



Caracterización de parámetros morfológicos y germinativos de semillas de *Polylepis incana* Kunth en Bosques Andinos del Ecuador

Ayo Sani, Grace Alejandra

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Segovia Salcedo, María Claudia PhD.

19 de abril del 2023

2/17/23, 3:00 PM

REVISION TESIS

Originality report

COURSE NAME
TESIS GRACE

STUDENT NAME
GRACE ALEJANDRA AYO SANI

FILE NAME
GRACE ALEJANDRA AYO SANI - Untitled document

REPORT CREATED
Feb 17, 2023

Summary

Flagged passages	1	0.1%
Cited/quoted passages	0	0%

Web matches

scielo.org.pe	1	0.1%
---------------	---	------

1 passage

Student passage FLAGGED

...tratamientos aplicados con las diferentes concentraciones de NaClO. Posteriormente, **las semillas fueron enjuagadas 3 veces o más con agua destilada estéril**

Top web match

Previa a su siembra, **las semillas fueron** desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, durante 5 minutos, posteriormente **enjuagadas tres veces con agua destilada estéril** y secadas...

Determinación de microorganismos fúngicos en semillas de ... http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332004000200009



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 incana* Kunth en Bosques Andinos del Ecuador**” fue realizado por la señorita **Ayo Sani, Grace Alejandra**, 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, 19 de abril de 2023



firmado electrónicamente por:
MARIA CLAUDIA
SEGOVIA SALCEDO

.....
Segovia Salcedo, María Claudia PhD.

C. C.: 1709055998



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

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Ayo Sani, Grace Alejandra**, con cédula de ciudadanía n° 1727681387, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Caracterización de parámetros morfológicos y germinativos de semillas de *Polylepis incana* Kunth 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, 19 de abril de 2023

.....
Ayo Sani, Grace Alejandra

C.C.: 1727681387



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Ayo Sani, Grace Alejandra**, con cédula de ciudadanía n° 1727681387, 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 incana* Kunth en Bosques Andinos del Ecuador** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 19 de abril de 2023

.....
Ayo Sani, Grace Alejandra

C.C.: 1727681387

Dedicatoria

A mi madre, a mis hermanas, a mi abuelita, a mi tía, a mis tíos, a mi mejor amiga y a mis mascotas, por siempre brindarme su amor, ayuda y apoyo incondicional a lo largo de los años de mi formación académica.

Grace Alejandra Ayo Sani

Agradecimientos

A Dios, a mi madre y a mis hermanas por ser mi fuerza en los momentos difíciles y por su apoyo incondicional en el transcurso de la carrera.

A la Dra. María Claudia Segovia Ph.D. y a la Dra. Karina Isabel Proaño Ph.D., por permitirme ser parte de este proyecto, por su orientación y guía durante el desarrollo del mismo.

A la Ing. Gabriela Miño por su paciencia y conocimientos impartidos durante este proyecto.

A María Gabriela, Marjorie e Indira por su amistad, consejos, risas, ánimos y ayuda a lo largo de mi vida universitaria y en este trabajo de titulación.

A los proyectos BIO-GEEC y HANS-BANK por la oportunidad de realizar este trabajo.

Índice de contenidos

Reporte de análisis anti plagio Google Assignments.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Resumen.....	13
Abstract	14
Capítulo I: Introducción.....	15
Planteamiento del problema.....	15
Justificación del problema	16
Hipótesis	18
Objetivos	18
<i>Objetivo general</i>	18
<i>Objetivos específicos</i>	18
Capítulo II: Marco Teórico	19
Bosques andinos y páramos del Ecuador.....	19
<i>Importancia de los bosques andinos y los páramos</i>	20
<i>Amenazas en los bosques andinos y páramos</i>	20
Género <i>Polylepis</i>	21
<i>Taxonomía y evolución</i>	22

<i>Distribución del género Polylepis en el Ecuador</i>	23
<i>Polylepis incana Kunth</i>	24
Descripción Morfológica de <i>P. incana</i>	25
Parámetros morfológicos de las semillas.....	25
<i>Parámetros cuantitativos</i>	25
<i>Parámetros cualitativos</i>	26
Viabilidad de semillas	26
<i>Test de tetrazolio</i>	27
Germinación <i>in vitro</i>	27
<i>Factores que influyen en la germinación in vitro</i>	27
<i>Fitorreguladores utilizados en la germinación in vitro</i>	29
Capítulo III: Metodología.....	30
Recolección y pretratamiento del material vegetal	30
Caracterización morfológica de las semillas	30
Ensayo de viabilidad de las semillas.....	31
<i>Prueba colorimétrica de tetrazolio</i>	31
Ensayo de desinfección en las semillas.....	32
Ensayo de germinación <i>in vitro</i> en las semillas	34
Análisis Estadístico de Datos	35
<i>Análisis exploratorio de datos para la caracterización morfológica</i>	35
<i>Diseño experimental para el ensayo de viabilidad</i>	35

	10
<i>Diseño experimental para el ensayo de desinfección de semillas</i>	36
<i>Diseño experimental para el ensayo de germinación in vitro de semillas</i>	36
Capítulo IV: Resultados	38
Material vegetal colectado	38
Caracterización morfológica de las semillas de <i>P. incana</i>	39
<i>Parámetros cualitativos</i>	40
<i>Parámetros cuantitativos</i>	41
Viabilidad de las semillas de <i>P. incana</i>	41
Desinfección de semillas de <i>P. incana</i>	44
Germinación de semillas de <i>P. incana</i>	47
<i>Capacidad germinativa</i>	47
<i>Índice de latencia</i>	51
Capítulo V: Discusión	52
Características morfológicas de las semillas de <i>P. incana</i>	53
Viabilidad y germinación de las semillas de <i>P. incana</i>	57
Capítulo VI: Conclusiones	61
Capítulo VII: Recomendaciones	63
Bibliografía	64

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Distribución de las especies de Polylepis en el Ecuador.....</i>	24
Tabla 2 <i>Tratamientos para los ensayos de viabilidad de las semillas de Polylepis incana.....</i>	32
Tabla 3 <i>Tratamientos para la desinfección de las semillas de Polylepis incana.....</i>	33
Tabla 4 <i>Tratamientos para la germinación in vitro de las semillas de Polylepis incana.....</i>	34
Tabla 5 <i>Resultados de los parámetros morfológicos cuantitativos de las semillas de Polylepis incana.....</i>	41
Tabla 6 <i>Resultados de la prueba de Shapiro-Wilks realizada a los tratamientos de viabilidad.</i>	42
Tabla 7 <i>Resultados del método de Duncan aplicado a los tratamientos de viabilidad.....</i>	43
Tabla 8 <i>Resultados de la prueba de Shapiro-Wilks aplicada a los tratamientos de desinfección.</i>	45
Tabla 9 <i>Resultados de la prueba no paramétrica Kruskal Wallis realizada a los tratamientos de desinfección.....</i>	46
Tabla 10 <i>Resultados de la prueba de Shapiro-Wilks aplicada a los tratamientos de germinación in vitro.....</i>	48
Tabla 11 <i>Resultados del método no paramétrico Kruskal Wallis realizado a los tratamientos de germinación in vitro.....</i>	49

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Frutos recolectados de <i>Polylepis incana</i>.</i>	38
Figura 2 <i>Ficha técnica de <i>Polylepis incana</i>.</i>	39
Figura 3 <i>Rasgos morfológicos cualitativos de la semilla <i>Polylepis incana</i>.</i>	40
Figura 4 <i>Tinción de los embriones de las semillas de <i>Polylepis incana</i>.</i>	42
Figura 5 <i>Porcentaje de semillas viables de <i>Polylepis incana</i> en cada tratamiento aplicado.</i>	44
Figura 6 <i>Semillas de <i>Polylepis incana</i> contaminadas con agentes infecciosos</i>	45
Figura 7 <i>Porcentajes de semillas no contaminadas de <i>Polylepis incana</i> en cada tratamiento de desinfección aplicado.</i>	47
Figura 8 <i>Semilla germinada de <i>Polylepis incana</i></i>	48
Figura 9 <i>Porcentajes de semillas germinadas de <i>Polylepis incana</i> en cada tratamiento de germinación in vitro aplicado.</i>	50
Figura 10 <i>Índice de latencia en las semillas de <i>Polylepis incana</i>.</i>	51

Resumen

Los bosques andinos son ecosistemas albergan gran parte de la biodiversidad del mundo, mitigan los gases de efecto invernadero y regulan las fuentes hídricas. En nuestro país, el género *Polylepis* posee 11 especies nativas, donde una de ellas es *Polylepis incana* Kunth. Estos árboles se encargan controlar la erosión de los suelos, capturar el CO₂ y gestionar los recursos hídricos. Por lo tanto, es necesario proteger y preservar estos ecosistemas montañosos. El objetivo del presente estudio fue caracterizar los parámetros morfológicos y germinativos de las semillas de *P. incana* de los bosques andinos del Ecuador, con el propósito de conservar su diversidad genética en el banco de semillas HANS-BANK. Para esto, se recolectó material vegetal de *P. incana* en la Reserva Ecológica Antisana y el Área de Conservación Hídrica Paluguillo. Luego, en las semillas se determinaron los rasgos morfológicos cualitativos y cuantitativos, la viabilidad, la concentración eficaz de hipoclorito de sodio (NaClO) para desinfección y condiciones óptimas para germinación *in vitro*. Los resultados demostraron que las semillas tienen la capacidad de resistir los procesos de desecación, poseen una viabilidad de 17.78%, la concentración eficaz para la desinfección fue de NaClO al 7%, la adición de 2mg/L de GA₃ en el medio de cultivo y una temperatura constante de 25°C favorecieron la capacidad germinativa. En conclusión, los datos obtenidos permitieron establecer que las semillas de *P. incana* son aptas para procesos de conservación en bancos de germoplasma y restauración de los ecosistemas andinos ecuatorianos.

