



**Caracterización de parámetros morfológicos y germinativos de semillas de *Polylepis pauta* Hieron. en Bosques Andinos del Ecuador.**

Delgado Carrera, Indira Lizet

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Ph. D. Segovia Salcedo, María Claudia

Fecha: 17 de febrero de 2023

2/17/23, 3:05 PM

REVISION DE TESIS

## Originality report

---

COURSE NAME  
TESIS INDIRA

STUDENT NAME  
INDIRA LIZET DELGADO CARRERA

FILE NAME  
INDIRA LIZET DELGADO CARRERA - Untitled document

REPORT CREATED  
Feb 17, 2023

---

### Summary

Flagged passages	4	0.5%
Cited/quoted passages	1	0.1%
Web matches		
scielo.org.co	1	0.2%
iucn.org	1	0.1%
uv.mx	1	0.1%
researchgate.net	1	0.1%
scielo.org.pe	1	0.1%

---

1 of 5 passages

Student passage FLAGGED

El páramo es el ecosistema natural con mayor altitud en el mundo y con mayor irradiación solar. Según datos de Beltrán y otros colaboradores (2009), la...

Top web match

extremos. El páramo es el ecosistema natural de mayor altitud en el mundo, es el ecosistema con mayor irradiación solar del planeta, tiene una flo-  
Los Páramos del MUNDO - IUCN Portal <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2003-081.pdf>

---

2 of 5 passages

Student passage FLAGGED

...semillas como un indicador de la viabilidad. En estos ensayos se pueden utilizar tanto papel filtro con agua destilada, cajas Petri o bandejas. Las condiciones se van controlando por medio del uso...

Top web match

Para la realización de este tipo de ensayos, las semillas se disponen sobre papel de filtro humedecido con agua destilada, en cajas Petri o en bandejas; ...  
Manual de prácticas de laboratorio Experiencia educativa <https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2019/02/MANUAL-FISIOLOGIA-VEGETAL-2019.pdf>

---

3 of 5 passages

Student passage FLAGGED

...en la somilla. En cambio, el ensayo con tetraxolo es un método bioquímico basado en las reacciones de las deshidrogenasas que participan en la respiración celular de los tejidos de la semilla

Top web match

La prueba de TZ es un método bioquímico basado en las reacciones de las deshidrogenasas que participan en la respiración celular de los tejidos de la semilla; cuando dichos tejidos entran en contacto...  
Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales ... [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0366-52322018000200366](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-52322018000200366)

---

4 of 5 passages

Student passage CITED

...la respiración celular de los tejidos de la semilla. Los tejidos al entrar en contacto con la solución reaccionan formando un compuesto insoluble de color rosado (Mancipe-Murillo et al.

Top web match

La prueba de TZ es un método bioquímico basado en las reacciones de las deshidrogenasas que participan en la respiración celular de los tejidos de la semilla; cuando dichos tejidos entran en contacto...

2/17/23, 3:05 PM

REVISION DE TESIS

El analisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso

... [https://www.researchgate.net/publication/280776094\\_El\\_analisis\\_de\\_tetrazolio\\_en\\_el\\_control\\_de\\_calidad\\_de\\_semillas\\_Caso\\_de\\_estudio\\_cebadilla\\_chaquena](https://www.researchgate.net/publication/280776094_El_analisis_de_tetrazolio_en_el_control_de_calidad_de_semillas_Caso_de_estudio_cebadilla_chaquena)

3 of 5 passages

Student passage FLAGGED

...cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones de ácido giberélico. Las semillas se remojaron previamente durante 24 horas en agua estéril

Top web match

Las semillas se remojaron previamente por 12 horas en agua destilada estéril para ablandar el pericarpio. Se usaron 50 semillas por placa Petri y se hicieron ...

producción de semillas en yacón (*smallanthus sonchifolius* (Poepp ... <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v13n2/a08v13n2.pdf>Firmado electrónicamente por:  
MARIA CLAUDIA  
SEGOVIA SALCEDO

---

**Segovia Salcedo, María Claudia PhD.****Directora**



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "**Caracterización de parámetros morfológicos y germinativos de semillas de *Polylepis pauta* Hieron. en Bosques Andinos del Ecuador**" fue realizado por la señorita **Delgado Carrera, Indira Lizet**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de febrero de 2023



.....

**Segovia Salcedo, María Claudia Ph. D.**

C. C.: 1709055998



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**  
**Carrera de Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Delgado Carrera, Indira Lizet**, con cédula de ciudadanía n° 1726924499, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Caracterización de parámetros morfológicos y germinativos de semillas de *Polylepis pauta* Hieron. en Bosques Andinos del Ecuador** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Sangolquí, 27 de febrero de 2023**

**Delgado Carrera, Indira Lizet**

C.C.: 1726924499

Autorización de Publicación



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo, **Delgado Carrera, Indira Lizet**, con cédula de ciudadanía n° 1726924499, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Caracterización de parámetros morfológicos y germinativos de semillas de *Polylepis pauta* Hieron. en Bosques Andinos del Ecuador** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 27 de febrero de 2023**

.....  
**Delgado Carrera, Indira Lizet**

C.C.: 1726924499

## Dedicatoria

El trabajo está dedicado principalmente a mis padres, Iván y Cecilia quienes han estado siempre pendientes y me han brindado su completo apoyo en todo sentido desde siempre.

A mi hermana Ivanna quien me ha brindado su compañía y su amistad.

A mis abuelitos, tías, tíos y primos que han sido una fortaleza y un ejemplo para salir adelante.

A mis mascotas que me dan su amor, compañía y felicidad de forma incondicional.

*Indira Lizet Delgado Carrera*

### **Agradecimientos**

A toda mi familia, en especial a mis padres y hermana por motivarme a seguir adelante y apoyarme en todo sentido.

A mi tutora Dra. María Claudia Segovia, PhD y la Dra. Karina Proaño Tuma, PhD por el tiempo, dedicación, apoyo y conocimiento que me han brindado en el desarrollo de este proyecto. Además de ser la inspiración de muchas mujeres que deseamos hacer ciencia en el Ecuador.

A la Ing. Gabriela Miño por toda su paciencia, guía y confianza en el trabajo en laboratorio. A la Ing. Gabriela Pazmiño por su apoyo y consejo en el desarrollo del proyecto.

A mis amigas Grace, Mary y Marjorie por su comprensión, paciencia y por todas las experiencias vividas en el desarrollo del trabajo. A todos mis compañeros y amigos que me acompañaron a lo largo de la carrera.

A los proyectos BIO-GEEC y HANS-BANK por el apoyo y la oportunidad de generar conocimiento en beneficio de la sociedad. A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y la carrera de Biotecnología por brindarme la oportunidad de adquirir y generar conocimiento científico a través de este proyecto.



## Índice de contenidos

Resultado del Análisis de Google Assignments .....	2
Certificación .....	4
Responsabilidad de Autoría .....	5
Autorización de Publicación.....	6
Dedicatoria.....	7
Agradecimientos .....	8
Resumen.....	14
Abstract .....	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Planteamiento de problema .....	16
Justificación .....	17
Objetivos .....	19
<i>Objetivo general</i> .....	19
<i>Objetivos específicos</i> .....	19
Capítulo II: Marco Teórico.....	20
Bosques Andinos y Páramos .....	20
<i>Generalidades y distribución</i> .....	20
<i>Importancia y amenazas</i> .....	21
Bosques de <i>Polylepis</i> .....	22
Género <i>Polylepis</i> .....	23

	10
<b>Características generales de <i>Polylepis pauta</i> Hieron.....</b>	<b>25</b>
<b><i>Distribución de Polylepis pauta</i> Hieron. en el Ecuador.....</b>	<b>28</b>
<b>Parámetros morfológicos de la semilla.....</b>	<b>29</b>
<b>Viabilidad de la semilla .....</b>	<b>30</b>
<b>Medios nutritivos y Fitohormonas.....</b>	<b>31</b>
<b>Estrategias de conservación.....</b>	<b>32</b>
<b>Capítulo III: Metodología .....</b>	<b>34</b>
<b>Material vegetal .....</b>	<b>34</b>
<b><i>Recolección e identificación de muestras</i> .....</b>	<b>34</b>
<b><i>Parámetros cuantitativos</i>.....</b>	<b>34</b>
<b><i>Parámetros cualitativos</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>Ensayos de desinfección de las semillas .....</b>	<b>37</b>
<b>Ensayos de germinación <i>in vitro</i> de las semillas .....</b>	<b>38</b>
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>39</b>
<b>Capítulo IV: Resultados .....</b>	<b>43</b>
<b>Material vegetal .....</b>	<b>43</b>
<b>Caracterización morfológica de las semillas .....</b>	<b>45</b>
<b>Parámetros cualitativos .....</b>	<b>45</b>
<b>Parámetros cuantitativos.....</b>	<b>47</b>
<b>Ensayo de viabilidad de semillas.....</b>	<b>50</b>

<b>Ensayo de desinfección .....</b>	<b>53</b>
<b>Ensayo de germinación .....</b>	<b>57</b>
<b>Capítulo V: Discusión .....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo VI: Conclusiones.....</b>	<b>72</b>
<b>Capítulo VII: Recomendaciones .....</b>	<b>74</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>75</b>

### Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Distribución del número de especies del género <i>Polylepis</i> según la sección y subsección.....	24
<b>Tabla 2</b> Taxonomía de <i>Polylepis pauta</i> Hieron.....	25
<b>Tabla 3</b> Diseño experimental para el análisis de viabilidad de las semillas de <i>Polylepis pauta</i> .....	40
<b>Tabla 4</b> Diseño experimental para el análisis de desinfección de semillas de <i>Polylepis pauta</i> . .....	41
<b>Tabla 5</b> Diseño experimental para el análisis de germinación de semillas de <i>Polylepis pauta</i> .....	42
<b>Tabla 6</b> Parámetros cualitativos de las semillas de <i>P. pauta</i> .....	46
<b>Tabla 7</b> Resumen de resultados obtenidos para los parámetros morfológicos cuantitativos de <i>P. pauta</i> . .....	48
<b>Tabla 8</b> Prueba de Shapiro Wilks para el análisis de viabilidad de las semillas de <i>P. pauta</i> . .....	51
<b>Tabla 9</b> Análisis de la varianza para la prueba de viabilidad por el método colorimétrico de tetrazolio de <i>P. pauta</i> .....	51
<b>Tabla 10</b> Prueba de Duncan para la viabilidad de <i>P. pauta</i> .....	52
<b>Tabla 11</b> Prueba de Shapiro Wilks para el análisis de desinfección de las semillas de <i>P. pauta</i> . .....	54
<b>Tabla 12</b> Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis de desinfección de las semillas de <i>P. pauta</i> .....	55
<b>Tabla 13</b> Prueba de Shapiro Wilks para el análisis de germinación de las semillas de <i>P. pauta</i> .....	58
<b>Tabla 14</b> Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis de germinación de las semillas de <i>P. pauta</i> .....	59
<b>Tabla 15</b> Comparación de los parámetros germinativos para <i>P. pauta</i> . .....	62

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Morfología de <i>P. pauta</i> . .....	27
<b>Figura 2</b> Frutos de <i>P. pauta</i> .....	28
<b>Figura 3</b> Mapa de distribución de especies de <i>Polylepis</i> , incluyendo <i>P. pauta</i> . .....	29
<b>Figura 4</b> Fruto de <i>P. pauta</i> . .....	35
<b>Figura 5</b> Coloración de semillas de la familia Rosaceae mediante la prueba de tetrazolio. ....	37
<b>Figura 6</b> Ficha técnica de <i>Polylepis pauta</i> . .....	44
<b>Figura 7</b> Frutos de <i>P. pauta</i> . .....	45
<b>Figura 8</b> Embrión y semilla de <i>P. pauta</i> vistos en el estereomicroscopio. ....	46
<b>Figura 9</b> Evaluación del color de las semillas de <i>P. pauta</i> . .....	47
<b>Figura 10</b> Fruto diseccionado de <i>P. pauta</i> . .....	48
<b>Figura 11</b> Fruto y semilla de <i>P. pauta</i> observadas en el estereomicroscopio. ....	49
<b>Figura 12</b> Semillas de <i>P. pauta</i> expuestas al tratamiento con tetrazolio. ....	50
<b>Figura 13</b> Porcentaje de semillas de <i>P. pauta</i> viables en cada tratamiento en la prueba de tetrazolio. ...	53
<b>Figura 14</b> Semillas de <i>P. pauta</i> contaminadas. ....	54
<b>Figura 15</b> Porcentaje de semillas de <i>P. pauta</i> no contaminadas a los 14 días. ....	56
<b>Figura 16</b> Progresión del porcentaje de semillas contaminadas en los días evaluados. ....	57
<b>Figura 17</b> Semillas de <i>P. pauta</i> en los ensayos de germinación. ....	58
<b>Figura 18</b> Porcentaje de germinación de semillas de <i>P. pauta</i> . ....	60
<b>Figura 19</b> Tiempo de latencia de las semillas de <i>P. pauta</i> en cada tratamiento .....	61

## Resumen

Los Bosques Andinos son sitios de alta biodiversidad que cumplen importantes funciones en el ecosistema. Los Bosques de *Polylepis* son un tipo de Bosque Andino y se encuentran en altitudes de hasta los 4500 msnm, estos bosques cumplen funciones ecológicas importantes como la protección del suelo y regulación del recurso hídrico. Lamentablemente los bosques de *Polylepis* se encuentran amenazados principalmente por las actividades humanas. En el Ecuador se han reportado 11 especies de *Polylepis*, entre estas se encuentra *Polylepis pauta* Hieron. distribuida en las provincias de Pichincha, Imbabura, Napo y Cotopaxi. El objetivo del presente estudio fue caracterizar parámetros morfológicos y germinativos de semillas de *Polylepis pauta* Hieron. en Bosques Andinos del Ecuador. Esto con el fin de establecer un banco de germoplasma con especies de importancia ecológica para proyectos de restauración. Para esto, se recolectaron frutos de *Polylepis pauta* en el Parque Nacional Cayambe Coca y en la laguna de Mojanda. Las semillas y frutos fueron sometidas a análisis de color, forma, número de semillas por fruto, tamaño (largo y ancho), peso, contenido de humedad, viabilidad. Además, se estandarizó un protocolo de desinfección determinando la concentración eficaz de hipoclorito de sodio (NaClO) y posteriormente la concentración óptima de ácido giberélico (AG3) para la germinación *in vitro* de las semillas. Los resultados revelaron que las semillas tienen un comportamiento ortodoxo debido a su capacidad de resistir la desecación, que su viabilidad se encuentra entre el 15,56 y 20%, que la concentración óptima para su desinfección fue de 5% de NaClO y que el porcentaje de germinación más alto se obtuvo germinar las semillas en un medio MS con 2mg/L de AG3 a 25 °C. Los datos obtenidos permitieron establecer que las semillas de *Polylepis pauta* son aptas para procesos de conservación y restauración de ecosistemas andinos.

*Palabras clave:* bosque andino, conservación, *Polylepis pauta*, semillas, germinación *in vitro*.

### Abstract

The Andean Forests are sites of high biodiversity that fulfill important functions in the ecosystem. The *Polylepis* Forests are a type of Andean Forest and are found at altitudes up to 4500 meters above sea level. These forests fulfill important ecological functions such as soil protection and regulation of water resources. Unfortunately, *Polylepis* forests are threatened mainly by human activities. In Ecuador, 11 species of *Polylepis* have been reported, including *Polylepis pauta* Hieron. distributed in the provinces of Pichincha, Imbabura, Napo and Cotopaxi. The objective of this study was to characterize morphological and germinative parameters of *Polylepis pauta* Hieron seeds. in Andean Forests of Ecuador. This to establish a germplasm bank with species of ecological importance for restoration projects. For this, *Polylepis pauta* fruits were collected in the Cayambe Coca National Park and in the Mojanda lagoon. The seeds and fruits were subjected to analysis of color, shape, number of seeds per fruit, size (length and width), weight, moisture content, and viability. In addition, a disinfection protocol was standardized determining the effective concentration of sodium hypochlorite (NaClO) and subsequently the optimal concentration of gibberellic acid (AG3) for in vitro germination of the seeds. The results revealed that the seeds have an orthodox behavior due to their ability to resist desiccation, that their viability is between 15.56 and 20%, that the optimal concentration for their disinfection was 5% NaClO and that the highest germination percentage was obtained by germinating the seeds in an MS medium with 2mg/L of AG3 at 25 °C. The data obtained allowed us to establish that the seeds of *Polylepis pauta* are suitable for processes of conservation and restoration of Andean ecosystems.

*Keywords:* andean forest, conservation, *Polylepis pauta*, seeds, *in vitro* germination.

## Capítulo I: Introducción

### Planteamiento de problema

Ecuador es uno de los países con mayor diversidad biológica a nivel mundial debido a la cantidad de puntos calientes de biodiversidad que se encuentran en el territorio nacional. El país cuenta con alrededor de 23056 especies tanto de plantas como de animales, lo que representa el 6,1% de las especies reportadas en todo el mundo. Esta riqueza está determinada por factores como la ubicación, condiciones geográficas, atmosféricas y climáticas, así como la presencia de la cordillera de los Andes, el callejón interandino, corrientes marinas y la actividad volcánica que favorece la formación de microambientes con diferentes ecosistemas (Bravo, 2014).

