.0	82	85
D5:fluorescente	78.0	5.887841	4	72	86	75.0	77	80
D5:oscuridad	86.0	4.898979	4	82	92	82.0	85	89
D7:fluorescente	77.0	4.163332	4	72	82	75.0	77	79
D7:oscuridad	89.5	5.744563	4	82	94	86.5	91	94

Study: PORC\_GERM\_FISIO ~ DOSIS\_AG

HSD Test for PORC\_GERM\_FISIO

Mean Square Error: 23.889

DOSIS\_AG,means

	PORC_GERM_FISIO	std	r	Min	Max
D0	82.5	4.434712	4	78	88
D5	78.0	5.887841	4	72	86
D7	77.0	4.163332	4	72	82

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Value of Studentized Range: 3.609304

Minimum Significant Difference: 8.820484

Treatments with the same letter are not significantly different.

PORC_GERM_FISIO groups		
D0	82.5	a
D5	78.0	a
D7	77.0	a

Study: PORC\_GERM\_FISIO ~ DOSIS\_AG

HSD Test for PORC\_GERM\_FISIO

Mean Square Error: 23.889

DOSIS\_AG,means

	PORC_GERM_FISIO	std	r	Min	Max
D0	83.0	3.829708	4	80	88
D5	86.0	4.898979	4	82	92
D7	89.5	5.744563	4	82	94

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Value of Studentized Range: 3.609304

Minimum Significant Difference: 8.820484

Treatments with the same letter are not significantly different.

PORC_GERM_FISIO groups		
D7	89.5	a
D5	86.0	a
D0	83.0	a

### Anexo 9. Índice de velocidad de germinación

Observación	Tratamiento	AG3	Luz	Repetición	IVG
1	T1	D0	fluorescente	R1	6.74411977
2	T1	D0	fluorescente	R2	6.2012987
3	T1	D0	fluorescente	R3	5.19722222
4	T1	D0	fluorescente	R4	4.125
5	T2	D5	fluorescente	R1	3.27821068
6	T2	D5	fluorescente	R2	4.82738095
7	T2	D5	fluorescente	R3	3.75
8	T2	D5	fluorescente	R4	4.58730159
9	T3	D7	fluorescente	R1	5.22619048
10	T3	D7	fluorescente	R2	2.60119048
11	T3	D7	fluorescente	R3	3.6547619
12	T3	D7	fluorescente	R4	3.3984127
13	T4	D0	oscuridad	R1	5.3770202
14	T4	D0	oscuridad	R2	5.55952381
15	T4	D0	oscuridad	R3	4.58730159
16	T4	D0	oscuridad	R4	4.72222222
17	T5	D5	oscuridad	R1	4.28849206
18	T5	D5	oscuridad	R2	3.16709957
19	T5	D5	oscuridad	R3	3.70559163
20	T5	D5	oscuridad	R4	4.57619048
21	T6	D7	oscuridad	R1	5.41349206
22	T6	D7	oscuridad	R2	4.80357143
23	T6	D7	oscuridad	R3	4.5
24	T6	D7	oscuridad	R4	7.85119048

D0: 0 ppm de AG3

D5: 5 ppm de AG3

D7: 7 ppm de AG3

**Anexo 10. Tabla de resultados de germinación desde el día 1 al día 11**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>T1R1</b>	0	0	1	16	1	15	1	1	2
<b>T1R2</b>	0	0	3	13	3	10	0	0	3
<b>T1R3</b>	0	0	0	13	0	13	2	1	0
<b>T1R4</b>	0	0	0	11	0	11	0	0	0
<b>T2R1</b>	0	0	1	7	1	6	1	1	1
<b>T2R2</b>	0	0	2	11	2	9	0	0	0
<b>T2R3</b>	0	0	0	10	0	10	0	0	0
<b>T2R4</b>	0	0	1	11	1	10	1	0	0
<b>T3R1</b>	0	0	1	13	1	12	0	0	0
<b>T3R2</b>	0	0	1	6	1	5	0	0	0
<b>T3R3</b>	0	0	4	6	4	2	0	0	0
<b>T3R4</b>	0	0	1	7	1	6	2	2	0
<b>T4R1</b>	0	0	0	13	0	13	1	3	1
<b>T4R2</b>	0	0	1	13	1	12	3	0	0
<b>T4R3</b>	0	0	1	11	1	10	1	0	0
<b>T4R4</b>	0	0	0	12	0	12	2	0	0
<b>T5R1</b>	0	0	2	9	2	7	1	1	0
<b>T5R2</b>	0	0	1	7	1	6	0	1	1
<b>T5R3</b>	0	0	3	6	3	3	1	2	1
<b>T5R4</b>	0	0	1	11	1	10	0	1	0
<b>T6R1</b>	0	0	2	12	2	10	1	1	0
<b>T6R2</b>	0	0	3	10	3	7	0	0	0
<b>T6R3</b>	0	0	0	12	0	12	0	0	0
<b>T6R4</b>	0	0	1	20	1	19	0	0	0