Palabras claves: Bosque andino, conservación, morfología, germinación

Abstract

Andean forests are ecosystems that are home to a large part of the world's biodiversity, mitigate greenhouse gases and regulate water sources. In our country, the *Polylepis* genus has 11 native species, where one of them is *Polylepis incana* Kunth. These trees control soil erosion, capture CO₂ and manage water resources. Therefore, it is necessary to protect and preserve these mountain ecosystems. The objective of the present study was to characterize the morphological and germination parameters of *P. incana* seeds from the Andean forests of Ecuador, with the purpose of conserving their genetic diversity in the HANS-BANK seed bank. For this purpose, plant material of *P. incana* was collected in the Antisana Ecological Reserve and the Paluguillo Water Conservation Area. Then, qualitative and quantitative morphological traits, viability, effective concentration of sodium hypochlorite (NaClO) for disinfection and optimal conditions for *in vitro* germination were determined in the seeds. The results showed that the seeds have the capacity to resist desiccation processes, they have a viability of 17.78%, the effective concentration for disinfection was 7% NaClO, the addition of 2mg/L of GA3 in the culture medium and a constant temperature of 25°C favored germination capacity. In conclusion, the data obtained allowed us to establish that the seeds of *P. incana* are suitable for conservation processes in germplasm banks and restoration of Ecuadorian Andean ecosystems.

Key words: Andean forest, conservation, morphology, germination

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

Los bosques andinos del Ecuador forman parte de los ecosistemas con mayor biodiversidad del mundo (Bussmann, 2005). Estos bosques se encuentran aproximadamente entre los 2400 y 5300 m.s.n.m. a lo largo de la cordillera de los Andes (Cortés et al., 2020), debido a su elevada altitud presentan temperaturas bajas y alta humedad (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019). Por tal razón, tanto la flora como la fauna cuentan con varias especies endémicas adaptadas a este tipo de condiciones (Romoleroux et al., 2016).

La importancia de los bosques andinos y de los páramos radica en sus funciones ecológicas ya que recolectan agua, regulan las fuentes hídricas, ayudan a controlar la erosión del suelo y funcionan como sumideros de carbono (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019). Al mismo tiempo, contribuyen con la generación de recursos económicos como la producción de alimentos agrícolas y la gestión de áreas de turismo (Bussmann, 2005).

Sin embargo, estos ecosistemas montañosos son vulnerables a causa de las actividades antropogénicas. La deforestación, las actividades mineras, el cambio climático, la agricultura, la ganadería y los incendios, reducen la extensión superficial de los bosques, alterando la estructura de la vegetación y disminuyendo la diversidad biológica (Romoleroux, 2018).

En nuestro país, el 28% de los bosques y páramos andinos han sido afectados gravemente por las actividades mineras, lo que ha reducido la capacidad de recuperación de estas áreas. Los incendios forestales y el pastoreo también son otros de los principales problemas que enfrentan estos ecosistemas, pues han incrementado la escorrentía y la erosión de los suelos. El calentamiento global es otro problema que ha alterado los factores ambientales de los bosques andinos. El aumento de 3°C en la temperatura media anual y el cambio de la frecuencia de las precipitaciones, causan estrés ambiental que influye

negativamente en el ciclo hidrológico, disminuyendo la retención de carbono en los bosques andinos (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019).

Actualmente, los estudios sobre los procesos de conservación y regeneración de estos ecosistemas son muy pocos, ya que muchas de las investigaciones se limitan a áreas de bajas altitudes y de fácil accesibilidad (Bussmann, 2005). En consecuencia, es necesario promover proyectos y estrategias de restauración ecológica para la preservación de especies en estos ecosistemas (Gómez-Ruiz et al., 2013). La caracterización morfológica, la estandarización de protocolos de viabilidad y la germinación de semillas permitirá establecer una línea base de conocimiento para la generación de bancos de semillas.

Justificación del problema

Ecuador es uno de los países más ricos en biodiversidad del planeta. Sin embargo, presenta altas tasas de deforestación y superpoblación. Las actividades humanas como la agricultura, la plantación de pastizales, la extracción de madera, la introducción de especies exóticas, los incendios forestales y la minería, han tenido un impacto sobre estas zonas, ya que contribuyen a la degradación de los bosques andinos y con ello, a la disminución de la diversidad biológica (Eras García et al., 2021).

Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias de conservación y reforestación enfocadas en estos bosques. Los bancos de germoplasma tienen como fin almacenar a mediano y largo plazo genotipos de semillas de especies vegetales (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010). Entre los criterios necesarios para determinar qué especies preservar, se debe tomar en cuenta el endemismo, el estado de conservación y la importancia ecológica, cultural y económica para los pobladores locales. Además, es fundamental caracterizar la morfología, la tolerancia a la desecación y evaluar el poder germinativo de las semillas a diferentes condiciones, con el propósito de establecer los parámetros de almacenamiento (Viana et al., 2011).

Al ser los bosques andinos los principales reguladores del suministro de agua, reservorios de dióxido de carbono y de gases de efecto invernadero, sus especies cumplen un rol en el funcionamiento de estos ecosistemas (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019). El género *Polylepis* forma parte de la vegetación natural del páramo, por lo que ofrece un hábitat seguro a aves, mamíferos e insectos (Romoleroux et al., 2016). Los bosques de *Polylepis* también albergan recursos alimenticios, protegen las fuentes hídricas, aumentan la captación y calidad del agua, reducen la erosión de los suelos y contribuyen a la formación de suelos fértiles (Cuyckens & Renison, 2018). Actualmente, se han descrito 45 especies, de las cuales se han registrado 11 nativas en nuestro país, siendo una de ellas *Polylepis incana* Kunth (Boza & Kessler, 2022).

Sin embargo, estudios previos han demostrado que este género posee un bajo porcentaje de germinación, provocando así una regeneración lenta de los bosques de *P. incana* de acuerdo a las investigaciones realizadas por Canales Gutiérrez et al. (2020) en Perú. Por lo tanto, es necesario estudiar poblaciones de *P. incana* Kunth en Ecuador, donde a través de la caracterización de los parámetros morfológicos y germinativos de las semillas, se puede preservar su diversidad mediante el proyecto BIO-GEEC (consorcio alemán-ecuatoriano sobre biodiversidad) y el banco de semillas HANS-BANK.

Hipótesis

Los parámetros morfológicos y los tratamientos de germinación *in vitro*, aumentan de manera estadísticamente significativa la capacidad germinativa de las semillas de *Polylepis incana* Kunth.

Objetivos

Objetivo general

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

Objetivos específicos

- Recolectar de forma aleatoria muestras de semillas de la especie *Polylepis incana* Kunth en diferentes parches de Bosques Andinos del Ecuador.
- Identificar parámetros morfológicos cuantitativos y cualitativos de semillas de la especie *Polylepis incana* Kunth a partir de muestras recolectadas en Bosques Andinos del Ecuador.
- Analizar semillas de la especie *Polylepis incana* Kunth 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 incana* Kunth mediante el uso de diferentes tratamientos de germinación a nivel *in vitro*.

Capítulo II: Marco Teórico

Bosques andinos y páramos del Ecuador

Los bosques andinos del Ecuador forman parte de los ecosistemas montañosos con mayor biodiversidad del mundo, los cuales se encuentran distribuidos a lo largo de la Cordillera de los Andes (Cortés et al., 2020). Los bosques andinos se clasifican según Bussmann (2005) en: bosque andino o montano bajo (1800 a 2100 m.s.n.m.), bosque andino o montano alto (2100 a 2650 m.s.n.m.) y bosque nublado subalpino (>2650 m.s.n.m.).