La cordillera de los Andes cubre una extensión de territorio que abarca desde el oeste de Venezuela hasta la frontera entre Bolivia, Chile y Argentina, la cual se caracteriza por pendientes empinadas, quebradas, valles y picos que generan una gran diversidad ecosistémica (Cuesta et al., 2009). Entre estos ecosistemas se encuentra el Bosque Andino el cual es importante en la regulación hídrica y mantenimiento de la calidad del agua. Los Bosques Andinos son ecosistemas boscosos de montaña con un rango de elevación que va desde los 1000 msnm hasta los 3500 msnm, además son de importancia debido a factores como su alta diversidad y endemismo (Quintero Vallejo *et al.*, 2017). En el Bosque Andino se distinguen esencialmente 3 tipos de ecosistema, el bosque sub andino húmedo, el bosque altoandino húmedo y finalmente la región a partir de los 3300 msnm que se considera páramo.

El páramo es el ecosistema natural con mayor altitud en el mundo y con mayor irradiación solar. Según datos de Beltrán y otros colaboradores (2009), la superficie de los ecosistemas de páramo en el Ecuador asciende a 1835834 hectáreas, siendo un aproximado del 7% del territorio nacional, distribuido en 16 provincias. Se ha reportado además que los páramos albergan cerca de 125 familias, 500 géneros



y 3.400 especies de plantas vasculares y de 130 familias, 365 géneros y 1300 especies de plantas no vasculares, lo que muestra su gran biodiversidad (Mena & Medina, 2019).

En los últimos años debido a las actividades de origen antropogénico como la quema de combustibles, deforestación, uso del suelo y necesidad de botaderos de basura se han generado cambios en el medio ambiente (Isch López, 2012). La deforestación es uno de los principales factores que amenaza a los diferentes ecosistemas en el Ecuador, debido a la fragmentación de los bosques. Este efecto genera cambios en la abundancia de las especies y en sus relaciones ecológicas, reduciendo el tamaño del ecosistema a parches o islas lo que puede reducir la variabilidad genética (Chamorro et al., 2015; Galván, 2015).

Debido al alto porcentaje de amenazas que aquejan a este tipo de ecosistemas, es de gran importancia plantear alternativas para la conservación de los recursos genéticos de las especies de los bosques andinos a nivel *in situ* como *ex situ*.

### **Justificación**

Los Bosques Andinos son sitios de alta biodiversidad que cumplen importantes funciones en el ecosistema. Lamentablemente, estos bosques enfrentan problemas de origen antropogénico como la tala de bosques, incendios forestales, quema de combustibles o sobreexplotación de los recursos, lo que genera la degradación de los bosques. Otros factores indirectos que influyen en la pérdida de estos ecosistemas son el cambio climático, la fragmentación y la propagación de especies invasoras (Bustamante et al., 2016). La degradación de los bosques es una de las principales causas de la pérdida de diversidad y funciones ecosistémicas, las cuales pueden ser irreversibles y tener graves afectaciones a nivel social, cultural y ecológico (Sasaki & Putz, n.d.).

La importancia de la conservación de los bosques andinos y páramos radica en su función como reservorios de biodiversidad. La regulación hídrica es el valor más importante de los páramos andinos

debido a que genera un balance hídrico positivo, protege de la erosión y evita la desecación del suelo (Hofstede et al., 2003). La conservación y manejo sustentable de los páramos es un tema de interés tanto para organizaciones no gubernamentales, como para empresas y gobiernos sectoriales debido a la preocupante destrucción de este tipo de ecosistemas.

Los páramos albergan gran cantidad de bosques andinos como los bosques de *Polylepis* que se caracterizan por ser densos y cumplir funciones ecosistémicas importantes como la protección del suelo, la regulación del recurso hídrico y la mitigación de emisiones de dióxido de carbono (Camel et al., 2019; Castro & Flores, 2015). Estos bosques alojan gran cantidad de plantas y animales andinos que cumplen funciones biológicas específicas, además de ser considerados ecosistemas altamente vulnerables que requieren de planes de conservación para sus recursos genéticos.

Por lo antes mencionado, este trabajo pretende caracterizar tanto parámetros morfológicos como de germinación de semillas de *Polylepis pauta* Hieron. obtenidas del Parque Nacional Cayambe Coca, para preservar el contenido genético de esta especie con fines de conservación en el banco de semillas HANS-BANK, proyecto que es parte de la cooperación entre universidades alemanas y ecuatorianas BIO-GEEC.

## Objetivos

### **Objetivo general**

- Caracterizar parámetros morfológicos y germinativos de semillas de *Polylepis pauta* Hieron. en Bosques Andinos del Ecuador.

### **Objetivos específicos**

- Recolectar de forma aleatoria muestras de semillas de la especie *Polylepis pauta* Hieron. en diferentes parches de Bosques Andinos del Ecuador.
- Identificar parámetros morfológicos cualitativos y cuantitativos de semillas de la especie *Polylepis pauta* Hieron. a partir de muestras recolectadas en Bosques Andinos del Ecuador.
- Analizar semillas de la especie *Polylepis pauta* Hieron. mediante la coloración del embrión con la prueba de Tetrazolio para establecer su viabilidad.
- Determinar los parámetros germinativos de las semillas de la especie *Polylepis pauta* Hieron. mediante el uso de diferentes tratamientos de germinación a nivel *in vitro*.

## Hipótesis

Los parámetros morfológicos y los tratamientos germinativos aplicados producen un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de germinación de las semillas de *Polylepis pauta* Hieron.

## Capítulo II: Marco Teórico

### **Bosques Andinos y Páramos**

La cadena montañosa de los Andes es considerada un punto de alta biodiversidad, donde se encuentran varios tipos de ecosistemas de montaña como es el bosque andino. Este bosque comprende un territorio cubierto de árboles que se desarrollan en altitudes desde los 2400 a 3300 msnm. En dependencia de la altitud se reconocen varias zonas que difieren en especies y funciones, en su mayoría estos bosques se encuentran como mosaicos aislados debido a la fragmentación que sufren por actividades antrópicas. Ciertos parches de bosque andino se encuentran sobre los 3200 msnm hasta los 4500 msnm los cuales forman parte del páramo.

Los páramos andinos son ecosistemas de alta montaña, importantes en la gestión de los recursos hídricos de los países sudamericanos, los cuales reciben una alta cantidad de precipitaciones y neblina que proporciona un alto contenido de humedad relativa (60%) (Camacho, 2014). En cuanto a las características de temperatura se conoce que puede haber una diferencia de más de 20°C entre el día y la noche. Los páramos cumplen también funciones importantes como corredores biológicos acogiendo a varias especies de animales como el oso andino, el cóndor, el puma y otros que merodean por los bosques altoandinos presentes en el páramo (Hofstede et al., 2003). Así mismo, la flora endémica juega un papel importante en el páramo debido a las adaptaciones morfológicas de las plantas al ambiente y sus condiciones de vida extrema.

### ***Generalidades y distribución***

Los páramos en el Ecuador se caracterizan por precipitaciones que oscilan en un rango entre los 500 y 3000 mm por año, mientras que el promedio de la temperatura varía entre 2 y 10°C, teniendo un pico máximo de 20°C.

En el Ecuador los páramos se encuentran en 16 provincias, aunque aproximadamente el 60% de estos se sitúan en las provincias de Chimborazo, Azuay, Napo y Pichincha. Según Hofstede y sus colaboradores (2003) existen varios tipos de páramo presentes en el país. El páramo de pajonal es el más extenso, está cubierto por pajonales de varios géneros y se encuentra matizado principalmente por manchas de bosques de *Polylepis*, *Buddleja*, *Oreopanax* y *Miconia*. Por otra parte, el páramo arbustivo del sur está conformado por vegetación arbustiva y herbácea por lo que tiene más elementos de bosque andino que de páramo.

Los diferentes tipos de páramos están distribuidos de forma heterogénea, por ejemplo, en la provincia de Pichincha se dispone de varios tipos de páramo, incluyendo el de pajonal, herbáceo de almohadillas, herbáceo de pajonal y almohadillas, pantanoso, seco, superpáramo, superpáramo azonal.

### ***Importancia y amenazas***

Los ecosistemas de los bosques andinos son considerados como los de mayor riqueza y diversidad biológica en la Tierra, ya que albergan más de 45000 plantas vasculares y 3400 especies de vertebrados. Existen más de 20000 plantas endémicas, así como también 1567 animales vertebrados endémicos en el territorio de los andes tropicales, lo que representa el 1% de las especies existentes en la masa continental de la Tierra.

Lamentablemente, los bosques andinos y páramos se ven afectados debido a varias actividades tanto de origen antropogénico como no antropogénico. Estas actividades no se encuentran limitadas a las comunidades indígenas y campesinas que habitan en estos territorios, si no que se ha visto también influenciada por otros actores externos como empresas públicas y privadas (Beltrán et al., 2009).

Las actividades que afectan principalmente a estos hábitats son quema de combustibles, deforestación, uso del suelo y urbanización. Actualmente, las consecuencias de estas actividades son visibles debido a la pérdida de especies y a la fragmentación de los bosques. La fragmentación de estos

bosques tiene una serie de repercusiones a nivel de organización biológica debido a que reducen su tamaño, generan alteraciones de los microhábitats, reduce la densidad arbórea y cambia la estructura de la vegetación. Adicionalmente, los fenómenos naturales como las erupciones volcánicas, temblores, entre otros son potenciales factores que pueden afectar a estos ecosistemas y a sus especies.

### **Bosques de *Polylepis***

Los bosques de *Polylepis* se encuentran en altitudes de hasta los 4500 msnm, además se conoce que al 2002 solo quedaba un diez por ciento del área del bosque original debido a las amenazas que aquejan a estos ecosistemas. Una de las amenazas que experimentan los bosques de *Polylepis* es el crecimiento de plantas exóticas en los alrededores las cuales causan sombra a los árboles nativos y no permiten el desarrollo normal de los árboles (Amanda, 2002). Otra de estas amenazas es el uso humano de la tierra, que incluye tanto los efectos directos de la extracción de madera y efectos indirectos del pastoreo, lo que convierte a estos bosques en uno de los ecosistemas más amenazados en el mundo (Camel *et al.*, 2019).

Además de las funciones ecológicas los bosques de *Polylepis* tienen una relevancia a nivel social y cultural para los habitantes de los sitios aledaños por sus diferentes usos como fuente de carbón y madera, agroforestería y dormideros para el ganado (Romoleroux *et al.*, 2016). También se ha demostrado que algunas especies del género *Polylepis* poseen actividad antihipertensiva y funcionan como tratamiento de enfermedades respiratorias debido a la presencia de ácidos triterpénicos en las hojas y corteza (Daud Thoene *et al.*, 2008). En cuanto a la conservación de los bosques las condiciones de acceso son un factor importante, debido a que los parches con mayor facilidad de acceso se ven más afectados que los que se encuentran en zonas húmedas con menor acceso.

Al ser parte de los ecosistemas más amenazados hay muchas iniciativas de conservación de los bosques de *Polylepis* por medio de la reforestación, sin embargo, un obstáculo importante es la baja

tasa de germinación de las semillas por lo que se prefiere la reproducción vegetativa a través de los esquejes, lo que no contribuye a la diversidad genética.

### **Género *Polylepis***

En los ecosistemas boscosos altoandinos los árboles de *Polylepis* son el género dominante. Estos árboles brindan servicios ambientales como la protección del suelo, regulación del recurso hídrico y la mitigación de emisiones de dióxido de carbono (Camel et al., 2019; Castro & Flores, 2015). Su nombre se deriva de dos palabras griegas, *poly* que significa muchas y *lepis* que significa láminas, lo que hace referencia a las láminas exfoliantes que conforman su corteza. El género *Polylepis* abarca varias especies entre árboles y arbustos, los árboles miden entre 2 a 10 m a pesar de que algunos de estos pueden superar los 25 m de altura y 2 m de diámetro.

En cuanto a la taxonomía del género *Polylepis* hay un escaso conocimiento debido a la alta variabilidad, poliploidización e incluso su reproducción asexual. Desde el primer trabajo en que se describió el género en 1911 hasta la fecha, aún no se llega a un consenso en cuanto a la cantidad de especies. Sin embargo, en el estudio de Boza Espinoza & Kessler realizado en el 2022 según la distinción morfológica, ecológica y biogeográfica se reconocen 45 especies de *Polylepis* distribuidas en secciones y subsecciones. En la Tabla 1. se muestra la cantidad de especies por cada sección y subsección.

**Tabla 1**

*Distribución del número de especies del género Polylepis según la sección y subsección.*

<b>Sección</b>	<b>Subsección</b>	<b>Número de especies</b>
	<i>Lanuginosae</i>	2
<b><i>Sericeae</i></b>	<i>Pauta</i>	3
	<i>Sericeae</i>	9
	<i>Pepea</i>	2
<b><i>Reticulatae</i></b>	-	7
<b><i>Australes</i></b>	-	2
<b><i>Subsericantes</i></b>	-	3
	<i>Racemosae</i>	7
<b><i>Incanaeae</i></b>	<i>Besseria</i>	5
	<i>Incanaeae</i>	6

*Nota.* Información recopilada de A monograph of the genus *Polylepis* (Rosaceae), por Boza Espinoza & Kessler, 2022.

En el Ecuador se han reportado diez especies de *Polylepis* nativas distribuidas a lo largo de las cordilleras Occidental y Oriental en un rango de los 2700 hasta 4350 msnm (Boza Espinoza & Kessler, 2022). Entre las especies de *Polylepis* reportadas en el país se encuentran *Polylepis lanuginosa*, *Polylepis pauta*, *Polylepis longipilosa*, *Polylepis ochreatea*, *Polylepis humboldtii*, *Polylepis loxensis*, *Polylepis reticulata*, *Polylepis simpsoniae*, *Polylepis incana* y *Polylepis microphylla*.



### Características generales de *Polylepis pauta* Hieron.

*Polylepis pauta* Hieron. es una especie de árboles del género *Polylepis* que usualmente están restringidos a pequeños parches aislados a altitudes de entre 2600 y 4500 msnm. En los parches de bosque se encuentra junto a especies como *Gynoxys acostae*, *Solanum stenophyllum* y *Hesperomeles obtusifolia*. En cuanto a la descripción taxonómica *Polylepis pauta* pertenece a la orden de los rosales, familia Rosaceae, y género *Polylepis*. Además, en el estudio de Boza Espinoza & Kessler (2022) se describe que *P. pauta* pertenece a la sección *Sericeae* y subsección *Pauta* junto con *Polylepis longipilosa* y *Polylepis serrata*. La sección *Sericeae* se caracteriza por tener la superficie de sus folíolos y/o vainas de las estípulas con pelos seríceos, lanados o vellosos y frutos con espinas aplanadas. Las tres especies mencionadas de la subsección *Pauta* se caracterizan por ser árboles que tienen de 4 a 6 pares de folíolos laterales, la superficie del envés de las hojas lanada o serícea y los frutos con espinas aplanadas o delgadas densamente vellosos. La descripción taxonómica de *Polylepis pauta* se muestra en la Tabla 2.

### Tabla 2

#### Taxonomía de *Polylepis pauta* Hieron.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Rosaceae
<b>Tribu</b>	<i>Sanguisorbeae</i>
<b>Género</b>	<i>Polylepis</i>
<b>Sección</b>	<i>Sericeae</i>

**Subsección***Pauta***Especie***Polylepis pauta* Hieron.

---

Los árboles de *P. pauta* tienen un tamaño aproximado de 2 a 12 m de altura. En la figura 1, se puede apreciar la morfología de *P. pauta* en relación con el tallo, hojas e inflorescencia. Los tallos son retorcidos con una corteza rojiza exfoliante y delgada (Fig. 1A). Las hojas están concentradas en las puntas de las ramas. Son imparipinnadas con 4 a 6 pares de hojas con folíolos de contorno elíptico y margen almendrado con 4 a 6 dientes (Fig. 1B). La superficie superior es lampiña, mientras que la inferior es escasamente seríceo con pelos blanquecinos. Además, en los puntos de inserción de los folíolos tienen un mechón de pelo blanquecino largo y recto (Fig. 1C). Las inflorescencias se presentan en racimos simples colgantes con 9 a 21 flores (Fig. 1D), las cuales se conforman de 4 sépalos ovados verdes y de 9 a 15 anteras (Fig. 1E).