Por otra parte, los páramos andinos abarcan cerca del 7% del territorio de nuestro país, localizándose entre los 3000 y 5000 m.s.n.m. En cuanto a su clasificación, se dividen en: subpáramo o páramo inferior (3000 a 4000 m.s.n.m.), páramo medio (4000 a 4500 m.s.n.m.) y páramo superior o superpáramo (>4500 m.s.n.m.) (Camacho, 2013).

Los patrones de diversidad de estos ecosistemas varían según el gradiente altitudinal. Las comunidades de epífitas como musgos, helechos y líquenes, aumentan en diversidad y biomasa a mayor elevación. Estos ecosistemas se conforman principalmente por árboles que pueden llegar a medir hasta 20 metros de altura, los cuales brindan hogar y refugio a varias especies de plantas y animales como aves, mamíferos, anfibios e insectos (Romoleroux et al., 2016).

La baja evapotranspiración, los rangos de alta humedad, la acumulación de materia orgánica y la morfología de sus plantas destacan entre las principales características sobre todo en la zona de los páramos (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019). La vegetación natural de estos hábitats está conformada por pajonales, almohadillas, especies arbustivas y leñosas, adaptadas de tal forma que resisten las bajas temperaturas y la alta radiación ultravioleta (Camacho, 2013).

Importancia de los bosques andinos y los páramos

Los bosques andinos y los páramos brindan varios servicios ecosistémicos, entre los cuales se destaca la mitigación de gases de efecto invernadero, el control de erosión del suelo y la captura de carbono (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019). Es importante la capacidad de almacenamiento de carbono de los bosques andinos, la cual se encuentra entre 0,67 a 0,8 toneladas anuales por hectárea, siendo superior a la de los bosques de la Amazonía, que es de 0,5 toneladas por hectárea (Duque et al., 2021).

En cuanto a la función hidrológica, los bosques andinos y páramos son importantes porque llevan a cabo la acumulación, la regulación y el suministro de agua (Bussmann, 2005; Chuncho Morocho & Chuncho, 2019). Los árboles de los bosques andinos absorben el agua proveniente de las precipitaciones y de la neblina, para que a través de sus raíces la transporten por el suelo hasta las cuencas hídricas que nacen de los páramos y de los valles interandinos. Este recurso es aprovechado por las poblaciones locales para el riego, generación hidroeléctrica, agua potable, entre otros. Adicionalmente, los páramos también son el hogar, territorio y fuente de sustento de varias comunidades campesinas (Camacho, 2013).

Amenazas en los bosques andinos y páramos

Los bosques andinos y páramos son considerados ecosistemas frágiles debido a que la deforestación, degradación y pérdida de sus especies son causadas por actividades antropogénicas. Los incendios forestales, la tala de árboles indiscriminada, la extensión de la frontera agropecuaria, la agricultura, la minería y la introducción de especies exóticas, tienen un grave impacto negativo en estos ecosistemas (Cortés et al., 2020).

En Ecuador, la disminución del 28% de los bosques y páramos andinos ha sido ocasionada por las actividades mineras, dificultando cada vez más el proceso de recuperación de estos hábitats. El establecimiento de pastizales y la demanda de la industria maderera también ha provocado la destrucción de estos bosques. Por lo tanto, se ha recurrido a

plantaciones forestales de especies exóticas de rápido crecimiento como *Pinus radiata*, *Pinus patula* y *Eucalyptus globulus*, con el propósito de reforestar las áreas degradadas y satisfacer la demanda de madera en el mercado mundial. Sin embargo, dichas especies están desplazando la vegetación endémica de estos ecosistemas montañosos y están alterando la estructura de los mismos (Bussmann, 2005; Chunchu Morocho & Chunchu, 2019).

El calentamiento global es otra amenaza creciente, pues altera la composición de los bosques y páramos andinos. El incremento de la temperatura media anual ha afectado el ciclo hidrológico y ha causado cambios en la intensidad de las precipitaciones, las cuales han llegado a ocasionar deslaves y contribuido en la erosión del suelo (Eras García et al., 2021).

Género *Polylepis*

El género *Polylepis* se encuentra formando fragmentos o parches de bosques en la cordillera de las Andes tropicales y subtropicales de Sudamérica. Estos bosques contienen una biodiversidad única y proveen hábitats para una gran variedad de plantas y animales (Boza & Kessler, 2022).

Los bosques de *Polylepis* sustentan la flora de este ecosistema con plantas como musgos, líquenes, epífitas y plantas vasculares. Asimismo, estos ecosistemas brindan un hábitat para distintas especies de aves, mamíferos, reptiles e insectos. Estos bosques también cumplen un rol importante en la acumulación de agua y la regulación de fuentes hídricas (Romoleroux, 2018). Sin embargo, el uso humano de la tierra ha provocado la pérdida de más del 90% de la cobertura vegetal de los bosques de *Polylepis*. Por esta razón, en los últimos años se han llevado a cabo varios estudios relacionados con la fisiología, ecología y preservación de este género para mitigar la deforestación de estos bosques. Estos estudios han resultado en la publicación de diversos artículos científicos, establecimiento de áreas de conservación y proyectos de restauración (Boza & Kessler, 2022).

En cuanto a la morfología, los árboles de *Polylepis* se caracterizan generalmente por una corteza conformada por multicapas, una ramificación simpodial, vainas estipuladas, hojas imparipinnadas, tricomas en la cara superior o inferior de los folíolos, inflorescencias con racimos largos y colgantes y frutos con protuberancias de diversas formas (Boza & Kessler, 2022).

Taxonomía y evolución

El género *Polylepis* pertenece a la tribu Sanguisorbeae de la familia Rosaceae y evolutivamente se encuentra cercano al género *Acaena*. Los análisis filogenéticos sugieren que *Polylepis* se originó por una hibridación aloploiploide entre dos especies de *Acaena*: *Acaena elongata* y *Acaena cylindristachya* (Cuyckens & Renison, 2018). Las especies basales son árboles con hojas y cortezas delgadas, de 7 a 11 folíolos por hoja e inflorescencias con gran cantidad de flores. Posteriormente, el género evolucionó a especies con cortezas, hojas gruesas, menor número de folíolos y menor número de flores por inflorescencia. Todas estas adaptaciones se dieron en respuesta a los climas fríos de los altos Andes. Posiblemente las especies se vieron obligadas a migrar a hábitats más favorables debido a los cambios meteorológicos durante el periodo pleistocénico, fragmentando de esta forma su distribución (Kessler, 2006).

De acuerdo con Simpson (1986), las especies de *Polylepis* se encuentran comprendidas en tres grupos informales. El primer grupo, “sericea”, el cual abarca especies con rasgos morfológicos ancestrales como hojas mutipinnadas grandes con textura delgada. Este grupo crece en hábitats de bajas altitudes (2000-3000 m.s.n.m.). El segundo grupo, “reticulata”, se destaca por los folíolos emarginados de sus hojas. Se localizan en elevaciones más altas que del primer grupo (3000-4000 m.s.n.m.). Por último, el tercer grupo, “incana”, comprende especies de un solo par de folíolos que se ubican en hábitats de grandes altitudes (>4000 m.s.n.m.). Sin embargo, a pesar de todos los estudios realizados sobre la taxonomía y

la evolución del género *Polylepis*, todavía esta información se encuentra incompleta. La alta variabilidad fenológica de las especies, la hibridación extensiva, la poliploidización y el flujo de genes entre las mismas, complica comprender y definir completamente la historia evolutiva de *Polylepis* (Boza & Kessler, 2022).

Actualmente, Boza y Kessler (2022), reconocen 45 especies de *Polylepis*, de las cuales 7 han sido recientemente descritas. La clasificación infragenérica incluye 5 secciones: *Sericeae*, *Reticulatae*, *Subsericantes*, *Australes* e *Incanaeae*.

La primera sección “*Sericeae*” abarca especies con varios pares de folíolos laterales y frutos con espinas. La segunda sección “*Reticulatae*” posee especies con pocos pares de folíolos laterales y frutos con espinas aplanadas. La tercera sección “*Subsericantes*” incluye 3 especies con rasgos morfológicos intermedios entre la primera y quinta sección. Estas especies tienen un solo par de folíolos laterales y frutos con 3 a 4 crestas aplanadas irregulares. En cuanto a la cuarta sección “*Australes*”, las especies de este grupo se caracterizan por sus numerosos folíolos y frutos alados. Finalmente, en la quinta sección “*Incanaeae*”, las especies se distinguen porque tienen pocos pares de folíolos laterales y frutos con un número variable de crestas aplanadas.