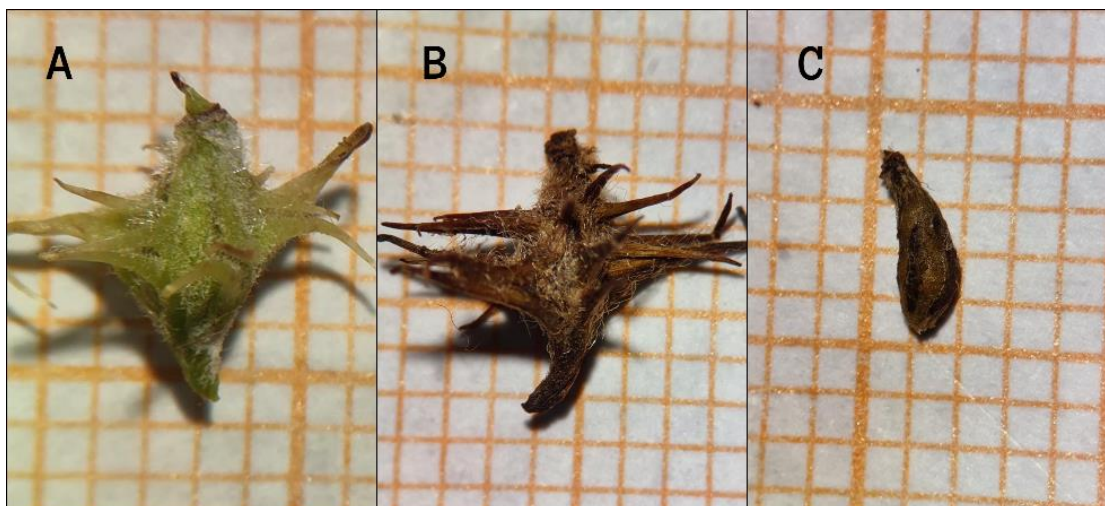
**Figura 1**

*Morfología de P. pauta.*



*Nota.* (A) Tallo, (B) Hojas, (C) Mechón de pelos blancuicinos en las inserciones de los foliolos, (D) Inflorescencia y (E) Flor.

Los frutos son aquenios, es decir son secos, pequeños, monospermos, e indehiscentes, en los cuales el pericarpio es delgado, tienen varias espinas aplanadas densamente seríceas. En la figura 2 se puede apreciar un fruto maduro (Fig. 2A) y un fruto inmaduro (Fig. 2B) de *P. pauta*. La semilla por su parte se adhiere al pericarpio del fruto cuando llega a un estado de madurez (Fig. 2C).

**Figura 2***Frutos de P. pauta*

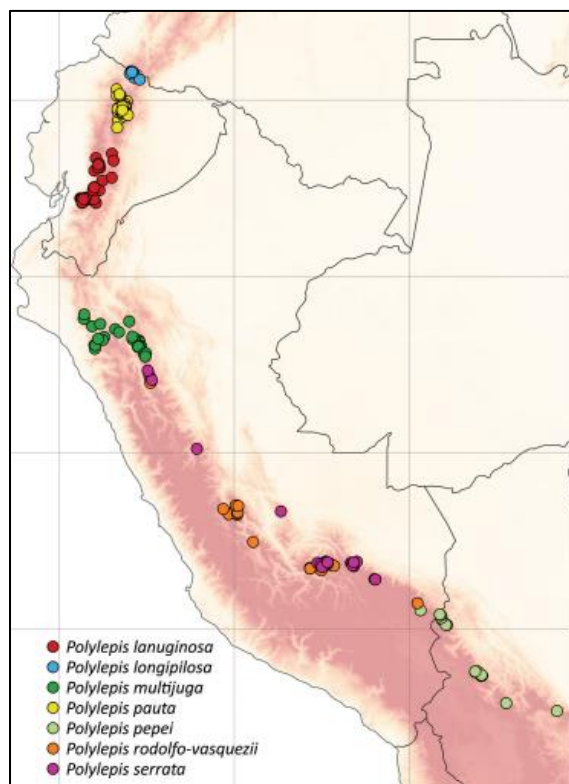
*Nota.* (A) Fruto inmaduro, (B) fruto maduro y (C) semilla.

#### ***Distribución de Polylepsis pauta* Hieron. en el Ecuador**

*Polylepsis pauta* se encuentra distribuida en parches de bosque en el noreste de la cordillera oriental del Ecuador en las provincias de Cotopaxi, Imbabura, Napo y Pichincha. Se han reportado ejemplares de esta especie específicamente en el Paso de la Virgen en la vía Quito-Baeza (Cotopaxi), Lagunas de Mojanda, Reserva Ecológica Cotacachi Cayapas (Imbabura), Oyacachi, Volcán los Puntos, páramo de Papallacta, Paso de la Virgen, Laguna de Papallacta, Reserva Ecológica Antisana, páramo de Guamaní (Napo), Páramo de la Virgen camino antiguo, Vía a Papallacta (Pichincha). En la Figura 3 se observa una representación de la distribución de algunas especies del género *Polylepsis*, tanto en el Ecuador como en parte de Sudamérica.

**Figura 3**

Mapa de distribución de especies de *Polylepis*, incluyendo *P. pauta*.



*Nota.* Tomado de A monograph of the genus *Polylepis* (Rosaceae), por Boza Espinoza & Kessler, 2022.

### Parámetros morfológicos de la semilla

La funcionalidad de una semilla está en estrecha relación con la variación de los parámetros morfológicos, tanto de los frutos como de las semillas. Los parámetros morfológicos de la semilla permiten predecir la dinámica de la vegetación, es decir, su supervivencia, transmisión de genes y estrategias de dispersión. Sin embargo, no siempre son considerados en los estudios a pesar de su importancia en la ecología de las plantas.

En las semillas se pueden distinguir varios parámetros tanto cuantitativos como cualitativos. Los parámetros cuantitativos son aquellos que pueden ser expresados en números. Entre estos parámetros

tenemos al dimensionamiento de la semilla que incluye largo, ancho y grosor, siendo factores importantes para indicar el rendimiento productivo de las plantas (Harper et al. 1970, Susko y Lovett-Doust 2000). El peso o la masa es otro factor de importancia debido a la relación que existe entre la capacidad de penetración y permanencia en el suelo (Haig, 1996; Bekker et al., 1998; Turnbull, 1999). El número de semillas por fruto es importante en la determinación de las estrategias reproductivas de las plantas además de ser muy útil para programas de recolección de semillas con fines de conservación *ex situ* (Romero-Saritama & Granda, 2020).

Los parámetros cualitativos en cambio son datos que no pueden ser expresados con números. En las características de las semillas hay varios parámetros cuantitativos como el color, la forma, el tipo de embrión y la textura. Estas características son importantes debido a que la variedad de formas es el resultado de las adaptaciones de la planta para lograr su dispersión y colonización exitosa (Harper et al. 1970, Baskin & Baskin, 2014)

### **Viabilidad de la semilla**

La viabilidad de las semillas hace referencia a su capacidad de germinar y por ende formar plántulas normales en condiciones ambientales no favorables. En la evaluación de la viabilidad se distinguen varios métodos como el ensayo topográfico al tetrazolio, los ensayos de germinación y la radiografía con rayos X (Pérez & Pita, 2014). Los ensayos de germinación se basan en la capacidad germinativa de las semillas como un indicador de la viabilidad. En estos ensayos se pueden utilizar tanto papel filtro con agua destilada, cajas Petri o bandejas. Las condiciones se van controlando por medio del uso de cámaras de germinación. El indicador de la viabilidad en este ensayo es el apareamiento de la radícula. El uso de técnicas de cultivo *in vitro* mejora la respuesta en la germinación de una semilla debido a que aportan con factores físicos como humedad y temperatura controlados que favorecen el proceso. Además, al trabajar a nivel *in vitro* se disminuye el tiempo de dormancia de las semillas (Bardales Manrique, 2004).

Por otra parte, la radiografía con rayos X es un método usualmente utilizado para especies forestales en el que se requiere de un equipo de radiografía que permite identificar la presencia o ausencia del embrión en la semilla. En cambio, el ensayo con tetrazolio es un método bioquímico basado en las reacciones de las deshidrogenasas que participan en la respiración celular de los tejidos de la semilla. Los tejidos al entrar en contacto con la solución reaccionan formando un compuesto insoluble de color rosado (Mancipe-Murillo et al., 2018). En caso de una coloración parcial se deduce la existencia de tejido muerto, por lo que el tamaño y posición de estas áreas muertas va a indicar si la semilla es viable o no.

### **Medios nutritivos y Fitohormonas**

El cultivo de tejidos consiste en cultivar en medios nutritivos y de forma aséptica diferentes partes de las plantas (ápices, hojas, flores, frutos, etc.), con el fin de obtener células, órganos o tejidos a nivel *in vitro*. Los medios nutritivos que se utilizan en este proceso aportan las sustancias esenciales para el crecimiento. Algunos de los componentes fundamentales son los macronutrientes (H, N, O, S, Mg, Ca, K, P), los micronutrientes (Fe, Mo, Ni, Cu, Zn, Mn), los carbohidratos, las vitaminas, el mio inositol, y las hormonas vegetales o reguladores de crecimiento.

El medio Murashige & Skoog (MS) fue inventado en 1962 y se ha convertido en el medio de cultivo más comúnmente utilizado en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, el cual es apto para la mayoría de las especies a excepción de las más sensibles a la salinidad por su elevada concentración salina. Este medio puede ser suplementado con sacarosa, reguladores de crecimiento y gelificantes en dependencia de las necesidades nutricionales de la especie de estudio.

Las fitohormonas conocidas también como fitorreguladores, son compuestos que regulan los procesos metabólicos de las plantas. Entre estas fitohormonas se encuentran las auxinas que se encuentran involucradas en la división y elongación celular, las citoquininas que están relacionadas en la

división celular y morfogénesis de tejidos, las giberelinas relacionadas con la maduración del polen y desarrollo de flores, frutos y semillas, el ácido abscísico participa en la apertura estomática y el etileno que está involucrado en la expansión y división celular (Ricardo et al., 2020).

El ácido giberélico es una fitohormona naturalmente producida en la zona apical, frutos y semillas, cuya principal función es la regulación de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Tipán, 2011). Otras de sus funciones es el incremento del crecimiento de tallos, interrupción del periodo de latencia de las semillas y la inducción de brotación de yemas.

### **Estrategias de conservación**

La conservación de la biodiversidad es un tema de importancia debido a los beneficios que ofrecen las especies en el funcionamiento de los ecosistemas. La pérdida de diversidad genética ocurre de forma acelerada, lo que implica que tanto plantas como animales no sean capaces de adaptarse a las condiciones cambiantes del ecosistema. Con el fin de conservar la diversidad genética se han desarrollado varias técnicas separadas en dos tipos de estrategias, *in situ* y *ex situ*.

Las estrategias *in situ* se refieren a la conservación de ecosistemas, hábitats y el mantenimiento de las poblaciones en su espacio natural. Un ejemplo de esta técnica es la conservación genética en reservas con el objetivo de contener un número adecuado de individuos para mantener la diversidad genética en espacios delimitados y protegidos. La ventaja de esta técnica en el área vegetal es que funciona para la conservación de plantas con semillas ortodoxas y no ortodoxas (Maxted, 2013).

Por otra parte, las estrategias *ex situ* se refieren a las técnicas empleadas fuera del hábitat de los recursos genéticos. Para la conservación *ex situ* de plantas se aplican varias técnicas como son los bancos de genes. Los bancos tienen el objetivo de almacenar, mantener y reproducir a las especies garantizando la seguridad y disponibilidad de los cultivos para los agricultores, mejoradores e



investigadores. El inconveniente de la técnica es la reproducción del material vegetal debido a la alta probabilidad de muerte de las muestras.

El banco de semillas es una de las formas más eficientes para almacenar recursos genéticos, aunque existen algunas limitaciones como la pérdida de viabilidad y susceptibilidad a ataques de patógenos. Esta técnica no es aplicable para los cultivos de propagación vegetativa, ya que únicamente se pueden mantener clones de especies endogámicas y apomícticas. En los bancos se almacenan las semillas desecadas, sin embargo, debido a la desecación las semillas recalcitrantes pierden su viabilidad y por tanto no pueden ser almacenadas.

## Capítulo III: Metodología

### Material vegetal

#### *Recolección e identificación de muestras*

El material vegetal fue obtenido de forma aleatoria en dos zonas del Parque Nacional Cayambe Coca, correspondientes a dos puntos de muestreo: el Bosque de *Polylepis* y los bordes del camino viejo a Pifo. Adicionalmente, se recolectaron muestras en el camino a la laguna de Mojanda. El muestreo fue realizado entre los meses de noviembre de 2022 a enero de 2023. Se tomaron fotografías de las plantas con la aplicación Timestamp camera free v1.212 que arroja datos de coordenadas, altitud, fecha y hora de recolección. Los frutos fueron recolectados en bolsas de papel y se etiquetaron con el código de accesoión correspondiente a la ficha técnica de recolección del proyecto BIO-GEEC.

Luego de la recolección, las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, campus Matriz. En el laboratorio, las muestras fueron colocadas en cajas Petri y fundas de papel junto con sílica gel para secarlas. Finalmente fueron almacenadas en un lugar seco.

Las especies recolectadas fueron identificadas por medio de la visualización de las colecciones del herbario del Instituto Nacional de Biodiversidad- INABIO. Además, se utilizaron herramientas tecnológicas como la aplicación Flóramo v3.0.11-alpha para confirmar los resultados.

#### *Parámetros cuantitativos*

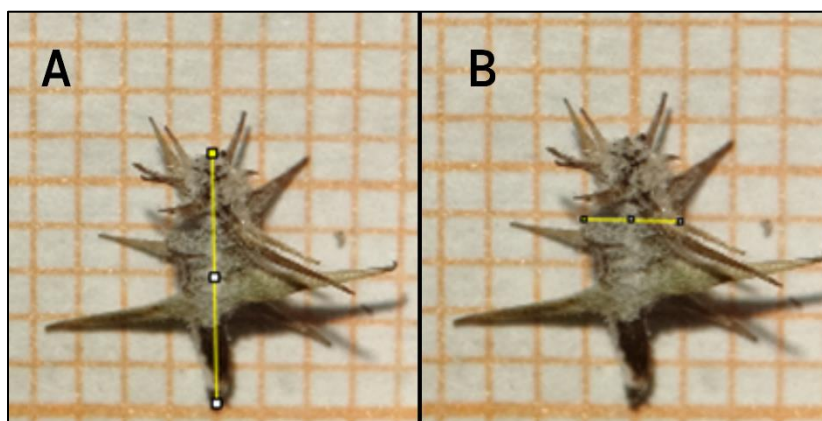
El análisis de los parámetros morfológicos cuantitativos permite obtener información del número de semillas por fruto, peso y dimensiones (largo y ancho). En la determinación del número de semillas por fruto se tomó en cuenta las características de los frutos, los cuales son de tipo aquenio e indehiscentes. En este proceso se realizaron disecciones de 50 frutos con un proceso previo de remojo durante 24 horas y escarificación con NaClO al 5% debido a la dificultad de separación de la semilla del

fruto. El peso promedio, debido a la complejidad de separación del fruto y la semilla, se obtuvo pesando en una balanza analítica calibrada (0,0001 g) 10 lotes de 100 frutos cada uno. El valor del peso de cada grupo se dividió para 100 y se obtuvo el peso de cada semilla.

Las dimensiones del fruto y semilla se obtuvieron midiendo el largo y ancho de 100 frutos y semillas seleccionados al azar. Se tomaron fotografías con el estereomicroscopio, utilizando como referencia papel milimetrado. Luego, mediante el uso del software ImageJ v 1.49 se obtuvieron las dimensiones de cada fruto y semilla. Debido a la forma del fruto, se consideró el largo como la zona más lejana entre los polos (Fig. 4A) y el ancho como la zona horizontal más amplia del fruto (Fig. 4B). De igual manera para la semilla se consideró el largo como la zona más lejana entre los polos y el ancho como la zona horizontal más amplia de la semilla.

#### Figura 4

Fruto de *P. pauta*.



*Nota.* (A) Medición del largo del fruto, (B) Medición del ancho del fruto.

Para la determinación de la humedad relativa de las semillas, se seleccionaron 100 semillas al azar y se dividieron en 4 lotes de 25 semillas. En primer lugar, se pesaron individualmente los 4 lotes de semillas en una balanza analítica de precisión y se registró su peso. A continuación, se procedió a

secarlas en la estufa a 103°C durante 17 horas, siguiendo los lineamientos de la normativa ISTA. Luego del secado se procedió a pesarlas nuevamente para calcular el porcentaje de humedad relativa mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad relativa} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

### **Parámetros cualitativos**

Los parámetros cualitativos evaluados en las semillas de *P. pauta* fueron el tipo de embrión, color y forma. El tipo de embrión de las semillas de *P. pauta* se evaluó a través de la disección de 25 semillas y se identificó en base a la clasificación de embriones realizada por Martin (1946). La forma de las semillas se identificó mediante observación en el estereomicroscopio y comparando con el manual de descriptores morfológicos. Finalmente, el color se determinó a través de la comparación de 50 semillas maduras con una paleta Munsell para obtener el color predominante.

### **Ensayos de viabilidad**

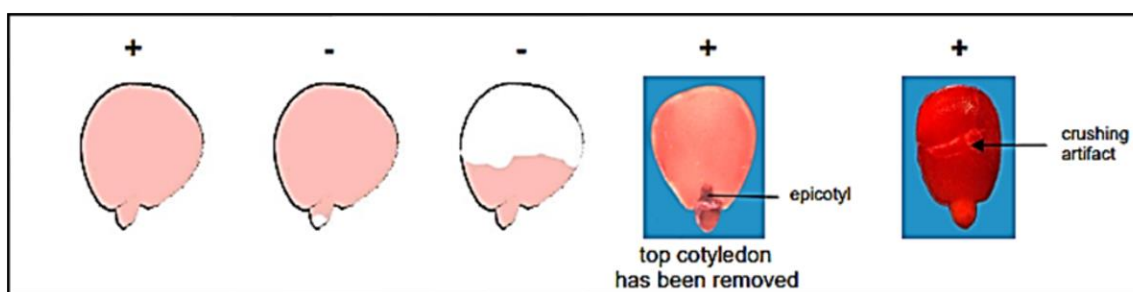
Para evaluar la viabilidad de las semillas de *Polylepis pauta* se siguió el método colorimétrico de Tetrazolio. La preparación de las soluciones de tetrazolio requiere de una solución tampón previamente elaborada. La solución tampón se preparó en base a dos componentes, el primer componente se preparó diluyendo 3,631 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 400 mL de agua destilada y el segundo componente diluyendo 5,683 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 600 mL de agua destilada. Para la solución de tetrazolio al 1% se disolvieron 5 g de Cloruro de 2, 3, 5-Trifenil-2H-Tetrazolio (TZ) en 500 mL de la solución tampón, mientras que para la solución al 0,5% se disolvieron 2,5 g de TZ en 500 mL de la solución tampón.

A continuación, se seleccionaron 180 semillas al azar y se las sumergió en agua destilada durante 18 horas a temperatura ambiente. Luego se realizó un corte longitudinal y un corte transversal

a la semilla para exponer al embrión al tetrazolio. Posteriormente, las semillas se sumergieron en la solución de tetrazolio en cajas Petri cubiertas con papel aluminio y se las incubó a 30°C durante 24 o 48 horas. Finalmente, se determinaron las semillas viables en base a la proporción de tinción descrita por Miller en 2013. En la Figura 5 se observa la coloración de las semillas mediante la tinción con tetrazolio.

**Figura 5**

*Coloración de semillas de la familia Rosaceae mediante la prueba de tetrazolio.*



*Nota.* Tomado de AOSA/SCST Tetrazolium testing handbook, por Miller, 2013.

En esta figura se muestra el criterio de selección de semillas viables y no viables. Se considera viable si la radícula o hipocótilo están completamente teñidos o si se presenta una coloración de los 2/3 del cotiledón.

El porcentaje de viabilidad de las semillas se obtuvo con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ semillas viables} = \frac{\text{semillas viables}}{\text{Total de semillas}} \times 100$$

### **Ensayos de desinfección de las semillas**

En el ensayo de desinfección, se seleccionaron 180 semillas de *Polylepis pauta* al azar. El medio de cultivo MS solidificado con Agar (7,5 g/L) se preparó previamente y fue dispensado en cajas Petri

hasta su uso. La desinfección se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por Santillán (2022) y Cárdenas & Espinoza (2014), con ciertas modificaciones.

La desinfección se llevó a cabo colocando los frutos en tubos cónicos de 50 mL estériles. A continuación, se realizó un lavado con agua estéril, seguido de un lavado con una solución de etanol al 70% durante 2 minutos y posteriormente se las enjuagó con agua estéril. Los frutos fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) en diferentes concentraciones 0%, 3%, 5% y 7% suplementado con Tween-20 al 1% en agitación. Finalmente, se realizaron 3 enjuagues a los frutos con agua estéril para proceder a retirar la mayor parte del pericarpio con ayuda de un bisturí y las semillas extraídas se sembraron en cajas Petri con medio MS para incubarlas a 21°C durante 14 días.

El porcentaje de semillas no contaminadas en las cajas Petri se evaluó periódicamente pasando 1 día durante el tiempo en el que se realizó el ensayo. El porcentaje de semillas no contaminadas se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Semillas no contaminadas} = \frac{\text{Número de semillas no contaminadas}}{\text{Número de semillas sembradas}} \times 100$$

### **Ensayos de germinación *in vitro* de las semillas**

En los ensayos de germinación de semillas se preparó tubos estériles de 10 mL con medio de cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones de ácido giberélico. Las semillas se remojaron previamente durante 24 horas en agua estéril. La siembra de semillas fue realizada en condiciones asépticas en una cámara de flujo y se siguió el protocolo de desinfección mencionado previamente con la concentración óptima de NaClO. Los tubos utilizados fueron colocados en dos cámaras de germinación en condiciones controladas, temperatura 10°C y 25°C, fotoperiodo 16 horas luz y 8 de oscuridad y humedad relativa de 65%.

El índice de latencia se calculó como el tiempo de apareamiento de la primer radícula, mientras que el porcentaje de germinación se evaluó a través del conteo de número de semillas germinadas a los 24 días utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Semillas germinadas} = \frac{n^{\circ} \text{ de semillas germinadas}}{n^{\circ} \text{ de semillas sembradas}} \times 100$$

### **Análisis estadístico**

Los datos de las características morfológicas cuantitativas se analizaron mediante estadística descriptiva para la obtención del promedio y la desviación estándar. Por otro lado, los datos de los ensayos de viabilidad, desinfección y germinación se analizaron mediante una comprobación de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks. En el caso de los datos que siguieron una distribución normal se realizó una prueba de hipótesis de comparación múltiple de medias entre los tratamientos y se los clasificó por medio del método de Duncan con un valor  $\alpha=0,05$ . En cuanto a los datos que no demostraron ser normales se empleó el método no paramétrico Kruskal-Wallis.

### **Caracterización morfológica**

El número de semillas por fruto se calculó a partir de 50 frutos, las dimensiones largo y ancho se calcularon a partir de la medición de 100 frutos, y el tamaño de muestra para determinar el peso fue de 1000 frutos. Las herramientas utilizadas para el análisis de los datos fueron el software Excel versión 2019 y el software estadístico InfoStat versión 2020.

### **Ensayos de viabilidad**

Se realizó un diseño factorial 2x2 con factores: A=concentración de tetrazolio y B=tiempo de exposición, con dos niveles denotados en cada factor  $A_1=0,5\%$ ,  $A_2=1\%$ ,  $B_1=24$  horas y  $B_2=48$  horas. Los valores de la concentración de tetrazolio se basaron de acuerdo a la información bibliográfica de Baskin

& Baskin (1998) y Miller (2013). En la Tabla 3 se muestra el diseño experimental para el análisis de viabilidad de semillas de *P. pauta* con los cuatro tratamientos del diseño factorial realizado para determinar si las semillas eran viables o no. Se realizaron 3 réplicas de 15 semillas cada una por cada tratamiento.

**Tabla 3**

*Diseño experimental para el análisis de viabilidad de las semillas de Polylepis pauta.*

Tratamientos	Factores		Réplicas	Semillas por réplica	Total de semillas
	Concentración de tetrazolio (%)	Tiempo de exposición (Horas)			
TV1	0,5	24	3	15	45
TV2	0,5	48	3	15	45
TV3	1	24	3	15	45
TV4	1	48	3	15	45
<b>Total</b>					180

### Ensayos de desinfección

En los ensayos de desinfección se realizó un diseño estadístico completamente al azar (DECA) con el factor C=concentración de hipoclorito de sodio (NaClO), con cuatro niveles denotados  $C_1=0\%$ ,  $C_2=3\%$ ,  $C_3=5\%$  y  $C_4=7\%$ . Los valores propuestos se encuentran en base a información bibliográfica de Cárdenas & Espinoza (2014) y Santillán (2022). Se realizaron 3 réplicas de 15 semillas por cada tratamiento. En la Tabla 4 se muestra el diseño experimental completamente al azar para el análisis de desinfección de semillas de *P. pauta* con los cuatro tratamientos del DECA realizado para determinar si



las semillas se contaminaban o no. Se realizaron 3 réplicas de 15 semillas cada una por cada tratamiento.

**Tabla 4**

*Diseño experimental para el análisis de desinfección de semillas de Polylepis pauta.*

Tratamientos	Concentración de NaClO (% v/v)	Réplicas	Semillas por réplica	Total de semillas
<b>TD0</b>	0	3	15	45
<b>TD1</b>	3	3	15	45
<b>TD2</b>	5	3	15	45
<b>TD3</b>	7	3	15	45
<b>Total</b>				180

### Ensayos de germinación

En los ensayos de germinación se realizó un diseño factorial 3x2 siendo los factores D= concentración de ácido giberélico y E= temperatura, cada uno con niveles denotados D<sub>1</sub>= 0 mg/L, D<sub>2</sub>=2 mg/L, D<sub>3</sub>=4 mg/L y E<sub>1</sub>= 10°C, E<sub>2</sub>=20°C. Los valores fueron determinados en base a información bibliográfica de Chen y colaboradores (2007) y Seltmann y colaboradores (2006). En la Tabla 5 se presentan los tratamientos del diseño factorial, además se ejecutaron 3 réplicas de 10 semillas cada una. La variable de respuesta fue el número de semillas germinadas con radícula visible (>2 mm).

Tabla 5

*Diseño experimental para el análisis de germinación de semillas de Polylepis pauta.*

Tratamientos	Factores		Réplicas	Semillas por réplica	Total de semillas
	Concentración de ácido giberélico (mg/L)	Temperatura (°C)			
TG1	0	10	3	10	30
TG2	0	25	3	10	30
TG3	1	10	3	10	30
TG4	1	25	3	10	30
TG5	2	10	3	10	30
TG6	2	25	3	10	30
<b>Total</b>					180



## Capítulo IV: Resultados

### Material vegetal

A partir de la observación y recolección del material vegetal de *Polylepis pauta* se determinaron las características morfológicas generales de tallo, hojas, inflorescencias, flores y frutos. Además, la búsqueda bibliográfica permitió la recopilación de otros datos como la forma de vida, rango altitudinal y distribución. Estas características se muestran en la ficha técnica de la Figura 6 para brindar información de la especie y su posterior uso en planes de conservación.

Figura 6

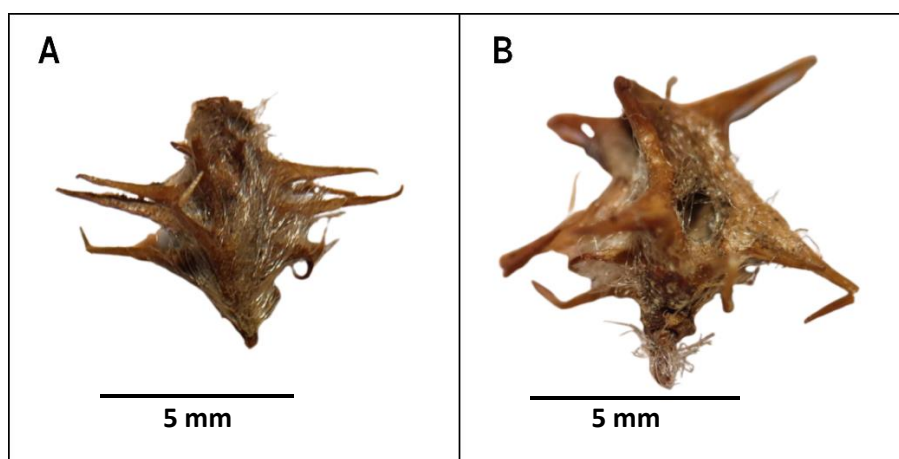
Ficha técnica de *Polylepis pauta*.

 <p>Foto: Indira Delgado</p>	<b>DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ESPECIE</b>	
	<p><b>Nombre científico:</b> <i>Polylepis pauta</i> Hieron.</p> <p><b>Familia:</b> Rosaceae</p> <p><b>Rango altitudinal:</b> 2600 a 4500 msnm.</p> <p><b>Forma de vida:</b> Árbol</p>	
	<b>MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE LA ESPECIE</b>	
	<p><b>Tallo:</b> Retorcidos, corteza rojiza exfoliante y delgada</p> <p><b>Hojas:</b> Imparipinnadas con 4 a 6 pares de foliolos, superficie superior lampiña, superficie inferior con pelos blanquecinos.</p> <p><b>Inflorescencia:</b> racimos simples colgantes</p> <p><b>Flores:</b> 4 sépalos ovados verdes</p> <p><b>Fruto:</b> Aquenios con varias espinas aplanadas densamente seríceas</p>	
<b>DATOS ADICIONALES</b>	<b>DISTRIBUCIÓN</b>	
<p>Algunas especies del género <i>Polylepis</i> poseen propiedades antimicrobianas y medicinales para enfermedades renales y respiratorias</p>	<p>Provincias de Cotopaxi, Imbabura, Napo y Pichincha.</p>	
<b>FUENTE:</b>		
<p>Boza Espinoza, T. E., &amp; Kessler, M. (2022). A monograph of the genus <i>Polylepis</i> (Rosaceae). <i>PhytoKeys</i> 203: 1-274, 203, 1-274. <a href="https://doi.org/10.3897/PHYTOKEYS.203.83529">https://doi.org/10.3897/PHYTOKEYS.203.83529</a></p>		
<p>Hurtado, R., Palabral-Aguilera, A. N., Domic, A. I., Gómez, M. I., &amp; Liberman, M. (2018). Estudios etnobotánicos y florísticos de los bosques amenazados de <i>Polylepis incarum</i> y <i>Polylepis pacensis</i> (Rosaceae) en Bolivia. <i>Bonplandia</i>, 27(2), 113. <a href="https://doi.org/10.30972/bon.2723534">https://doi.org/10.30972/bon.2723534</a></p>		
<p>Romoleroux, K, Cárate-Tandalla, D., Eler, R., &amp; Navarrete, H. (2019). <i>Polylepis pauta</i>. Plantas Vasculares de Los Bosques de <i>Polylepis</i> En Los Páramos de Oyacachi.</p>		
<p>Thoene, A. D., Intersimone, N. H., &amp; Riera, A. S. (2008). Antimicrobial activity of leaf and bark ethanol extracts from <i>Polylepis australis</i> Bitter (queñoa). <i>Revista Cubana de Plantas Medicinales</i>, 13(3), 1-11.</p>		

Los frutos recolectados fueron analizados en el estereomicroscopio (Fig. 7). Los frutos son aquenios turbinados, los cuales presentan un número variable de espinas aplanadas los cuales se observan en la Figura 7A. Algunos de estos frutos presentaban hoyos como se puede apreciar en la Figura 7B, posiblemente por ser alimento de otros animales.

### Figura 7

Frutos de *P. pauta*.



Nota. A) fruto de *P. pauta* en su estado maduro. B) fruto de *P. pauta* con un hoyo en el centro

### Caracterización morfológica de las semillas

Las semillas fueron caracterizadas de forma cuantitativa y cualitativa. En la caracterización cuantitativa se determinaron valores de número de semillas por fruto, dimensiones (largo y ancho) de semilla y fruto, peso promedio y contenido de humedad. En cambio, los parámetros cualitativos determinados fueron tipo de embrión, forma y color predominante.

### Parámetros cualitativos

En la Tabla 6 se resume los parámetros morfológicos cualitativos sobre tipo de embrión, forma y color evaluados en las semillas de *P. pauta*.

Tabla 6

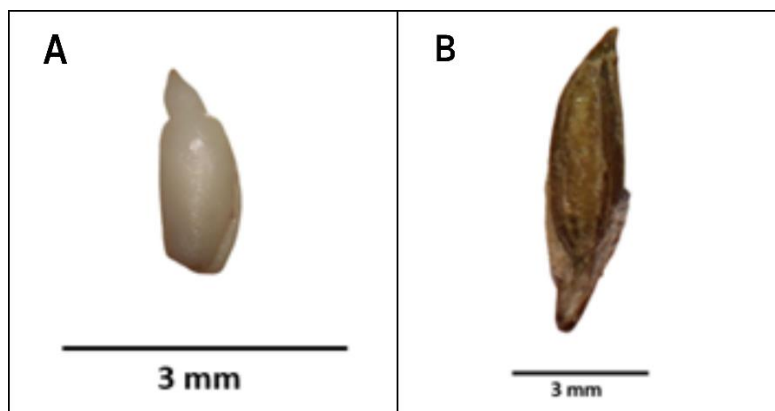
Parámetros cualitativos de las semillas de *P. pauta*.

Parámetro	Resultado
Tipo de embrión	Axial espatulado completamente desarrollado
Forma	Elíptica
Color	Marrón amarillento oscuro

Las semillas de *Polylepis pauta* poseen un embrión de tipo axial espatulado completamente desarrollado (Fig. 8). El embrión es recto con los cotiledones expandidos en forma de espátula y está a lo largo del eje longitudinal de la semilla (Fig. 8A), como se menciona en la clasificación de Martin (1946). Por otra parte, la forma de la semilla tras el proceso de escarificación del pericarpio presenta una forma elíptica debido a que su longitud es mayor a su ancho (Fig. 8B).

Figura 8

Embrión y semilla de *P. pauta* vistos en el estereomicroscopio.

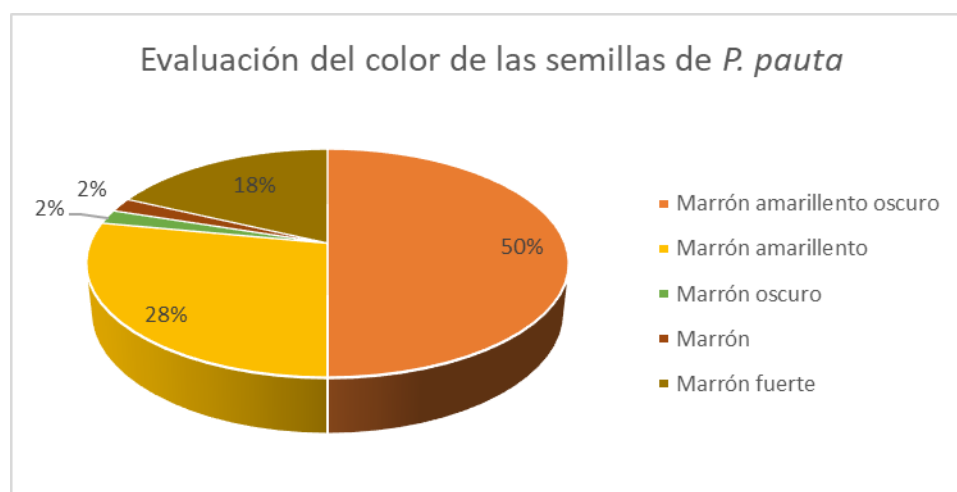


Nota. A) embrión de la semilla de *P. pauta*. B) semilla de *P. pauta* después del proceso de escarificación del pericarpio del fruto.