Distribución del género Polylepis en el Ecuador

En Ecuador, se han registrado 10 especies nativas de *Polylepis*, siendo una de ellas *Polylepis incana* Kunth (Boza & Kessler, 2022). Este género se enmarca en un rango altitudinal de 2300 a 4800 m.s.n.m a lo largo de la cordillera Occidental y Oriental del país. En la Tabla 1 se describen las ubicaciones de las especies de *Polylepis* en Ecuador.

Tabla 1*Distribución de las especies de Polylepis en el Ecuador*

Especie	Distribución en Ecuador	Altitud (m.s.n.m)
<i>P. incana</i>	Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi, Loja, Chimborazo, Azuay, Bolívar, Napo	2150-4800
<i>P. lanuginosa</i>	Chimborazo, Cañar, Azuay, Bolívar	2300-4200
<i>P. microphylla</i>	Chimborazo, Tungurahua, Cañar, Azuay	3150-4550
<i>P. pauta</i>	Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Napo	2600-4200
<i>P. reticulata</i>	Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Bolívar, Loja, Chimborazo, Azuay	2750-4600
<i>P. longipilosa</i>	Carchi	3200-3900
<i>P. humboldtii</i>	Chimborazo	3800-4000
<i>P. ochreatea</i>	Carchi, Imbabura, Pichincha	2950-4350
<i>P. simpsoniae</i>	Cañar, Azuay	2500-3800
<i>P. loxensis</i>	Azuay, Loja	2650-3700

Polylepis incana Kunth

Polylepis incana es una especie nativa que ocupa aproximadamente un área de 612 km² en los Andes. La especie está categorizada en peligro crítico (CR) en la Lista Mundial de Árboles Amenazados, debido a que su hábitat ha sido afectado por actividades antrópicas como los incendios forestales y el pastoreo. En nuestro país, la mayoría de las poblaciones se encuentran dentro del sistema de áreas protegidas como es el caso del Parque Nacional El Cajas, la Reserva Ecológica Illinizas, la Reserva Ecológica El Ángel, el Parque Nacional

Cayambe-Coca y la Reserva Ecológica Antisana. Además, cabe destacar que esta especie es una de las más utilizadas para la reforestación en Ecuador (Boza & Kessler, 2022).

Descripción Morfológica de *P. incana*

Polylepis incana Kunth es un árbol diploide de 2 a 15m de altura. Las hojas son imparinnadas con un par de folíolos de contorno elíptico u obovado, margen de 5-9 dientes y un ápice obtuso o emarginado. Además, el envés de las hojas está cubierto de tricomas blancos cortos y exuda resina. (Boza & Kessler, 2022).

Por otro lado, esta especie posee inflorescencias colgantes con 5 a 11 flores triangulares y vellosas en la superficie. Las flores poseen 4 sépalos ovados, verdes y vellosos. Los estambres contienen anteras orbiculares y los estilos son fimbriados. Los frutos son turbinados, tienen 2 a 5 crestas aplanadas con serie de espinas y están cubiertos de vellos (Boza & Kessler, 2022).

Parámetros morfológicos de las semillas

Los rasgos morfológicos son características que afectan los procesos de dispersión, colonización, germinación, supervivencia y rendimiento reproductivo. Por lo tanto, es importante describirlos, ya que nos ayudan a determinar la adaptación de las especies vegetales a los diferentes factores ambientales presentes en los ecosistemas que se desarrollan. De igual manera, estos parámetros nos ayudan a establecer la influencia en los métodos de conservación de semillas *ex situ* (Romero-Saritama & Pérez, 2016).

Parámetros cuantitativos

El número de semillas por fruto es uno de los primeros parámetros morfológicos cuantitativos a identificar. Este parámetro está relacionado con el tipo de fruto y el comportamiento de las semillas para su almacenamiento. El tamaño de las semillas es otro rasgo morfológico importante que comprende el largo, el ancho y el grosor. Este parámetro

junto con el peso y el contenido de humedad de las semillas, están asociados con la tolerancia a la desecación y germinación. Todos estos rasgos determinan si las semillas son ortodoxas o recalcitrantes. Una semilla ortodoxa es aquella que mantiene su viabilidad, tolera la desecación a bajos contenidos de humedad y puede almacenarse a bajas temperaturas. Por otro lado, una semilla recalcitrante es aquella que pierde su viabilidad cuando se realiza el secado y no puede almacenarse en frío (Romero-Saritama & Pérez, 2016).

Parámetros cualitativos

Las semillas tienen una variedad de parámetros morfológicos cualitativos, como la textura de la testa, el tipo de embrión y la presencia o ausencia de endospermo. Estos rasgos ayudan a determinar el comportamiento germinativo y el tipo de latencia en las semillas, siendo estos factores fundamentales para determinar el tratamiento para su conservación en bancos de germoplasma (Romero-Saritama & Pérez, 2016).

Viabilidad de semillas

La viabilidad de las semillas se relaciona con su capacidad para germinar y generar plántulas en condiciones ambientales favorables (Pérez & Pita, 2018). Los ensayos de viabilidad sirven para estimar el potencial de germinación de las semillas al inicio de un estudio o experimento (Lamont, 2022), así como para determinar el éxito de su conservación en bancos de semillas (Pradhan et al., 2022). La evaluación de este parámetro se puede realizar a través de ensayos de germinación, radiografía con rayos X y pruebas colorimétricas como el test azul de Evans, el test de diacetato de fluoresceína (FDA) y el test de tetrazolio (TZ) (Pérez & Pita, 2018; Pradhan et al., 2022). Cabe destacar que el test de tetrazolio es el método de análisis más rápido para determinar la viabilidad de un lote de semillas, independientemente del grado de dormición de las mismas (Ruiz, 2009).

Test de tetrazolio

El ensayo de tetrazolio es una prueba bioquímica que evalúa la viabilidad de semillas con baja capacidad de germinación o semillas en estado latente (Pérez & Pita, 2018). Una solución acuosa de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio o bromuro de 6.5 a 7.5 pH es el indicador necesario para llevar a cabo este test. Normalmente, se usa una concentración de 1%, sin embargo, es válido utilizar diferentes porcentajes (International Seed Testing Association [ISTA], 2016).

Una vez realizado el test de tetrazolio, una semilla viable muestra una coloración rojiza en todos los tejidos vivos. La interacción del indicador con las reacciones de reducción de las células produce la hidrogenación del cloruro de tetrazolio, dando lugar a una sustancia de color rojo. Esto permite diferenciar las partes vivas de las semillas de las muertas, las cuales se mantienen incoloras. Sin embargo, las semillas pueden teñirse parcialmente a causa de la presencia de tejidos necróticos en diferentes áreas o zonas de las mismas (ISTA, 2016).

Germinación *in vitro*

La germinación es un proceso fundamental donde se producen las transformaciones metabólicas necesarias para el crecimiento de una semilla a una plántula (Robb, 2015). La germinación *in vitro* de las semillas se evalúa mediante pruebas que inducen el brote de la radícula en condiciones controladas en un laboratorio. En estos ensayos, las semillas son previamente desinfectadas y luego sembradas en papel filtro húmedo o en un medio de crecimiento específico. Adicionalmente, los factores de humedad, luz, temperatura, entre otros, son controlados con el propósito de facilitar la germinación de la radícula de la semilla (Eycott & Wilfahrt, 2022).

Factores que influyen en la germinación *in vitro*

Los ensayos de germinación *in vitro* se ven influenciados por factores como luz, temperatura, sustrato, humedad, oxígeno (O₂), dióxido de carbono (CO₂), entre otros. Durante

estos ensayos, las semillas son rehidratadas con el fin de romper su estado de latencia y activar nuevamente su metabolismo. La entrada de agua a la semilla es esencial para la germinación *in vitro*. Este proceso se da gracias a la diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que la rodea (Vargas, 1991). Una vez que el agua entra a la semilla, es transportada hacia el embrión a través de las paredes celulares de la cubierta seminal. El exceso o déficit de humedad, afecta el porcentaje de germinación de las semillas (Doria, 2010).

Por otro lado, la temperatura es un factor que influye directamente en las enzimas, regulando la velocidad de las reacciones bioquímicas de los tejidos de las semillas. La actividad enzimática ocurre dentro de un rango de temperatura específico, permitiendo una germinación de forma óptima y rápida. De ahí, cuando la temperatura es demasiado baja o alta, el proceso de germinación se ve alterado (Caroca et al., 2016).