En la Figura 9 se observa que el 50% de las semillas evaluadas fueron de color marrón amarillento oscuro, el 28% color marrón amarillento, el 18% de color marrón fuerte, 2% marrón oscuro y marrón. Este parámetro fue importante para identificar las semillas maduras con las que se debe trabajar para pruebas posteriores. Finalmente se determinó que el color predominante en las semillas de *P. pauta* es el marrón amarillento oscuro.

### Figura 9

Evaluación del color de las semillas de *P. pauta*.



### Parámetros cuantitativos

Los parámetros cuantitativos evaluados para *P. pauta* fueron número de semillas por fruto, dimensiones (largo y ancho) de fruto y de semilla, peso y contenido de humedad (Tabla 7).

**Tabla 7**

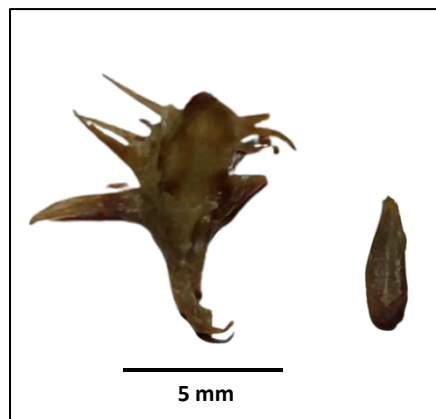
*Resumen de resultados obtenidos para los parámetros morfológicos cuantitativos de P. pauta.*

Parámetro	Promedio	Desviación estándar
Número de semillas por fruto	1,02	0,14
Largo del fruto (mm)	4,366	0,649
Ancho del fruto (mm)	2,162	0,316
Largo de la semilla (mm)	3,846	0,604
Ancho de la semilla (mm)	1,352	0,281
Peso de la semilla (mg)	2,968	0,372
Porcentaje de humedad (%)	6,258	2,498

El número de semillas por fruto fue calculado a partir de la disección de 50 frutos en estado maduro. Se determinó que el 98% de los frutos poseen únicamente una semilla en su interior (Fig. 10). De acuerdo con los datos obtenidos se calculó un promedio de  $1,02 \pm 0,14$  semillas por fruto.

**Figura 10**

*Fruto diseccionado de P. pauta.*

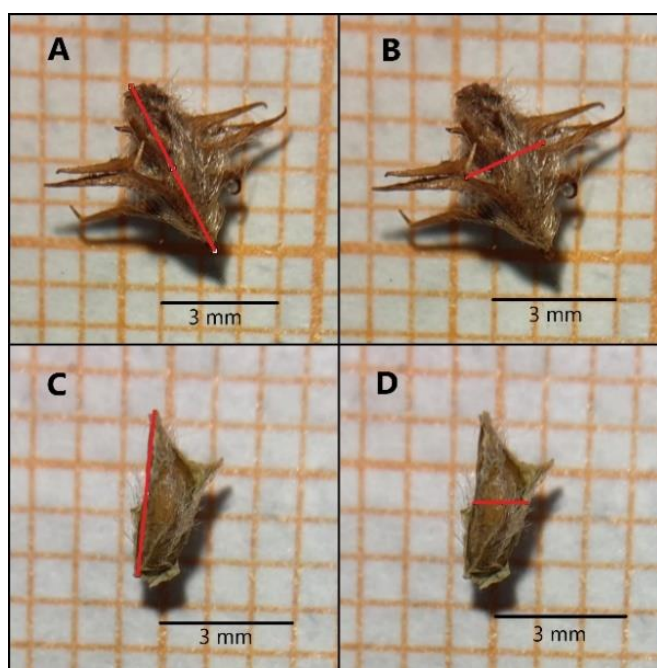




Al medir las dimensiones del fruto se observó un valor promedio de  $4,366 \pm 0,649$  mm de largo y  $2,162 \pm 0,316$  mm de ancho. Mientras que los valores promedio de largo y ancho de la semilla son  $3,846 \pm 0,604$  mm y  $1,352 \pm 0,281$  mm respectivamente. En la Figura 11 se observa las medidas tomadas tanto en frutos (Fig. 11A-B), como en semillas (Fig. 11C-D) de *P. pauta*.

### Figura 11

Fruto y semilla de *P. pauta* observadas en el estereomicroscopio.



*Nota.* Las líneas rojas representan las distancias medidas. A) Largo del fruto. B) Ancho del fruto. C) Largo de la semilla. D) Ancho de la semilla.

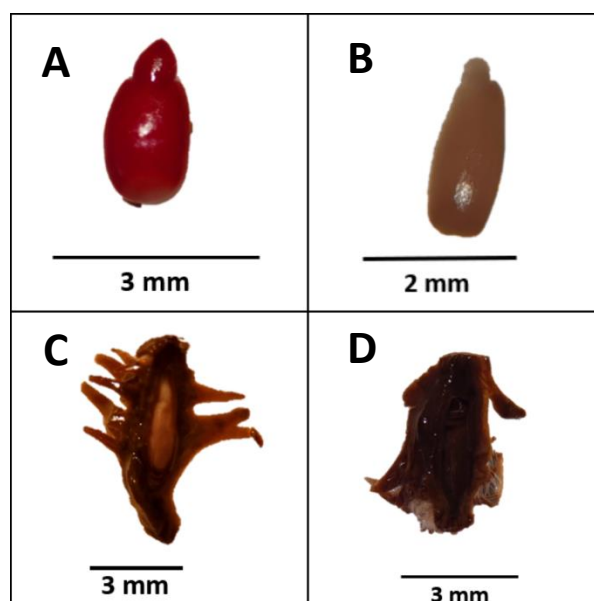
El peso promedio se realizó a partir de 1000 semillas separadas en 10 grupos. El valor promedio calculado fue de  $2,968 \pm 0,372$  mg. Finalmente el porcentaje de humedad de las semillas calculado fue de  $6,258 \pm 2,498$  %.

### Ensayo de viabilidad de semillas

En la Figura 12 se muestran semillas de *P. pauta* expuestas al tetrazolio, prueba que permite identificar semillas viables. En esta figura se observan semillas con embrión viable (Fig. 12A), semillas no viables por falta de coloración en el embrión (Fig. 12B y Fig. 12C) y no viables debido a que el tejido del embrión se encuentra necrosado (Fig. 12 D). Las semillas vacías o sin embrión se consideraron no viables.

### Figura 12

Semillas de *P. pauta* expuestas al tratamiento con tetrazolio.



*Nota.* Se observan distintos tipos de coloración. A) Embrión viable completamente teñido. B y C) Embriones no viables- no teñido. D) Embrión no viable debido a que se encuentra necrosado.

Los resultados de los tratamientos de viabilidad de las semillas de *P. pauta* fueron analizados mediante pruebas estadísticas. En la prueba de Shapiro-Wilks para normalidad (Tabla 8) se obtuvo un valor de probabilidad de  $p=0,1441$ , el cual es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ . Estos datos sugieren que existe una distribución normal de las semillas.

**Tabla 8**

*Prueba de Shapiro Wilks para el análisis de viabilidad de las semillas de P. pauta.*

Variable	n	Media	Desviación estándar	W*	Valor p
% de semillas viables	12	17,18	6,56	0,88	0,1441

*Nota.* W\* es el estadístico de prueba de Shapiro-Wilks

Debido a que los datos siguen una distribución normal, se realizó un análisis de la varianza ANOVA (Tabla 9). En esta prueba se obtuvo un valor de probabilidad mayor que el estadístico de prueba  $\alpha=0,05$ , lo que quiere decir que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos de viabilidad.

**Tabla 9**

*Análisis de la varianza para la prueba de viabilidad por el método colorimétrico de tetrazolio de P. pauta.*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	Valor p
<b>Modelo</b>	29,57	3	9,86	0,18	0,9087
<b>Tratamiento</b>	29,57	3	9,86	0,18	0,9087
<b>Error</b>	444,44	8	55,56		
<b>Total</b>	474,01	11			

*Nota.* gl: grados de libertad, F: estadístico F.

La prueba de Duncan ( $\alpha=0,05$ ) permitió corroborar los resultados de la prueba ANOVA. En la Tabla 10 se muestran los resultados de la prueba de Duncan, donde se observa que las medias de los 4 tratamientos tienen la misma letra de clase lo que implica que no hay una diferencia significativa entre los 4 tratamientos.

**Tabla 10**

*Prueba de Duncan para la viabilidad de P. pauta.*

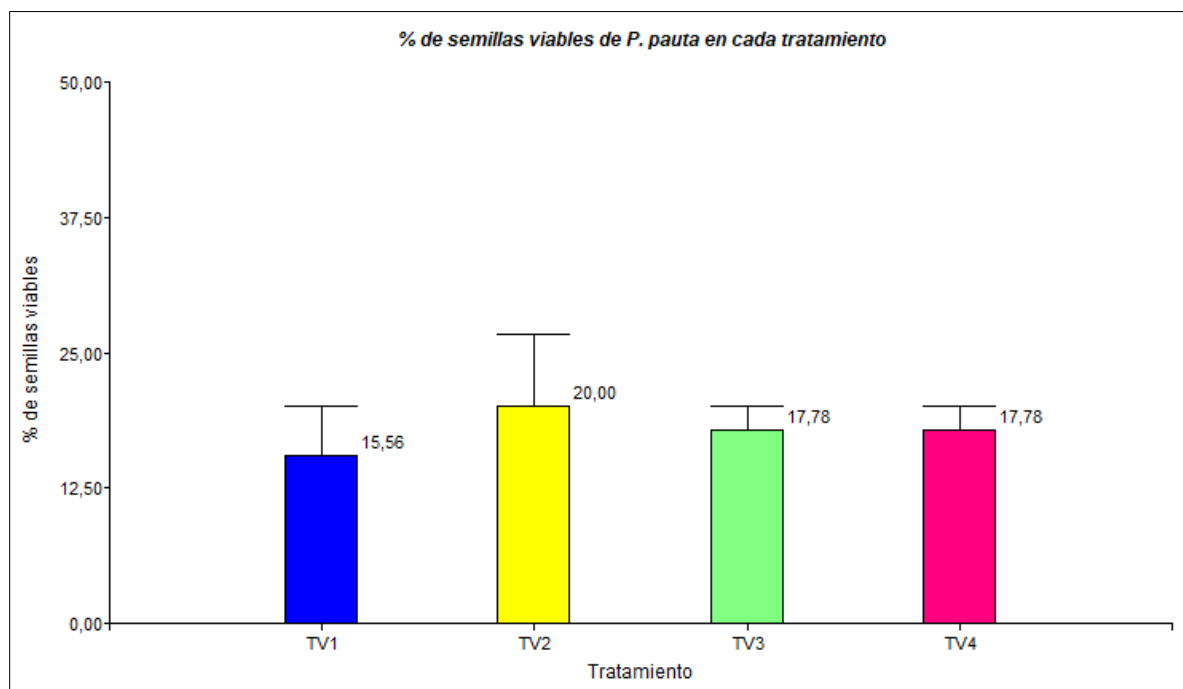
<b>Tratamiento</b>	<b>Error</b>	<b>gl</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>E. E</b>	<b>Clase</b>
<b>TV1</b>	55,5556	8	15,56	3	4,30	A
<b>TV3</b>	55,5556	8	17,78	3	4,30	A
<b>TV4</b>	55,5556	8	17,78	3	4,30	A
<b>TV2</b>	55,5556	8	20	3	4,30	A

*Nota.* gl: grados de libertad, E. E: Error estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). TV1: 0,5% tetrazolio-24 horas. TV2: 1% tetrazolio-24 horas. TV3: 0,5% tetrazolio-48 horas. TV4: 1% tetrazolio-48 horas.

Con el objetivo de visualizar las diferencias entre los tratamientos, se realizó una gráfica con el porcentaje de semillas viables (Figura 13) en la que se aprecia las diferencias entre las medias en cada tratamiento. En esta gráfica se demuestra que el tratamiento 2 (TV2) con una concentración de tetrazolio al 1% y con un tiempo de inmersión 24 horas permite detectar un mayor número de semillas teñidas, lo que corresponde a un 20% de semillas analizadas. Por lo cual, el tratamiento TV2 se consideró como el mejor tratamiento que permite una tinción adecuada de los embriones.

**Figura 13**

Porcentaje de semillas de *P. pautu* viables en cada tratamiento en la prueba de tetrazolio.



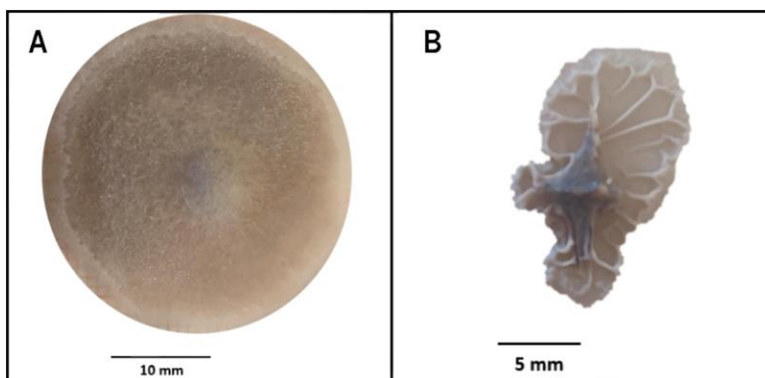
Nota. TV1: 0,5% tetrazolio-24 horas. TV2: 1% tetrazolio-24 horas. TV3: 0,5% tetrazolio-48 horas. TV4: 1% tetrazolio-48 horas.

### Ensayo de desinfección

El ensayo de desinfección fue un paso previo para estandarizar el protocolo de germinación de las semillas de *P. pautu*. En este caso se determinó la cantidad de semillas que no presentaron contaminación (hongo o bacteria). En la Figura 14 se observan semillas de *P. pautu* contaminadas por hongos (Fig. 14A) y contaminadas con bacterias (Fig. 14B).

**Figura 14**

Semillas de *P. pauta* contaminadas.



*Nota.* A) Semilla con contaminación por hongos. B) Semilla con contaminación por bacterias.

Los resultados de los tratamientos de desinfección de las semillas de *P. pauta* fueron analizados mediante pruebas estadísticas. En la prueba de Shapiro-Wilks (Tabla 11) se obtuvo un valor de probabilidad  $p=0,0234$ , menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$  por lo que se concluye que los datos no siguen una distribución normal.

**Tabla 11**

*Prueba de Shapiro Wilks para el análisis de desinfección de las semillas de P. pauta.*

Variable	n	Media	Desviación estándar	W*	Valor p
% de semillas no contaminadas	12	72,77	28,91	0,82	0,0234

*Nota.* W\* es el estadístico de prueba de Shapiro-Wilks

Los datos de la prueba de desinfección no siguen una distribución normal por lo que se empleó el análisis de la varianza no paramétrica Kruskal-Wallis. En la Tabla 12 se muestran los resultados de la

prueba de Kruskal-Wallis se obtuvo un valor de probabilidad  $p=0,0457$  menor que el nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ), lo que quiere decir que por lo menos un tratamiento tiene una diferencia significativa frente a los otros. En esta tabla las letras del nivel indican que los tratamientos TD0 y TD3 no son significativamente diferentes entre ellos y los tratamientos TD1, TD2 Y TD3 tampoco son significativamente diferentes entre ellos.

**Tabla 12**

*Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis de desinfección de las semillas de P. paut.*

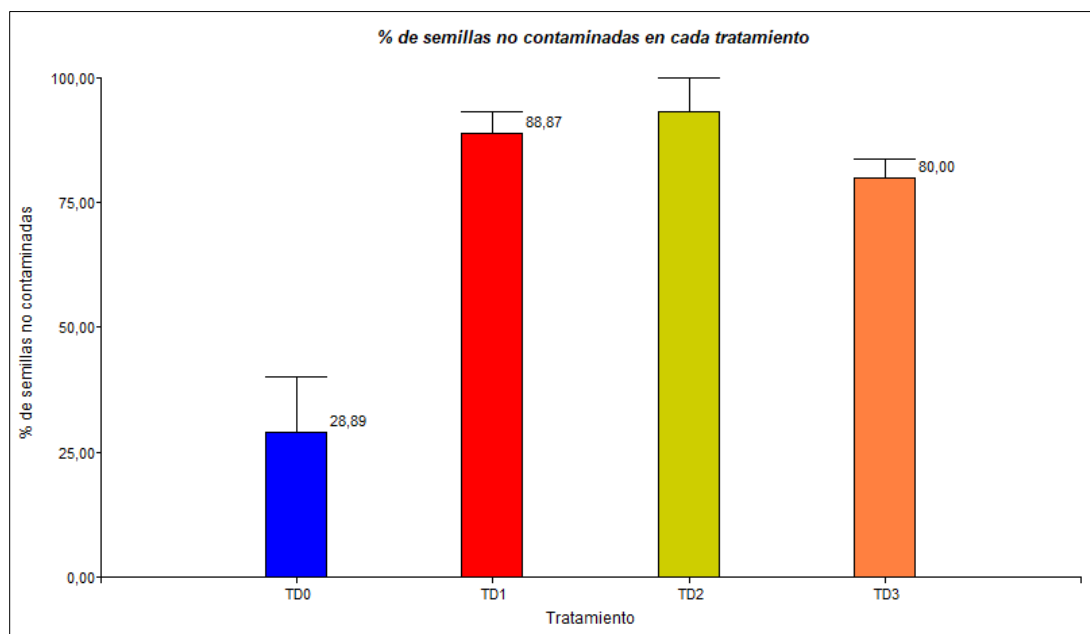
Tratamiento	N	Medias	D. E.	Medianas	C	H	Valor p	Nivel
TD0	3	28,89	19,24	40	0,98	7,82	0,0457	A
TD1	3	88,87	7,68	93,3				A-B
TD2	3	93,33	11,55	100				B
TD3	3	80	6,70	80				B

*Nota.* TD0: 0% NaClO. TD1: 3% NaClO. TD2: 5% NaClO. TD3: 7% NaClO. D. E.: Desviación estándar. C: Factor de corrección por observaciones empatadas. H: estadístico de prueba no corregido. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

El mejor tratamiento de desinfección para las semillas de *P. paut* se seleccionó en base al porcentaje más alto de semillas no contaminadas. Se encontró que el TD2 es el mejor tratamiento debido a que presentó un porcentaje de 93,33% de semillas no contaminadas. Mientras que los demás tratamientos TD0, TD1, y TD3 presentaron porcentajes de 28,89%, 88,87% y 80% respectivamente. En la Figura 15 se observa un gráfico de barras que representa el porcentaje de semillas no contaminadas en cada tratamiento.

**Figura 15**

Porcentaje de semillas de *P. pauti* no contaminadas a los 14 días.



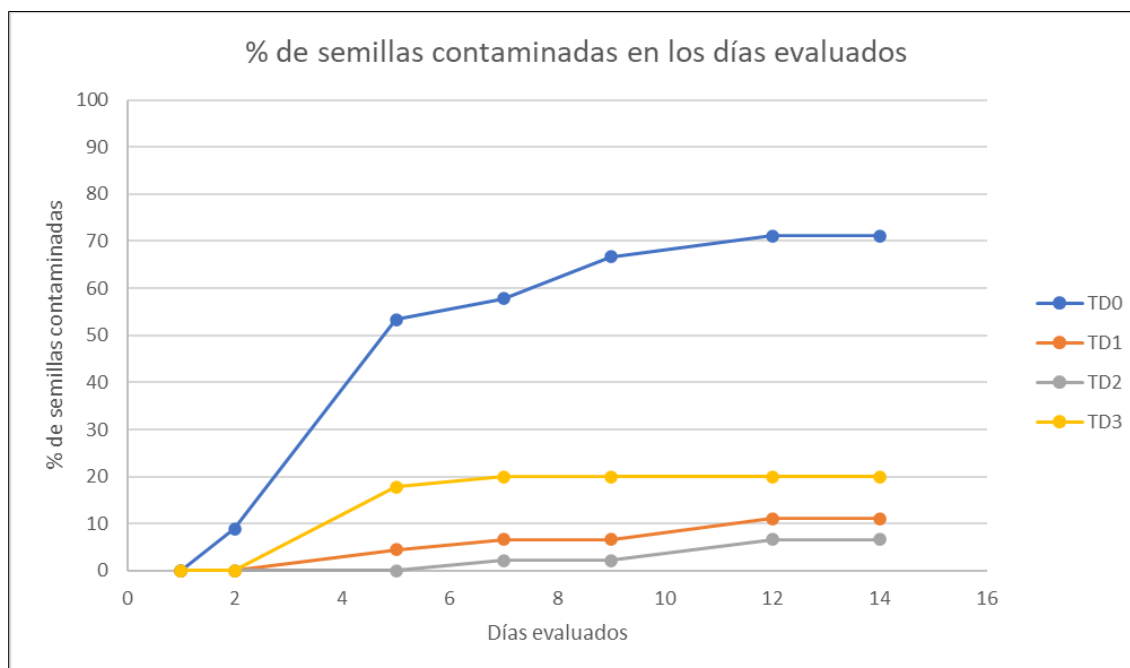
*Nota.* TD0: 0% NaClO. TD1: 3% NaClO. TD2: 5% NaClO. TD3: 7% NaClO.

La evaluación de las semillas contaminadas y no contaminadas se realizó pasando un día. En la Figura 16 se observa la progresión del porcentaje de semillas contaminadas en los días evaluados. Se observa que las semillas desinfectadas con el tratamiento TD0 se contaminaron con mayor rapidez en comparación con los otros tratamientos. Además, se observó que las semillas del tratamiento TD1, TD2 y TD3 presentaron su máxima contaminación en el día 12.



**Figura 16**

Progresión del porcentaje de semillas contaminadas en los días evaluados.



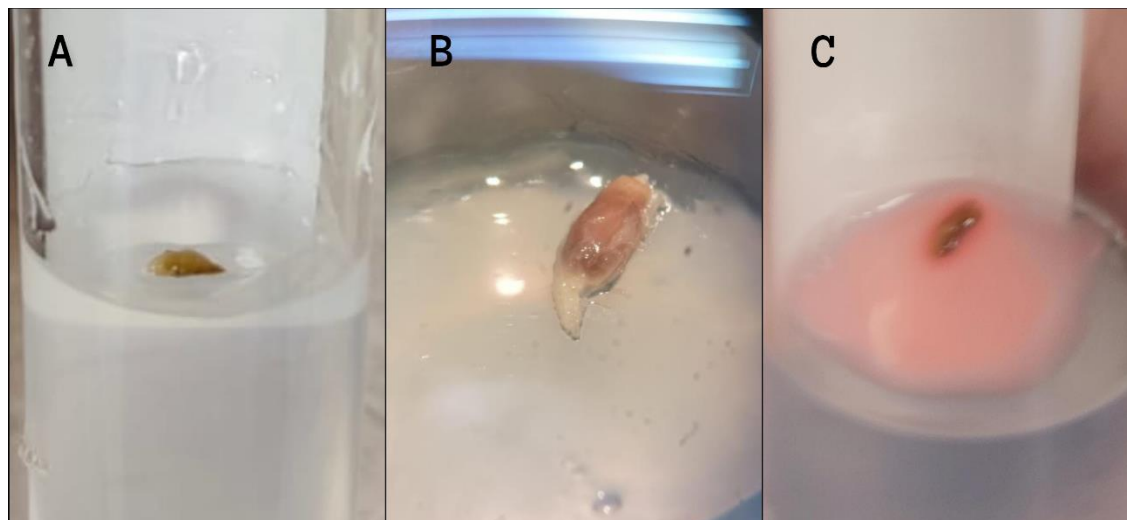
Nota. TD0: 0% NaClO. TD1: 3% NaClO. TD2: 5% NaClO. TD3: 7% NaClO.

### Ensayo de germinación

Luego de la estandarización del protocolo de desinfección se procedió con el ensayo de germinación de las semillas de *P. pauti*. En este caso se determinó el porcentaje de germinación de cada tratamiento después de 24 días de ensayo, el indicador de la germinación fue el apareamiento de la radícula (>2mm). En la Figura 17 se observan semillas de *P. pauti* germinadas, no germinadas y contaminadas en el tiempo mencionado.

**Figura 17**

Semillas de *P. pauta* en los ensayos de germinación.



*Nota.* A) Semilla de *P. pauta* no germinada. B) Semilla germinada. C) Semilla que presenta contaminación.

A partir de los resultados de los tratamientos de germinación de las semillas de *P. pauta* se calculó el porcentaje de germinación en cada tratamiento. Los valores de porcentaje de germinación fueron analizados mediante pruebas estadísticas. En la prueba de Shapiro-Wilks (Tabla 13) se obtuvo un valor de probabilidad  $p < 0,0001$ , menor que el nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  por lo que se concluye que los datos no siguen una distribución normal.

**Tabla 13**

*Prueba de Shapiro Wilks para el análisis de germinación de las semillas de P. pauta.*

Variable	n	Media	Desviación estándar	W*	Valor p
% de germinación	18	4,44	7,05	0,64	<0,0001

*Nota.* W\* es el estadístico de prueba de Shapiro-Wilks

Los valores del porcentaje de germinación no siguen una distribución normal por lo que se realizó un análisis de la varianza no paramétrica Kruskal-Wallis. En la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 14) se obtuvo un valor de probabilidad  $p=0,0262$ , menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , lo que quiere decir que por lo menos un tratamiento tuvo una diferencia significativa frente a los otros. En la Tabla 14 se muestra los tratamientos que son estadísticamente significativos entre sí mediante las letras del nivel. Los tratamientos TG1, TG2, TG3 y TG4 no tuvieron una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, mientras que los tratamientos TG3, TG4, TG5 y TG6 tampoco fueron significativamente diferentes entre ellos.

**Tabla 14**

*Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis de germinación de las semillas de P. pauta.*

Tratamiento	N	Medias	D. E.	Medianas	C	H	Valor p	Nivel
TG1	3	0,00	0,00	0,00	0,84	10,63	0,0262	A
TG2	3	0,00	0,00	0,00				A
TG3	3	3,33	5,77	0,00				A-B
TG4	3	6,67	5,77	10				A-B
TG5	3	13,33	5,77	10				B
TG6	3	16,67	5,77	20				B

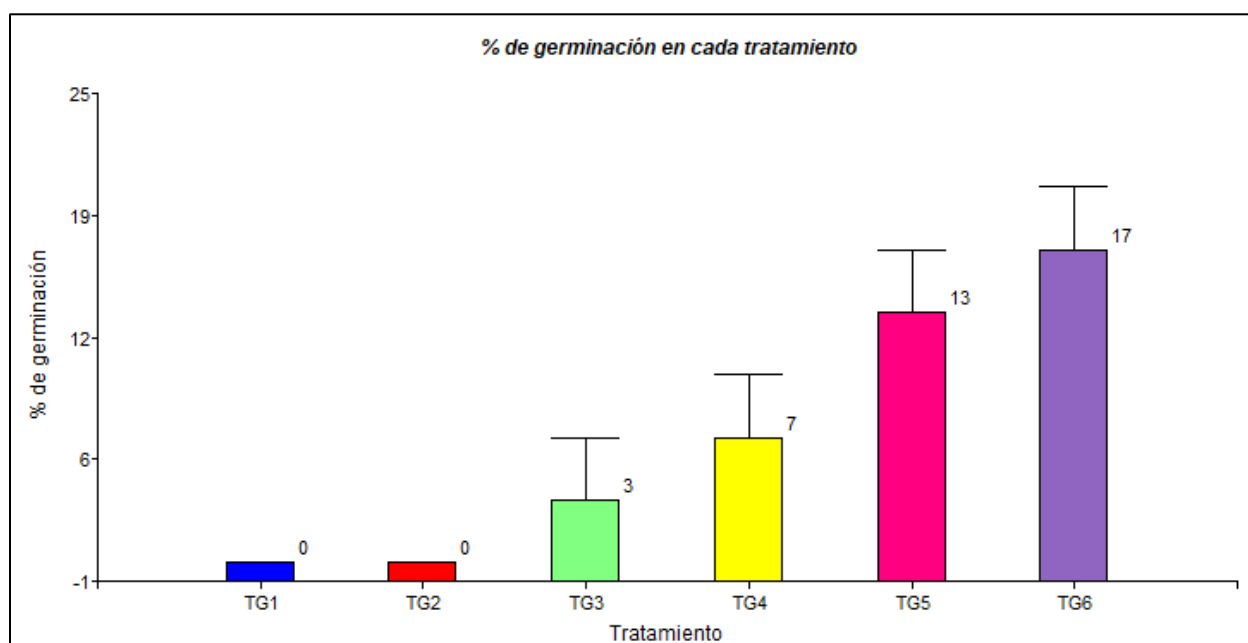
*Nota.* TG1: 10°C y [0 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG2: 25°C y [0 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG3: 10°C y [1 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG4: 25°C y [1 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG5: 10°C y [2 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG6: 25°C y [2 mg/L] GA<sub>3</sub>. D. E.: Desviación estándar. C: Factor de corrección por observaciones empatadas. H: estadístico de prueba no corregido. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Para determinar de manera gráfica y decidir el mejor tratamiento de germinación de las semillas de *P. pauta* se elaboró la Figura 18. En esta figura se muestra gráficamente el porcentaje de germinación

en cada tratamiento realizado. Se observa que con el tratamiento 6 (TG6) con parámetros temperatura 25°C y concentración de ácido giberélico 2 mg/L se obtuvo el mayor porcentaje de semillas germinadas (16,67%). Los demás tratamientos tuvieron valores de porcentaje de germinación de 13,33%, 6,67% y 3,33% para los tratamientos TG5, TG4 y TG3 respectivamente, mientras que los tratamientos TG1 y TG2 tuvieron un porcentaje de germinación del 0%.

### Figura 18

Porcentaje de germinación de semillas de *P. pauta*.



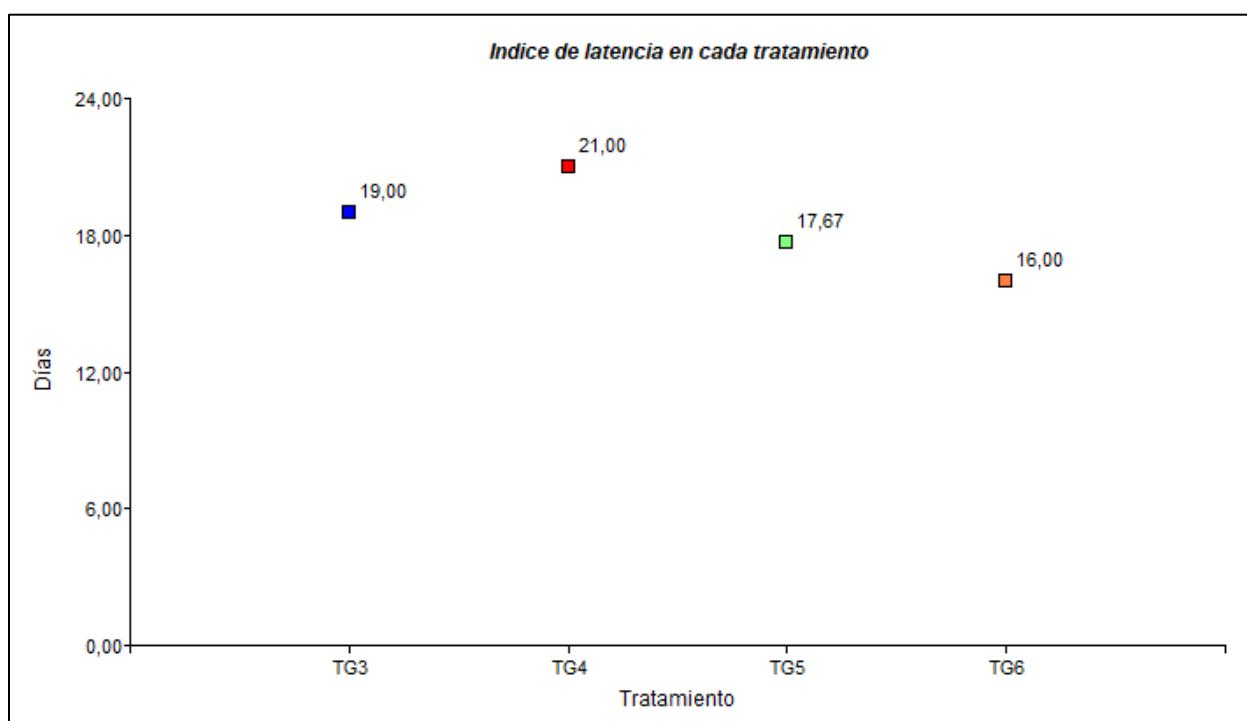
Nota. TG1: 10°C y [0 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG2: 25°C y [0 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG3: 10°C y [1 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG4: 25°C y [1 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG5: 10°C y [2 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG6: 25°C y [2 mg/L] GA<sub>3</sub>.

El índice de latencia se determinó en función del tiempo en el que se detectó señales de crecimiento de la radícula, lo que indica que es el tiempo en el que se rompe la latencia o dormancia de la semilla. En el caso de *P. pauta* para los tratamientos TG1 y TG2 no hubo ninguna semilla germinada, por lo que no se tomó en cuenta estos tratamientos en la obtención de la Figura 19. En esta figura se

muestra que el tratamiento TG6 con parámetros temperatura 25°C y concentración de ácido giberélico 2 mg/L es el tratamiento que provoca una ruptura de la latencia de la semilla a los 16 días. En cambio las semillas de los tratamientos TG3 y TG4 tardaron 19 y 21 días respectivamente en romper su latencia. De esta manera se considera que el tratamiento TG6 provoca una ruptura de la latencia más rápida.

### Figura 19

*Tiempo de latencia de las semillas de P. pauta en cada tratamiento*



*Nota.* TG3: 10°C y [1 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG4: 25°C y [1 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG5: 10°C y [2 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG6: 25°C y [2 mg/L] GA<sub>3</sub>.