La presencia de oxígeno es fundamental para la respiración de las semillas y está relacionado con la actividad metabólica de las mismas. El intercambio de gases entre el embrión y el medio, favorece la germinación. La presencia de compuestos fenólicos o capas de mucílago en las cubiertas de las semillas reduce la cantidad de oxígeno que ingresa al embrión, reduciendo la germinación. Por otro lado, a medida que aumenta la temperatura, disminuye la absorción de O_2 por parte de las semillas (Doria, 2010). De igual manera, el CO_2 como producto de respiración, puede inhibir la germinación y mantener el estado de latencia de las semillas (Alequin, 2019).

La luz también influye de diferentes maneras en la germinación *in vitro*. Algunas semillas se caracterizan por poseer una fotosensibilidad positiva, es decir, germinan en presencia de luz. Mientras que otras presentan una fotosensibilidad negativa, prefiriendo la oscuridad para romper su estado de latencia. Sin embargo, también hay semillas a las cuales les resulta indiferente la presencia de luz (Alequin, 2019).

Fitorreguladores utilizados en la germinación in vitro

Los fitorreguladores son hormonas vegetales que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estos compuestos son producidos a bajas concentraciones por las propias plantas como respuesta a señales internas o ambientales. Las fitohormonas también pueden ser sintetizadas químicamente, siendo más potentes que los análogos naturales (Alcantara et al., 2019).

Los reguladores de crecimiento vegetal intervienen en la regulación de la germinación y en la dormancia de las semillas, como las giberelinas, el ácido abscísico, los brasinoesteroides, el ácido jasmónico y derivados (Doria, 2010). Las giberelinas (GAs) estimulan la germinación e inducen el crecimiento embrionario. Mientras que el ácido abscísico (ABA) previene la germinación precoz, regulando y manteniendo la dormancia de las semillas. Esta fitohormona, también influye en la maduración de las semillas y en la producción de cigotos (Alcantara et al., 2019).

Capítulo III: Metodología

Recolección y pretratamiento del material vegetal

Previo a la recolección, se determinó la fecha, hora, altitud y coordenadas del sitio de muestreo a través de la aplicación Timestamp Camera Free versión 2022. El material vegetal fue recolectado de árboles de *Polylepis incana* Kunth localizados en la Reserva Ecológica Antisana y en el Área de Conservación Hídrica Paluguillo. La colecta de las semillas se realizó durante el periodo de octubre a diciembre de 2022. Luego, se procedió con la recolección aleatoria de racimos de frutos de los árboles de *P. incana*. Estos racimos fueron almacenados en fundas de papel rotuladas con el nombre de la especie y la fecha de colecta.

A continuación, las muestras obtenidas se transportaron en fundas ziploc al laboratorio, donde se realizó la limpieza de impurezas de los frutos en condiciones asépticas. Los frutos fueron remojados durante 2 horas para facilitar la remoción del pericarpo de las semillas con ayuda de pinzas de reloj y bisturí estériles, para luego colocarlas en cajas Petri estériles. Posteriormente, cada una de las cajas Petri fueron colocadas en fundas ziploc de plástico con sílica gel y se dejaron secar durante 2 semanas. Finalmente, se almacenaron a 4°C hasta el momento de realizar los análisis correspondientes.

Caracterización morfológica de las semillas

Los parámetros morfológicos cualitativos de las semillas de *P. incana* fueron evaluados en 100 semillas. La forma, el color y la textura de la testa de las semillas se determinaron con ayuda de un estereomicroscopio (Romero-Saritama & Pérez, 2016). Mientras el tipo de embrión se determinó según la clasificación de embriones propuesta por Martin (1946).

En cuanto a los parámetros morfológicos cuantitativos, se evaluó el número de semillas por fruto, tamaño, peso y contenido de humedad de las semillas de *P. incana*. El número de semillas por fruto de la especie se determinó a partir de un total de 50 frutos. El tamaño de las semillas se obtuvo mediante la toma de fotografías de 100 semillas. Posteriormente, se

procedió con la medición del largo y ancho de cada una de ellas a través del programa ImageJ 1.49v. Para el caso del peso, se evaluó un promedio de 1000 semillas en una balanza analítica. Finalmente, para el contenido de humedad se pesó 100 semillas en bandejas de aluminio, se las secó a $103\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 17 horas en una estufa y se las pesó nuevamente (ISTA, 2016). El porcentaje de humedad se determinó usando la siguiente ecuación (1).

$$\frac{\text{Pérdida de peso}}{\text{Peso inicial}} * 100 = \frac{M_1 - M_2}{M_1} * 100 \quad (1)$$

En donde

M_1 : Peso en gramos inicial de la muestra

M_2 : Peso en gramos final de la muestra

Ensayo de viabilidad de las semillas

Prueba colorimétrica de tetrazolio

En la prueba de viabilidad se seleccionaron aleatoriamente 180 semillas de la especie de *P. incana*. Las semillas fueron remojadas durante 24 horas antes de llevar a cabo la tinción. Una vez finalizado el remojo, se realizaron cortes longitudinales en las semillas y se sumergieron en soluciones al 0.5% y 1% de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TZ) durante 24 y 48 horas. La solución acuosa de TZ se preparó siguiendo el protocolo de ISTA (2016). Las muestras se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente y al finalizar el tiempo de tinción, las semillas fueron examinadas en el estereomicroscopio. La presencia de coloración roja indica que el embrión es viable, mientras que la ausencia de dicho color demuestra que el embrión no es viable (ISTA, 2016).

En la Tabla 2 se puede apreciar la distribución de los tratamientos con las diferentes concentraciones de tetrazolio y tiempos de inmersión aplicados en las semillas de *P. incana*.

Tabla 2

Tratamientos para los ensayos de viabilidad de las semillas de Polylepis incana.

Tratamientos	Concentración de TZ [%]	Tiempo de inmersión [h]
T1	0.5	24
T2	1	24
T3	0.5	48
T4	1	48

La unidad experimental para cada tratamiento fue una caja Petri de vidrio con 15 semillas depositadas en 12mL de solución de TZ. Se realizaron 3 réplicas para cada tratamiento, es decir, se utilizaron en total 45 semillas por tratamiento. La variable que se evaluó fue el porcentaje de viabilidad mediante la ecuación (2).

$$\%Viabilidad = \frac{\text{Semillas viables}}{\text{Semillas totales}} * 100 \quad (2)$$

En donde:

Semillas viables: Número de semillas con embrión teñido de rojo de cada tratamiento

Semillas totales: Número de semillas sembradas en cada tratamiento

Ensayo de desinfección en las semillas

Las semillas de *P. incana* se desinfectaron en base al protocolo de Cárdenas y Espinoza (2014) para las especies de la familia Rosaceae. En primer lugar, las semillas se sumergieron en etanol (C₂H₅OH) al 70% durante 2 minutos. Luego, las muestras se trataron con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) más 0.1% de Tween-20 durante 7 minutos en agitación. En la Tabla 3 se muestran los tratamientos aplicados con las diferentes

concentraciones de NaClO. Posteriormente, las semillas fueron enjuagadas 3 veces o más con agua destilada estéril. A continuación, dentro de una cámara de flujo laminar, las semillas se sembraron en cajas Petri de vidrio con medio Murashige y Skoog (MS), suplementado con sacarosa al 3% y solidificado con 7.5 g/L de agar. Además, el pH del medio se ajustó a 5.8 con NaOH [1N] o HCl [1N]. Las semillas fueron incubadas durante 14 días a 26°C.

Tabla 3

Tratamientos para la desinfección de las semillas de Polylepis incana.

Tratamiento	Concentración de NaClO [%]
T1	0
T2	3
T3	5
T4	7

La unidad experimental para cada tratamiento fue una caja Petri con 15 semillas sembradas en 12mL de medio MS. Se realizaron 3 repeticiones para cada tratamiento, es decir, se usaron en total 45 semillas por tratamiento. La variable evaluada, al finalizar los 14 días de incubación, fue el porcentaje de contaminación a través de la ecuación (3).

$$\%Contaminación = \frac{\text{Semillas contaminadas}}{\text{Semillas totales}} * 100 \quad (3)$$

En donde:

Semillas contaminadas: Número de semillas con presencia de hongos o bacterias en cada tratamiento

Semillas totales: Número de semillas sembradas en cada tratamiento

Ensayo de germinación *in vitro* en las semillas

Las semillas de *P. incana* se remojaron durante 24 horas con el fin de romper el estado de latencia de las mismas. Luego, en una cámara de flujo laminar previamente esterilizada con luz UV por 15 minutos, las semillas fueron desinfectadas. A continuación, las semillas se sembraron en tubos con medio MS suplementado con sacarosa al 3% y ácido giberélico (GA₃) a concentraciones de 1 mg/L y 2 mg/L (ISTA, 2016). El medio de cultivo se solidificó con 7.5 g/L de agar y se ajustó el pH a 5.8 con NaOH [1N] o HCl [1N]. Adicionalmente, se analizó la influencia de dos temperaturas diferentes en la germinación de las semillas. La cámara de germinación fue utilizada para controlar una temperatura baja de 10°C en las muestras, mientras que el Fitotron se usó para mantener una temperatura constante de 25°C. Los tratamientos aplicados con las distintas concentraciones de GA₃ y temperaturas se pueden apreciar en la Tabla 4. Todas las muestras fueron acondicionadas a un fotoperiodo de 8h oscuridad/16h luz (Vega et al., 2018). Los resultados de este ensayo fueron observados durante 25 días.