Para determinar el mejor tratamiento de germinación para semillas de *P. pauta* se realizó una comparación del porcentaje de germinación y el índice de latencia (Tabla 15). De acuerdo con estos datos, el TG6 (25°C y [2 mg/L] GA<sub>3</sub>) es el mejor tratamiento para germinar las semillas de *P. pauta*,

debido a que genera un alto porcentaje de germinación. El índice de latencia en este tratamiento fue menor frente a los otros tratamientos.

**Tabla 15**

*Comparación de los parámetros germinativos para P. pautá.*

Tratamiento germinativo	% de germinación	Índice de latencia (días)
TG1	0	N/A
TG2	0	N/A
TG3	3,33	19
TG4	6,67	21
TG5	13,33	17,67
TG6	16,67	16

*Nota.* N/A: No aplica. TG1: 10°C y [0 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG2: 25°C y [0 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG3: 10°C y [1 mg/L] GA<sub>3</sub>.

TG4: 25°C y [1 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG5: 10°C y [2 mg/L] GA<sub>3</sub>. TG6: 25°C y [2 mg/L] GA<sub>3</sub>.

## Capítulo V: Discusión

La cadena montañosa de los Andes es considerada un punto de alta biodiversidad, donde se encuentran varios tipos de ecosistemas de montaña como es el bosque andino. Los bosques andinos cumplen funciones importantes como corredores biológicos acogiendo a varias especies de animales (Hofstede et al., 2003). También, la flora endémica juega un papel importante en estos ecosistemas de altura debido a las adaptaciones morfológicas de las plantas al ambiente y sus condiciones de vida extrema. Además de que estos bosques cumplen con un rol fundamental en el ciclo hidrológico en la etapa de mantenimiento y suministro de agua. Y son parte fundamental en la mitigación de gases de efecto invernadero y captura de dióxido de carbono. Sin embargo, las actividades antrópicas han dado paso a la fragmentación de los bosques andinos dejándolos como mosaicos aislados.

Los bosques de *Polylepis* son bosques andinos de suma importancia ya que albergan una gran diversidad de especies como epifitas, plantas vasculares, musgos y líquenes, muchos de ellos endémicos (Romoleroux et al., 2016). Los bosques ofrecen beneficios a las comunidades aledañas como leña, carbón de alta calidad y cumplen funciones ecosistémicas como la retención de humedad, regulación de fuentes hídricas y formación de suelos (Fjeldså & Kessler, 1996). El género *Polylepis* se caracteriza por su gran capacidad de adaptación a los climas extremos debido a sus flores reducidas, hojas cubiertas de pelos y cortezas exfoliantes que actúan como aislante térmico (Fjeldså & Kessler, 1996).

Los bosques de *Polylepis* se encuentran amenazados principalmente por factores antropogénicos como la extracción de madera, la quema de bosques y el pastoreo (Purcell & Brelsford, 2004). En el Ecuador, las poblaciones de *Polylepis* se encuentran aisladas debido a la fragmentación por la influencia de los humanos, el factor climático y las condiciones edáficas (Cierjacks, Rühr, et al., 2008; Lauer et al., 2001). Se ha confirmado en estudios que el fuego y el pastoreo afectan los procesos de regeneración al reducir el número de semillas e impiden la regeneración de árboles jóvenes por la degradación del suelo afectando la viabilidad de las semillas (Cierjacks, Salgado, et al., 2008; Renison et

al., 2002, 2004). Considerando todas estas amenazas que sufren los bosques de *Polylepis* se han generado proyectos de conservación a nivel *in situ* como *ex situ*.

En el Ecuador existen 11 especies de *Polylepis* incluyendo *P. pauta*, esta especie se encuentra distribuida en las provincias de Imbabura, Pichincha, Napo y Cotopaxi. En el estudio de Boza Espinoza & Kessler (2022) se hace una clasificación de especies del género *Polylepis* en base a la distinción morfológica, ecológica y biogeográfica, por lo que la ubicación geográfica de los especímenes estudiados fue fundamental en el reconocimiento y recolección de material vegetal de *P. pauta* y su diferenciación de otras especies morfológicamente similares como *P. ochreatea*. Los árboles de *P. pauta* pueden llegar a medir de 2 a 12 m de altura, sin embargo, se ha evidenciado su crecimiento principalmente en laderas por lo que para la recolección del material vegetal no se requirió de otros instrumentos y se realizó de forma manual. Según Cierjacks y colaboradores (2008) los árboles de *P. pauta* producen continuamente flores y frutos por lo que la recolección se puede hacer en cualquier temporada del año, las muestras para este estudio fueron recolectadas entre los meses de noviembre de 2022 y enero de 2023 por lo que el estado fenológico no fue un impedimento en la obtención del material vegetal.

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) ha catalogado a la especie *Polylepis pauta* como vulnerable por lo que los planes de conservación son fundamentales para evitar la pérdida de la especie. Una de las iniciativas de conservación de los recursos genéticos es el banco de germoplasma del proyecto HANS-BANK. La importancia de utilizar las semillas en planes de conservación radica en que se favorece la generación de diversidad genética y por tanto la supervivencia de los individuos (Arrázola et al., 2022). Para la inserción de las semillas de una especie en un banco de germoplasma es fundamental hacer una caracterización a nivel morfológico y germinativo de las especies. En base a estos requerimientos, para la inserción de semillas en el banco de semillas HANS-BANK en el presente estudio se caracterizaron los parámetros morfológicos y germinativos de las semillas de *Polylepis pauta*.



Los rasgos morfológicos funcionales de las plantas son importantes indicadores de las relaciones entre las especies y el entorno, en semillas específicamente los rasgos morfológicos modulan el rendimiento reproductivo y también la supervivencia de las plantas. Estos parámetros son de suma importancia en los procesos de conservación *ex situ* para conocer la respuesta de la semilla al proceso de almacenamiento (Hong & Ellis, 1998). Específicamente los bancos de germoplasma o bancos de semillas buscan preservar la diversidad genética de las especies a largo plazo. Para almacenar semillas en los bancos se requiere de un proceso previo de desecación de manera que no disminuya la viabilidad de las semillas y se garantice la conservación de las especies (Romero & Pérez, 2016). Las dimensiones, el peso y el porcentaje de humedad son factores importantes en la identificación de la tolerancia de las semillas a los procesos previos al almacenamiento. En base a estos datos calculados las semillas de *P. pauta* se clasificaron como ortodoxas o recalcitrantes.

El tamaño es un parámetro importante por analizar ya que en relación a las dimensiones se puede considerar que aquellas semillas que miden más de 17 mm de largo y 13 mm de ancho son recalcitrantes (Romero & Pérez, 2016). En este caso, las semillas de *P. pauta* miden 3,46 x 1,35 mm de largo y ancho por lo que se considera que es una semilla ortodoxa y por tanto se podría almacenar en el banco de semillas. Además, otras especies del mismo género muestran semillas con dimensiones similares, como es el caso de las semillas de las especies *P. neglecta*, *P. incarum* y *P. pacensis* poseen dimensiones de 3,02-4,27 x 1,34-1,47 mm para *P. neglecta*, 3,47-4,41 x 1,77-2,63 mm para *P. incarum* y 3,29-5,6 x 2,16-3,13 mm para *P. pacensis* (Vega et al., 2018).

Según Romero & Pérez (2016) en el análisis de semillas forestales se considera que si la semilla tiene un peso menor de 1 g puede tolerar la desecación, mantiene la viabilidad y por tanto tiene un comportamiento ortodoxo. Las semillas de *P. pauta* pesan 2,968 mg lo que implica que por su peso se pueden considerar ortodoxas. En el estudio de Vega y colaboradores en 2018 otras especies del género como *P. pacensis*, *P. incarum* y *P. neglecta* pesan 5,31 mg, 9,65 mg y 4,78 mg respectivamente. El

contenido de humedad está relacionado con el peso y es el principal factor que determina si la semilla es capaz de resistir el proceso de desecación previo al almacenamiento en un banco de germoplasma. Las semillas recalcitrantes mueren durante el secado si el proceso genera la pérdida de más del 20% de humedad (Chin et al., 1989). En este caso, *P. pauta* demostró que su contenido de humedad tras el proceso de desecación es del 6,258% lo que ratifica el hecho de que la semilla es ortodoxa y puede ser almacenada a temperaturas menores a cero durante un largo periodo de tiempo sin perder su viabilidad y poder germinativo.

En este estudio también se analizaron parámetros cualitativos como la forma, el color y el tipo de embrión, los cuales son importantes para comprender las interacciones ecológicas y estrategias de reproducción. La forma de la semilla está influenciada por factores ambientales (viento, temperatura, humedad, etc.), *P. pauta* posee frutos aquenios indehiscentes y monospermos lo que implica que la semilla no se separa del fruto, por lo que las estrategias de reproducción sexual están ligadas a la forma del fruto. Los frutos de *P. pauta* poseen espinas que posiblemente se pegan al pelaje o al exterior de los animales, este método de dispersión es conocido como epizooecoria. No obstante Boza Espinoza & Kessler (2022) hacen mención que la principal forma de dispersión de los frutos del género *Polylepis* es a través del viento conocido como anemocoria. Por otra parte, el color de las semillas es un factor que ayuda a determinar el estado de madurez de una semilla. Para *P. pauta* las semillas demasiado verdes son inmaduras, mientras que las semillas de color marrón amarillento oscuro representan un estado de madurez adecuado para la inserción de estas en el banco.

Por otro lado, también es importante analizar la viabilidad de una semilla. Este parámetro mide el potencial de germinación de la misma y es de utilidad en las iniciativas de conservación *ex situ* ya que asegurará el éxito del programa (Mancipe-Murillo et al., 2018). La viabilidad puede ser evaluada mediante varios métodos, en este estudio se analizó la viabilidad de las semillas de *P. pauta* a través del método colorimétrico de tetrazolio y también el ensayo de germinación *in vitro*.

El análisis de viabilidad de semillas mediante el tetrazolio es un método rápido para determinar la capacidad de germinación. La prueba se basa en el principio de reacción de los tejidos del embrión con la solución. En esta prueba es fundamental que se realice una hidratación previa de las semillas ya que de esta manera incrementa la acción de las hidrogenasas, lo que resulta en la liberación de iones hidrógeno reduciendo a la solución y generando una coloración rojiza (Ruiz, 2009). Al exponer las semillas de *P. pauta* al tetrazolio se obtuvo un porcentaje de viabilidad máximo de 16% en el tratamiento con condiciones del 1% de tetrazolio y tiempo de inmersión de 24 horas. Sin embargo, no se tuvo una diferencia estadísticamente significativa frente a los demás tratamientos aplicados. En el estudio realizado por Cierjacks y colaboradores en 2008 en el ensayo de viabilidad mediante la prueba de tetrazolio para semillas de *P. pauta* y *P. incana* se obtuvieron valores de 6% y 2,3% de semillas viables respectivamente.

En este estudio también se realizó un análisis de viabilidad mediante el ensayo de germinación *in vitro* de las semillas. En primer lugar, se estandarizó un procedimiento de desinfección que sea eficiente, y evite la propagación de microorganismos. A diferencia de los métodos de germinación tradicional, la germinación *in vitro* se realiza en condiciones asépticas y se pueden controlar los factores que influyen en el crecimiento. Se conocen varias sustancias utilizadas en los procesos de desinfección como el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O). Debido a su efectividad, costo y adquisición el hipoclorito de sodio es la sustancia utilizada de forma común (Borges García et al., 2009).

En el presente estudio se empleó etanol, hipoclorito de sodio y tween 20 para la desinfección de los frutos de *P. pauta*. En primera instancia el etanol al 70% desnatura las proteínas de los microorganismos para reducir así su potencial infeccioso. Posteriormente se utilizó una solución de hipoclorito de sodio con Tween 20 al 1%, debido a que las soluciones cloradas son potentes bactericidas por su capacidad de ruptura de las uniones químicas moleculares o la sustitución de los átomos de otras

moléculas como las enzimas de los microorganismos (Galván Contreras et al., 2016; Lenntech, n.d.). En el protocolo de desinfección propuesto por Santillán en 2022 para semillas de la familia Rosaceae se obtuvieron mejores resultados con la concentración más alta de NaClO para el mencionado estudio (2%). Sin embargo, en el caso de las semillas de *P. pauta* al requerirse de una escarificación previa se trabajó con concentraciones altas de NaClO (>5%) para promover la ruptura del pericarpio del fruto. El mayor porcentaje de semillas de *P. pauta* no contaminadas (93,33%) se obtuvo a condiciones de 5% de NaClO, además resultó ser un eficiente escarificante facilitando la extracción de la semilla para su posterior siembra.

La germinación de las semillas se ve influenciada por factores climáticos, inhibidores, estado y cobertura de las semillas. Las semillas de ciertas especies requieren de condiciones muy específicas para lograr la ruptura del bloqueo físico o fisiológico que impide que estas germinen, algunos de los mecanismos utilizados para romper la latencia fisiológica son la exposición a temperaturas bajas o la adición exógena de ácido giberélico (Baskin & Baskin, 2014). Se obtuvo que el porcentaje máximo de germinación de *Polylepis pauta* fue del 16,67% en el tratamiento 6 a una temperatura de 25°C y una concentración de ácido giberélico de 2 mg/L y se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de los diferentes tratamientos.

De igual manera en el tratamiento 6 se obtuvo un índice de latencia de 16 días, siendo este valor el menor a comparación del tiempo obtenido en los demás tratamientos. En los tratamientos 1 y 2 sin giberelinas se obtuvo un porcentaje de germinación del 0%, mientras que para los tratamientos 3 y 4 se obtuvieron valores de 3,33 y 6,67% de semillas germinadas respectivamente. En el estudio realizado por Vasco en 2010 se realizaron diferentes tratamientos de germinación tradicional para las especies *P. reticulata* y *P. lanuginosa*, se obtuvieron porcentajes de 46% y 37,5% respectivamente, siendo el tratamiento más eficiente a temperatura ambiente, humedad relativa mayor al 70% y un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. La importancia del establecimiento de las mejores condiciones de

germinación de *P. pautá* radica en conocer las condiciones que se deben cumplir para asegurar el éxito reproductivo de las semillas con fines de conservación.

El uso de ácido giberélico resulta un método eficiente para provocar la ruptura de la latencia fisiológica de dos maneras, primero aumentando el potencial de crecimiento del embrión y luego induciendo la producción de enzimas hidrolíticas que actúan sobre el endospermo de las semillas (Gupta & Chakrabarty, 2013). El uso de ácido giberélico en la germinación *in vitro* de semillas de *P. pautá* ha resultado en el aumento del porcentaje de germinación en dependencia de la concentración de la fitohormona, al adicionar 2 mg/L de ácido giberélico se obtuvieron valores de 13,33 y 16,67% de germinación, mientras que en los tratamientos donde no se utilizó ácido giberélico existió un porcentaje de germinación del 0%.

Por otro lado, la temperatura óptima para la germinación de una semilla varía de especie a especie, las temperaturas bajas provocan estrés generando daños en las membranas celulares mediante la fuga de iones, también afecta la actividad de las enzimas involucradas en el proceso de ruptura de la latencia como son las deshidrogenasas y las amilasas (Szczerba et al., 2021). Mientras que las altas temperaturas pueden conllevar a una producción endógena de ácido abscísico que provoca la inhibición de la germinación y el impedimento de la elongación de la radícula (Guo et al., 2020). Esta acción de la temperatura sobre la germinación de las semillas se ve representada en el bajo porcentaje de germinación de semillas de *P. pautá* en los tratamientos a bajas temperaturas (10°C) en donde se tuvieron valores de 0, 3,33 y 13,33% de semillas germinadas.

De manera general los frutos y semillas de las diferentes especies del género *Polylepis* experimentan un bajo porcentaje de viabilidad, por esta razón los programas de conservación se dirigen fuertemente a los métodos de reproducción asexual. Sin embargo, no promueven la variabilidad genética a diferencia de la propagación por germinación de semillas. Algunas de las causas de los bajos

porcentajes de germinación incluyen aspectos ecológicos que se describen a continuación. Se ha observado una alta propensión de los frutos de las especies del género *Polylepis* a la herbivoría (Iglesias García, 2008). En varios frutos de *Polylepis pauta* en este estudio se observaron agujeros en el fruto, estos agujeros son un indicador de parasitismo por herbívoros. El resultado de esta actividad de los herbívoros es la inexistencia de la estructura de la semilla y por tanto se refleja en la baja capacidad germinativa. Por otro lado, en el estudio realizado por Vasco en 2010 otra de las causas del bajo porcentaje y del extenso tiempo de germinación de las semillas del género *Polylepis* es la anatomía de la testa, ya que esta genera impermeabilidad de las semillas tanto a nivel hídrico como a nivel gaseoso.

En estudios anteriores realizados en semillas del género *Polylepis* se ha detectado que los bajos porcentajes de germinación también se deben a la gran cantidad de semillas sin embrión, por ejemplo, en el estudio realizado por Vega y colaboradores en 2018 se detectó un porcentaje de 17% de semillas vacías en *P. neglecta*, 8% de semillas vacías en *P. incarum* y 21% de semillas vacías en *P. pacensis*. Las posibles razones de la ausencia de embrión son la degeneración del cigoto, degeneración del óvulo y la infestación por insectos (Baskin & Baskin, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que para desarrollar su sistema radical las semillas de *Polylepis incana* dependen de la micorrización mientras que en condiciones asépticas no se da el desarrollo de las raíces, razón por la que no se puede descartar el hecho de que *P. pauta* también requiera de las micorrizas para desarrollar raíces y germinar.