Tabla 4

Tratamientos para la germinación in vitro de las semillas de Polylepis incana.

Tratamiento	Concentración de GA ₃ [mg/L]	Temperatura [°C]
T1	0	10
T2	1	10
T3	2	10
T4	0	25
T5	1	25
T6	2	25

La unidad experimental para cada tratamiento fue un lote de 10 tubos de ensayo de vidrio con una semilla sembrada por cada tubo con 5mL de medio de cultivo. Se realizó 3 réplicas para cada tratamiento, es decir, en total 30 semillas por tratamiento. Las variables a evaluar en función de las concentraciones de GA₃ y las diferentes temperaturas aplicadas fueron: la capacidad germinativa y el tiempo de latencia. Además, se consideró como semilla germinada a aquellas que presentaron una radícula ≥ 1 mm de longitud.

La capacidad germinativa se encuentra representada por el porcentaje de germinación y se determinó con ayuda de la siguiente ecuación (4).

$$\% \text{Germinación} = \frac{N}{A} * 100 \quad (4)$$

En donde:

N: Número final de semillas germinadas de cada tratamiento

A: Número total de semillas sembradas en cada tratamiento

Análisis Estadístico de Datos

Análisis exploratorio de datos para la caracterización morfológica

Se realizó un análisis exploratorio de datos en los parámetros morfológicos cuantitativos de las semillas de *P. incana*. El número promedio de semillas por fruto se obtuvo a partir de 5 lotes de 10 frutos. El tamaño de las semillas se determinó mediante la medición del largo y ancho de 4 lotes de 25 semillas. En cuanto al peso, este parámetro se calculó a partir de 10 lotes de 100 semillas. Por último, el contenido de humedad se determinó a partir de 4 lotes de 25 semillas. Además, se calculó el promedio y desviación estándar del tamaño, peso y contenido de humedad de las semillas mediante el software Excel versión 2019.

Diseño experimental para el ensayo de viabilidad

En el análisis para el ensayo de viabilidad se aplicó un diseño factorial 2x2, donde los factores fueron: A = concentración de tetrazolio y B = tiempo de inmersión. Cada uno de ellos

comprendió 2 niveles: $A_1 = 0.5\%$, $A_2 = 1\%$, y $B_1 = 24$ horas, $B_2 = 48$ horas. Se realizó 3 réplicas de 15 semillas cada tratamiento. La normalidad de los datos obtenidos se comprobó empleando la prueba de Shapiro-Wilks. A continuación, si los datos seguían una distribución normal, se realizó un análisis de varianza ANOVA y se compararon las medias calculadas de cada tratamiento mediante el método Duncan con un nivel de significancia ($p < 0.05$). En el caso de que los datos no seguían una distribución normal, se intentó una transformación de la respuesta experimental o la aplicación del método no paramétrico de Kruskal Wallis. Todos los análisis estadísticos se realizarán con el software InfoStat versión 2020.

Diseño experimental para el ensayo de desinfección de semillas

En el análisis para el ensayo de desinfección de semillas de *P. incana* se realizó un diseño experimental completamente al azar, donde el factor fue: C = concentración de NaClO, el cual contenía 4 niveles: $C_1 = 0\%$, $C_2 = 3\%$, $C_3 = 5\%$ y $C_4 = 7\%$. Se realizó 3 réplicas de 15 semillas para cada tratamiento. Los supuestos de normalidad de los valores obtenidos se verificaron con la prueba de Shapiro-Wilks. Luego, se aplicó un análisis de varianza ANOVA para los tratamientos con valores paramétricos y con el fin de comparar las medias se utilizó el método Duncan con un nivel de significancia ($p < 0.05$). Sin embargo, cuando los supuestos de normalidad no se cumplieron, se aplicó el método de Kruskal Wallis para los valores no paramétricos. Los datos obtenidos fueron procesados con ayuda del software InfoStat versión 2020.

Diseño experimental para el ensayo de germinación in vitro de semillas

En el análisis para el ensayo de germinación *in vitro* de semillas de *P. incana* se aplicó un diseño factorial 3x2, con los factores D: concentración de GA_3 y E: temperatura. Donde el factor D contenía 3 niveles: $D_1 = 0$, $D_2 = 1.8$ g/L y $D_3 = 3.6$ g/L, y el factor E denotado por 2 niveles: $E_1 = 4^\circ\text{C}$ y $E_2 = 25^\circ\text{C}$. Se llevó a cabo 3 repeticiones de 10 semillas por cada tratamiento. Con el objetivo de corroborar la normalidad de los datos obtenidos se llevó a cabo

el test de Shapiro-Wilks. Posteriormente, se aplicó un análisis de varianza ANOVA para los datos que siguieron una distribución normal y se realizó una prueba de diferencia entre medias con el método de Duncan con un nivel de significancia ($p < 0.05$). Para los datos que no seguían una distribución normal se aplicó el método no paramétrico Kruskal Wallis. Los análisis estadísticos de los datos obtenidos se realizaron mediante el software InfoStat versión 2020.

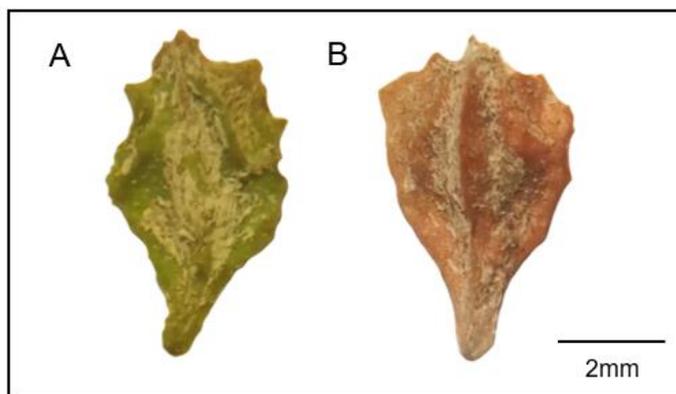
Capítulo IV: Resultados

Material vegetal colectado

En la Figura 1 se pueden apreciar los frutos de *Polylepis incana* que fueron recolectados en la Reserva Ecológica Antisana con coordenadas 17M 801291 9945229 a 3808.2 m.s.n.m. y en el Área de Conservación Hídrica Palugullo con coordenadas 17M 808137 9966085 a 3730.2 m.s.n.m.

Figura 1

Frutos recolectados de *Polylepis incana*.



Nota: Frutos de *P. incana*: A) Fruto inmaduro, B) Fruto maduro

La información sobre el hábitat, la morfología y la distribución geográfica de la especie se registró en una ficha técnica (Figura 2). Estos datos ayudarán a establecer una línea base de conocimiento sobre la especie *Polylepis incana* Kunth para el banco de semillas HANS-BANK.

Figura 2

Ficha técnica de *Polylepis incana*.

FICHA TÉCNICA DE LA ESPECIE	
FOTOGRAFÍA	DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ESPECIE
 <p>Foto: Ayo, G.</p>	<p>Nombre científico: <i>Polylepis incana</i> Kunth Familia: Rosaceae Rango altitudinal: 2150 – 4800 m.s.n.m. Forma de vida: Árbol</p>
	<p>MORFOLOGÍA DE LA ESPECIE</p> <p>Flor: Inflorescencias colgantes con flores vellosas Hojas: Imparinnadas con folíolos de contorno elíptico, ápice obtuso y envés con tricomas Tallo: Leñoso con multicapas Fruto: Turbinados con crestas aplanadas</p>
DATOS ADICIONALES	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<p>Lista Mundial de Árboles Amenazados: Peligro Crítico (CR)</p> <p>Usos: Reforestación, material de construcción, leña.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Carchi - Imbabura - Pichincha - Cotopaxi - Tungurahua - Chimborazo - Bolívar - Azuay - Loja 
<p>Fuente: Boza, T. E., & Kessler, M. (2022). A monography of the genus <i>Polylepis</i> (Rosaceae). <i>PhytoKeys</i> 203: 1-274, 203, 1-274. https://doi.org/10.3897/PHYTOKEYS.203.83529 Romoleroux, K. (2018). <i>Bosques de polylepis en Ecuador</i>. https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/home</p>	

Caracterización morfológica de las semillas de *P. incana*

La caracterización morfológica fue realizada tanto a nivel cualitativo como cuantitativo en las semillas de *Polylepis incana*. La forma, el color, el tipo de testa y el tipo de embrión se

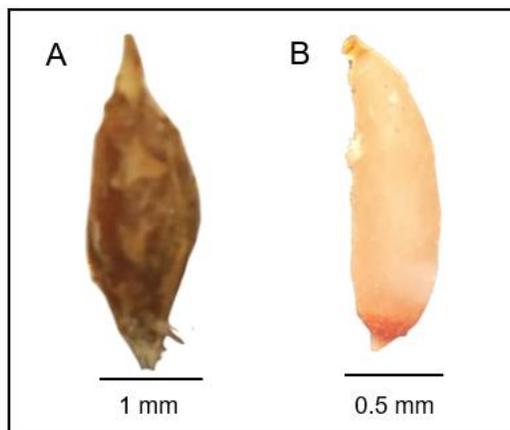
identificaron como parámetros morfológicos cualitativos en las semillas. Mientras que el número de semillas por fruto, el tamaño, el peso promedio y el contenido de humedad fueron determinados como los parámetros morfológicos cuantitativos.

Parámetros cualitativos

Los rasgos morfológicos de la semilla de *Polylepis incana* se pueden observar en la Figura 3. La forma de la semilla de *P. incana* se identificó como ovada-turbinada y presentó una coloración café claro, dichos rasgos morfológicos se pueden observar en la Figura 3A. En cuanto a la testa de la semilla, esta fue de tipo dura, la cual regula el ingreso de agua al embrión y posiblemente la germinación. El tipo de embrión de la semilla fue de tipo axial espatulado (Figura 3 B), es decir, el embrión ocupaba la mayor parte de la semilla y el endospermo se encuentra reducido. Todos estos rasgos morfológicos ayudan con el establecimiento de directrices para la conservación *ex situ* de la especie.

Figura 3

Rasgos morfológicos cualitativos de la semilla Polylepis incana.



Nota: Semilla de *P. incana*: A) Semilla de color café claro con forma ovada-turbinada, B) Tipo de embrión axial espatulado.

Parámetros cuantitativos

Las características morfológicas cuantitativas analizadas fueron el número de semillas por fruto, el tamaño, el peso y el contenido de humedad. En la Tabla 5 se muestra un resumen de los parámetros cuantitativos observados en las semillas.

Tabla 5

Resultados de los parámetros morfológicos cuantitativos de las semillas de Polylepis incana.

Parámetros cuantitativos	Promedio y desviación estándar
Número de semillas por fruto	1.00±0.00
Largo (mm)	2.33±0.05
Ancho (mm)	1.10±0.01
Peso (g)	0.28±0.03
Contenido de humedad (%)	7.39±2.32

El número promedio de semillas por fruto de *Polylepis incana* fue de 1.00±0.00. El largo de cada semilla fue de 2.33±0.05mm y el ancho fue de 1.10±0.01mm. El peso promedio de 100 semillas fue de 0.28±0.03 g. En cuanto al contenido de humedad de las semillas se registró un 7.39±2.32%. Estos tres últimos parámetros de las semillas son rasgos relacionados con la tolerancia a la deshidratación, lo que permite determinar si las semillas son ortodoxas o recalcitrantes. En el caso de *P. incana*, las semillas probablemente son ortodoxas pues su contenido de humedad se encuentra entre 5 y 8%.

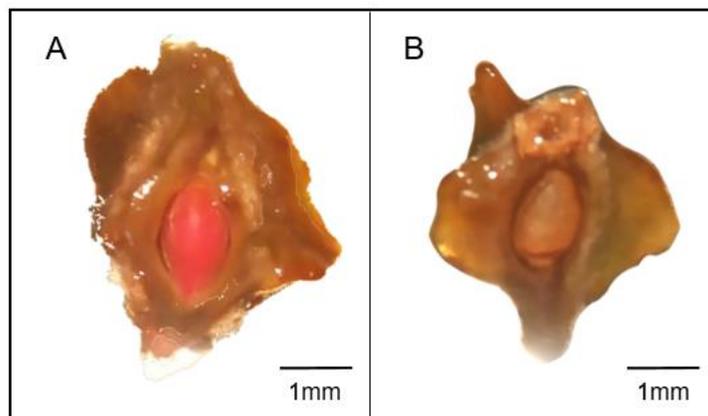
Viabilidad de las semillas de *P. incana*

El test de tetrazolio permitió diferenciar las semillas viables de *P. incana* de las no viables en cada uno de los tratamientos analizados (Figura 4). Se consideró como semillas

viabiles a aquellas donde el embrión presentó una coloración roja intensa (Figura 4 A). Mientras que se determinó como semillas no viabiles a aquellas donde los embriones se mantuvieron incoloros (Figura 4 B). Las semillas sin embriones fueron tomadas en cuenta como no viabiles.

Figura 4

Tinción de los embriones de las semillas de Polylepis incana.



Nota: Semillas de *Polylepis incana*: A) Embrión de la semilla completamente teñido con tetrazolio (viable), B) Embrión de la semilla sin tinción (no viable).

En cuanto al análisis estadístico de la viabilidad de las semillas de *P. incana*, la prueba de Shapiro-Wilks demostró que los datos siguen una distribución normal ya que $p > 0.05$ (Tabla 6).

Tabla 6

Resultados de la prueba de Shapiro-Wilks realizada a los tratamientos de viabilidad.

Variable	N	Media	D.E.	W*	p – valor
%SV	12	15.00	7.04	0.92	0.4565

Nota: %SV = %Semillas viabiles, n = Tamaño muestral, D.E. = Desviación estándar, W* = Estadístico de la prueba de Shapiro-Wilks.

Posteriormente, se aplicó el análisis de varianza ANOVA, donde el p - valor 0.7597 fue mayor al estadístico de prueba ($\alpha = 0.05$), indicando que no existen diferencias significativas entre los 4 tratamientos aplicados. Esto también se demuestra al momento de comparar las medias calculadas de cada tratamiento con ayuda del método Duncan, donde tampoco hubo diferencias significativas (Tabla 7).

Tabla 7

Resultados del método de Duncan aplicado a los tratamientos de viabilidad.

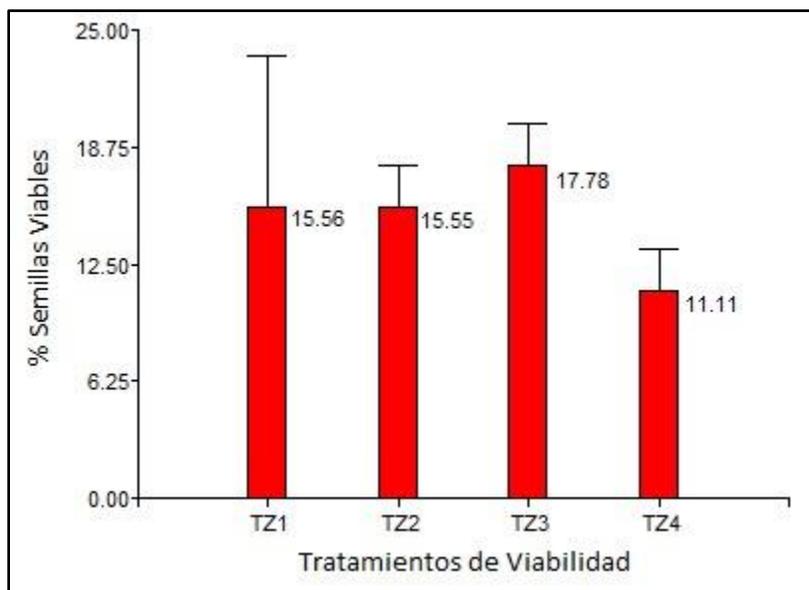
TR	Medias	N	E.E.	
TZ4	11.11	3	4.44	A
TZ2	15.55	3	4.44	A
TZ1	15.56	3	4.44	A
TZ3	17.78	3	4.44	A

Nota: Tratamientos: TZ1 = TZ al 0.5% y 24 h de inmersión, TZ2 = TZ al 1% y 24 h de inmersión, TZ3 = TZ al 0.5% y 48 h de inmersión, TZ4 = TZ al 1% y 48 h de inmersión, n = Tamaño muestral, E.E. = Error estándar de la estimación.