Finalmente se puede decir que el análisis de los parámetros morfológicos y los tratamientos germinativos permiten la creación de una línea base de conocimiento que puede ser aplicada en la conservación de los recursos vegetales. Los parámetros morfológicos permitieron determinar que las semillas estudiadas tienen un carácter ortodoxo por lo que su viabilidad no se pierde después del proceso de desecación. A través de la aplicación de técnicas como la germinación *in vitro* se pudieron determinar los tratamientos de desinfección y germinación óptimas para aumentar el porcentaje de germinación de semillas de *Polylepis pauta*. En la mencionada especie la desinfección ideal se logra

utilizando una concentración de NaClO del 5%, mientras que la germinación óptima se obtiene a 25°C y con un medio de cultivo suplementado con ácido giberélico en una concentración de 2 mg/L. No obstante, se observa que las semillas de *P. pauti* tienen porcentajes de viabilidad bajos debido a factores registrados en estudios anteriores como la herbivoría, ausencia de embrión, anatomía de la testa, entre otros.

## Capítulo VI: Conclusiones

El principal objetivo en este estudio fue caracterizar parámetros morfológicos y germinativos de semillas de *Polylepis pauta* Hieron. en bosques andinos del Ecuador. Con el fin de cumplir el objetivo se recolectaron muestras vegetales, se realizaron ensayos para caracterizar la morfología de la semilla y se hicieron ensayos de viabilidad a través del método colorimétrico de tetrazolio y germinación *in vitro*.

Después de estos procedimientos se puede concluir que:

- La recolección de material vegetal de *Polylepis pauta* en diferentes parches de bosques andinos permite recopilar información como la forma de vida, características morfológicas de la planta, distribución y rango altitudinal para establecer una base de datos en el banco de semillas.
- Los frutos de *Polylepis pauta* miden  $4,366 \pm 0,649$  mm de largo y  $2,162 \pm 0,316$  mm de ancho. Mientras que las semillas poseen un tamaño promedio de  $3,846 \pm 0,604$  mm de largo y  $1,352 \pm 0,281$  mm de ancho y pesan  $2,968 \pm 0,372$  mg. Además, tienen un contenido de humedad de  $6,258 \pm 2,498$  %. Estos valores indican que las semillas tienen un comportamiento ortodoxo.
- Las semillas de *Polylepis pauta* poseen forma elíptica y un embrión de tipo axial espatulado que posee latencia de tipo fisiológica. Sin embargo, al ser aquenios la forma y color de frutos son indispensables en el análisis de las relaciones ecológicas en la reproducción sexual de esta especie.
- En la evaluación de viabilidad mediante el método del tetrazolio, el mayor porcentaje de semillas viables (20%) se obtuvo con el tratamiento TV2 en el que se aplicó la solución de tetrazolio al 1% y 24 horas de inmersión, sin embargo, a comparación de los otros tratamientos no hubo una diferencia estadísticamente significativa.
- En la desinfección de *P. pauta* se obtuvo un mayor porcentaje de semillas no contaminadas (93,33%) utilizando una concentración de hipoclorito de sodio al 5% en el tratamiento TD3,



mientras que el mayor porcentaje de semillas contaminadas se obtuvo al utilizar una concentración del 0% de NaClO.

- El porcentaje máximo de germinación de semillas de *P. pauta* fue del 16,67%, el cual se obtuvo al exponer a las semillas a condiciones de temperatura de 25°C y una concentración de ácido giberélico de 2 mg/L. De igual manera el índice de latencia más bajo se dio a las condiciones mencionadas.
- Los parámetros morfológicos y los tratamientos germinativos aplicados produjeron un incremento significativo en el porcentaje de germinación de las semillas de *P. pauta*.
- Los diferentes análisis permitieron determinar que las semillas de *P. pauta* son aptas para su almacenamiento en el banco de germoplasma HANS-BANK y su posterior uso en planes de reforestación.

### Capítulo VII: Recomendaciones

- Se recomienda extender el tiempo de análisis de la germinación *in vitro* de las semillas de *P. paut* y tener un tamaño muestral más amplio para que los datos estadísticos sean representativos.
- En la germinación *in vitro* se recomienda probar con otro tipo de giberelinas o con concentraciones de ácido giberélico más altas para evaluar las variaciones en el proceso de germinación.
- Trabajar con la siembra de embriones a nivel *in vitro* para promover la germinación evitando el uso de semillas vacías.

## Bibliografía

Amanda, B. (2002). *Blue Planet Biomes - Polylepis Forest*.

[https://www.blueplanetbiomes.org/polylepis\\_forest.php](https://www.blueplanetbiomes.org/polylepis_forest.php)

Arrázola, S., Ruiz, O., & Gareca, E. (2022). *Guía de reforestación de bosques de kewiña (Polylepis spp.) en Cochabamba-Bolivia*.

Bardales Manrique, J. E. (2004). "Propagación 'in vitro' de distintas especies de prunus." 54.

Baskin, C., & Baskin, J. (1998). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination* .

[https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=vXfNCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=-rkjThHUw9&sig=91265i7zrHf-2AK3uljnpGawnc0&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=vXfNCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=-rkjThHUw9&sig=91265i7zrHf-2AK3uljnpGawnc0&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2014). Seeds: Ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination. In *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination* .

<https://doi.org/10.1016/C2013-0-00597-X>

Beltrán, K., Salgado, S., Cuesta, F., León, S., Romoleroux, K., Ortiz, E., Cárdenas, A., & Velástegui, A. (2009).

Distribución espacial, sistemas ecológicos y caracterización florística de los páramos en el Ecuador. *EcoCiencia, Proyecto Páramo Andino y Herbario QCA. Quito.*, 150.

<http://biblio.flacsoandes.edu.ec/catalog/resGet.php?resId=43576>

Borges García, M., Estrada Abeal, E., Pérez Rodríguez, I., & Meneses Rodríguez, S. (2009). *Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de Dioscorea alata L. clon caraqueño*.

Boza Espinoza, T. E., & Kessler, M. (2022). A monograph of the genus *Polylepis* (Rosaceae). *PhytoKeys* 203: 1-274, 203, 1–274. <https://doi.org/10.3897/PHYTOKEYS.203.83529>

Bravo, E. (2014). *La biodiversidad en el Ecuador*.

- Bustamante, M. M. C., Roitman, I., Aide, T. M., Alencar, A., Anderson, L. O., Aragão, L., Asner, G. P., Barlow, J., Berenguer, E., Chambers, J., Costa, M. H., Fanin, T., Ferreira, L. G., Ferreira, J., Keller, M., Magnusson, W. E., Morales-Barquero, L., Morton, D., Ometto, J. P. H. B., ... Vieira, I. C. G. (2016). Toward an integrated monitoring framework to assess the effects of tropical forest degradation and recovery on carbon stocks and biodiversity. *Global Change Biology*, 22(1), 92–109.  
<https://doi.org/10.1111/GCB.13087>
- Camacho, M. (2014). Los páramos ecuatorianos: caracterización y consideraciones para su conservación y aprovechamiento sostenible. *Revista Anales*, 1(372), 77–92.  
<https://doi.org/10.29166/anales.v1i372.1241>
- Camel, V., Quispe-Melgar, H., Ames-Martinez, F., Navarro, W., Segovia-Salcedo, M. C., & Kessler, M. (2019). Forest structure of three endemic species of the genus *Polylepis* (Rosaceae) in central Perú. *Ecología Austral*. <https://doi.org/10.25260/EA.19.29.3.0.812>
- Cárdenas, A., & Espinoza, R. (2014). *Guía práctica de cultivo in vitro de especies vegetales*. 1(1), 50.
- Castro, A., & Flores, M. (2015). Caracterización de un bosque de Queñual (*Polylepis* spp.) ubicado en el distrito de Huasta, Provincial de Bolognesi (Ancash, Perú). *Ecología Aplicada*, 14(1–2), 1.  
<https://doi.org/10.21704/rea.v14i1-2.77>
- Chamorro, A., Giardino, J. R., Granados-Aguilar, R., & Price, A. E. (2015). A Terrestrial Landscape Ecology Approach to the Critical Zone. *Developments in Earth Surface Processes*, 19, 203–238.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63369-9.00007-0>
- Chen, S. Y., Chien, C. Te, Chung, J. Der, Yang, Y. S., & Kuo, S. R. (2007). Dormancy-break and germination in seeds of *Prunus campanulata* (Rosaceae): role of covering layers and changes in concentration of abscisic acid and gibberellins. *Seed Science Research*, 17(1), 21–32.

<https://doi.org/10.1017/S0960258507383190>

Chin, H., Krishnapillay, B., & Stanwood, P. (1989). *Seed Moisture: Recalcitrant vs. Orthodox seeds*.

<https://doi.org/10.2135/cssaspecpub14.c2>

Cierjacks, A., Rühr, N. K., Wesche, K., & Hensen, I. (2008). Effects of altitude and livestock on the regeneration of two tree line forming *Polylepis* species in Ecuador. *Plant Ecology*, *194*(2), 207–221.

<https://doi.org/10.1007/s11258-007-9285-x>

Cierjacks, A., Salgado, S., Wesche, K., & Hensen, I. (2008). Post-fire population dynamics of two tree species in high-altitude *polylepis* forests of central Ecuador. *Biotropica*, *40*(2), 176–182.

<https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2007.00361.x>

Cuesta, F., Peralvo, M., & Valarezo, N. (2009). Los bosques montanos de los Andes tropicales. Una evaluación regional de su estado de conservación y su vulnerabilidad a efectos del cambio climático. In *Serie Investigación y Sistematización #5. Programa Regional ECOBONA - INTERCOOPERATION., Quito, Ecuador*.

Daud Thoene, A., Habib Intersimone, N., & Sánchez Riera, A. (2008). Antimicrobial activity of leaf and bark ethanol extracts from *Polylepis australis* Bitter (queñoa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *13*(3), 1–11.

Fjeldså, J., & Kessler, M. (1996). *Conserving the biological diversity of Polylepis woodlands of the highland of Peru and Bolivia. A contribution to sustainable natural resource management in the Andes*.

Galván Contreras, R., Ruiz Tapia, R. A., Segura Cervantes, E., & Cortés Aguilar, R. M. A. (2016). Estudio comparativo sobre la efectividad del hipoclorito de sodio al 6% vs. la solución bromo-cloro-dimetilhidantoína para la desinfección en ambientes hospitalarios. *Perinatología y Reproducción Humana*, *30*(4), 145–150. <https://doi.org/10.1016/J.RPRH.2017.06.001>

- Galván, S. (2015). *Fragmentación de Bosque y su relación con la conservación de primates diurnos en el arroyo Pechelín, Sucre, Colombia*. 151, 10–17.
- Guo, C., Shen, Y., & Shi, F. (2020). Effect of temperature, light, and storage time on the seed germination of *pinus bungeana* zucc. ex endl.: The role of seed-covering layers and abscisic acid changes. *Forests*, 11(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/f11030300>
- Gupta, R., & Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant: Still a mystery unresolved. *Plant Signaling & Behavior*, 8(9). <https://doi.org/10.4161/PSB.25504>
- Hofstede, R., Segarra, P., & Mena, P. (2003). *Los Páramos del Mundo*.
- Hong, T. D., & Ellis, R. (1998). Contrasting seed storage behaviour among different species of Meliaceae. *Seed Science and Technology*.
- Iglesias García, J. E. (2008). *Germinación de Polylepis incana Kunth y Polylepis pauta Hieron en vivero y en el límite altitudinal superior del bosque*. PUCE.
- Isch López, E. (2012). El cambio climático y gestión de páramos. *Consortio Camaren*, 29.
- Lauer, W., Rafiqpoor, M., & Theisen, I. (2001). Physiogeographie, Vegetation und Syntaxonomie der Flora des Páramo de Papallacta (Ostkordillere Ecuador). *Erdwissenschaftliche Forschung, Band XXXIX*.
- Lenntech. (n.d.). *Chlorine as disinfectant* . Retrieved February 15, 2023, from <https://www.lenntech.es/procesos/desinfeccion/quimica/desinfectantes-cloro.htm>
- Mancipe-Murillo, C., Calderón-Hernández, M., Pérez-Martínez, L. V., Mancipe-Murillo, C., Calderón-Hernández, M., & Pérez-Martínez, L. V. (2018). Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio. *Caldasia*, 40(2), 366–382. <https://doi.org/10.15446/CALDASIA.V40N2.68251>

- Martin, A. C. (1946). The Comparative Internal Morphology of Seeds. *American Midland Naturalist*, 36(3), 513. <https://doi.org/10.2307/2421457>
- Maxted, N. (2013). In Situ, Ex Situ Conservation. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, 4, 313–323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00049-6>
- Mena, P., & Medina, G. (2019). *La biodiversidad de los páramos en el Ecuador*. 1–26.
- Miller, A. (2013). *AOSA/SCST Tetrazolium testing handbook*.
- Pérez, F., & Pita, J. M. (2014). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. *Igarss 2014*, 1, 1–5.
- Purcell, J., & Brelsford, A. (2004). *Reassessing the Causes of Decline of Polylepis, a Tropical Subalpine Forest*. 155–158.
- Quintero Vallejo, E., Benavides, A. M., Moreno, N., & Gonzalez-Caro, S. (2017). *Bosques Andinos, estado actual y retos para su conservación*. . Medellín. [https://www.bosquesandinos.org/wp-content/uploads/2018/01/Libro\\_Bosques\\_Andinos\\_Interactivo.pdf](https://www.bosquesandinos.org/wp-content/uploads/2018/01/Libro_Bosques_Andinos_Interactivo.pdf)
- Renison, D., Cingolani, A. M., & Suarez, R. (2002). Efectos del fuego sobre un bosquecillo de *Polylepis australis* (Rosaceae) en las montañas de Córdoba, Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75(4), 719–727. <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2002000400007>
- Renison, D., Hensen, I., & Cingolani, A. M. (2004). Anthropogenic soil degradation affects seed viability in *Polylepis australis* mountain forests of central Argentina. *Forest Ecology and Management*, 196(2–3), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.03.025>
- Ricardo, B.-V., Alberto, J.-O., Leonel, A.-H., Del, D., Resumen, A., & De, D. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura The plant hormones, an important component of the agriculture development Editado por: Selva Andina Research Society. *Journal of the Selva Andina*

*Biosphere* ®. Bolivia. All Rights Reserved.

Romero-Saritama, J. M., & Granda, M. G. (2020). Variación Del Número De Semillas En Frutos De 156 Especies Leñosas Del Ecuador. *Axioma*, 1(23), 52–60.

<https://doi.org/10.26621/xvi23.2020.12.a09.pucesi.2550.6684>

Romero, J. M., & Pérez, C. (2016). Seed morphological traits and their implication in the ex situ conservation of woody species in Tumbesian dry forests. *Ecosistemas*, 25(2), 59–65.

<https://doi.org/10.7818/ECOS.2016.25-2.07>

Romoleroux, K., Cárate, D., Eler, R., & Navarrete, H. (2016). *Plantas vasculares de los Bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi*.

Ruiz, X. (2009). *Desarrollo de estrategias para la obtención de material de siembra de Lulo Solanum quitoense L.*

[http://repositorio.unicauca.edu.co:8080/bitstream/handle/123456789/729/DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL DE SIEMBRA DE LULO Solanum quitoense L..pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unicauca.edu.co:8080/bitstream/handle/123456789/729/DESARROLLO%20DE%20ESTRATEGIAS%20PARA%20LA%20OBTENCI%C3%93N%20DE%20MATERIAL%20DE%20SIEMBRA%20DE%20LULO%20Solanum%20quitoense%20L..pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Santillán, M. (2022). *Determinación de un protocolo de germinación in vitro de semillas de cuatro especies del género Lchemilla (Focke) Rydberg (Rosaceae) recolectadas en el Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador. 8.5.2017*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>

Sasaki, N., & Putz, F. E. (n.d.). *Critical need for new definitions of “forest” and “forest degradation” in global climate change agreements*. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2009.00067.x>

Seltmann, P., Leyer, I., Renison, D., & Hensen, I. (2006). Variation of seed mass and its effects on germination in *Polylepis australis*: implications for seed collection. *New Forests* 2006 33:2, 33(2),



171–181. <https://doi.org/10.1007/S11056-006-9021-8>

Szczerba, A., Płażek, A., Pastuszek, J., Kopeć, P., Hornyák, M., & Dubert, F. (2021). Effect of low temperature on germination, growth, and seed yield of four soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Agronomy*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11040800>

Tipán, Á. (2011). *Germinación de semillas de fresa (Fragaria spp.) con estimulación de una hormona utilizando tres tipos de sustratos*. 58. <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2214/1/T-UTEQ-0254.pdf>

Vasco, S. (2010). *Tratamientos para promover la germinación de semillas de Polylepis reticulata Hieron. y Polylepis lanuginos Kunth*. Universidad del Azuay.

Vega, C. K., Villegas, C. G., Rocabado, P. A., Quezada, J. A. N., López, M. Y., & Quevedo, A. W. (2018). Biología reproductiva de tres especies de *Polylepis* (*P. neglecta*, *P. incarum* y *P. pacensis*), con énfasis en su comportamiento germinativo. *Ecología Austral*, *28*(1), 310–324.