Por lo tanto, con el fin de seleccionar el mejor tratamiento de viabilidad, se realizó un gráfico de barras con las medias de los porcentajes de semillas viables de cada tratamiento (Figura 5). El tratamiento con TZ al 0.5% y 48 h de inmersión mostró el mayor porcentaje de viabilidad en las semillas (17.78%), siendo el mejor tratamiento de todos. Por otro lado, el porcentaje de semillas viables más bajo fue en el tratamiento con TZ al 1% y 48 h de inmersión (11.11%). Los porcentajes de viabilidad de 15.56% y 15.55%, fueron muy similares en los tratamientos donde se aplicó un tiempo de inmersión de 24 h.

Figura 5

Porcentaje de semillas viables de *Polylepis incana* en cada tratamiento aplicado.



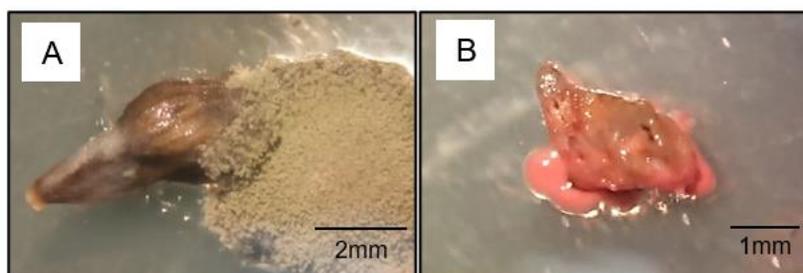
Nota: Tratamientos de viabilidad aplicados en las semillas de *P. incana*: TZ1 = TZ al 0.5% y 24 h de inmersión, TZ2 = TZ al 1% y 24 h de inmersión, TZ3 = TZ al 0.5% y 48 h de inmersión, TZ4 = TZ al 1% y 48 h de inmersión.

Desinfección de semillas de *P. incana*

Una vez aplicados los protocolos de desinfección, se procedió a evaluar la presencia de hongos o bacterias en las semillas de *P. incana*. En la Figura 6 se puede apreciar semillas contaminadas con hongos (Figura 6A) y bacterias (Figura 6B).

Figura 6

Semillas de *Polylepis incana* contaminadas con agentes infecciosos.



Nota: Semillas de *Polylepis incana*: A) Semilla contaminada con hongo, B) Semilla contaminada con bacteria.

La eficacia de los protocolos de desinfección se determinó en base al porcentaje de semillas no contaminadas de *P. incana*. De acuerdo con los análisis estadísticos realizados, la prueba de Shapiro-Wilks indicó que los resultados obtenidos no cumplen los supuestos de normalidad pues $p < 0.05$ (Tabla 8).

Tabla 8

Resultados de la prueba de Shapiro-Wilks aplicada a los tratamientos de desinfección.

Variable	N	Media	D.E.	W*	p – valor
%SNC	12	83.89	18.52	0.73	0.0008

Nota: %SNC = %Semillas no contaminadas, n = Tamaño muestral, D.E. = Desviación estándar, W* = Estadístico de la prueba de Shapiro-Wilks.

A partir de estos resultados, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, donde el valor $-p$ 0.0482 fue menor al estadístico de prueba ($\alpha = 0.05$). Por lo tanto, existen diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección aplicados. En la Tabla 9 se resumen los valores obtenidos en esta prueba estadística.

Tabla 9

Resultados de la prueba no paramétrica Kruskal Wallis realizada a los tratamientos de desinfección.

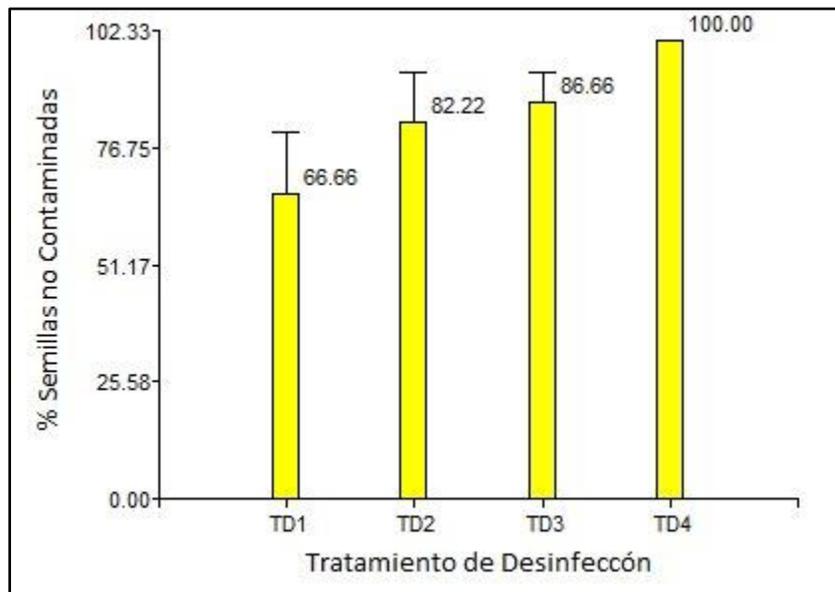
Variable	TR	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p – valor
%SNC	TD1	3	66.66	23.09	53.33	7.21	0.0482
%SNC	TD2	3	82.22	19.24	93.33		
%SNC	TD3	3	86.66	11.55	93.33		
%SNC	TD4	3	100.00	0.00	100.00		

Nota: %SNC = %Semillas no contaminadas, Tratamientos: TD1 = 0% de NaClO, TD2 = 3% de NaClO, TD3 = 5% de NaClO, TD4 = 7% de NaClO, N = Tamaño muestral, D.E. = Desviación estándar, H = Estadístico de la prueba Kruskal Wallis.

Con el propósito de identificar el protocolo con mejor desinfección, se realizó un gráfico de barras con los porcentajes de semillas no contaminadas de cada tratamiento (Figura 7). El porcentaje más alto de semillas sin contaminación fue de 100% en el tratamiento TD4, es decir, el protocolo con NaClO al 7% fue el más eficaz para la desinfección de semillas de *P. incana*. Por otra parte, el tratamiento que presentó menor eficacia en la desinfección de estas semillas fue TD1, ya que el porcentaje de semillas no contaminadas fue de 66.66%. En las semillas no se evidenció oxidación ni necrosis una vez aplicado los tratamientos.

Figura 7

Porcentajes de semillas no contaminadas de *Polylepis incana* en cada tratamiento de desinfección aplicado.



Nota: Tratamientos de desinfección aplicados en las semillas de *P. incana*: TD1 = 0% de NaClO, TD2 = 3% de NaClO, TD3 = 5% de NaClO, TD4 = 7% de NaClO.

Germinación de semillas de *P. incana*

En los tratamientos de germinación *in vitro*, las condiciones fueron establecidas en función de diferentes temperaturas y distintas concentraciones de ácido giberélico.

Adicionalmente, en las semillas de *P. incana* se evaluó la capacidad germinativa y el índice de latencia.

Capacidad germinativa

La capacidad germinativa fue determinada con respecto al número de semillas que desarrollaron una radícula > 1mm de longitud. En la Figura 8 se puede apreciar la radícula y las hojas primarias expuestas de *P. incana* después de 25 días de germinación.

Figura 8

Semilla germinada de *Polylepis incana*.



Nota: Semilla de *P. incana* con radícula y hojas primarias expuestas.

Los porcentajes de germinación obtenidos en los tratamientos germinativos *in vitro* aplicados a las semillas, fueron analizados a través de pruebas estadísticas. El test de Shapiro-Wilks permitió corroborar que los datos no siguieron una distribución normal, ya que $p < 0.05$ (Tabla 10).

Tabla 10

Resultados de la prueba de Shapiro-Wilks aplicada a los tratamientos de germinación in vitro.

Variable	N	Media	D.E.	W*	p – valor
%SNC	18	16.11	10.37	0.85	0.0110

Nota: %SG = %Semillas germinadas, n = Tamaño muestral, D.E. = Desviación estándar, W* = Estadístico de la prueba de Shapiro-Wilks.

Por ende, en relación a estos resultados, se llevó a cabo el método no paramétrico Kruskal Wallis, donde el p – valor fue 0.0336. Dicho valor fue menor al estadístico de prueba ($\alpha = 0.05$), demostrando que los tratamientos de germinación *in vitro* eran significativamente diferentes entre ellos. En la Tabla 11 se resumen los resultados obtenidos en esta prueba estadística.

Tabla 11

Resultados del método no paramétrico Kruskal Wallis realizado a los tratamientos de germinación *in vitro*.

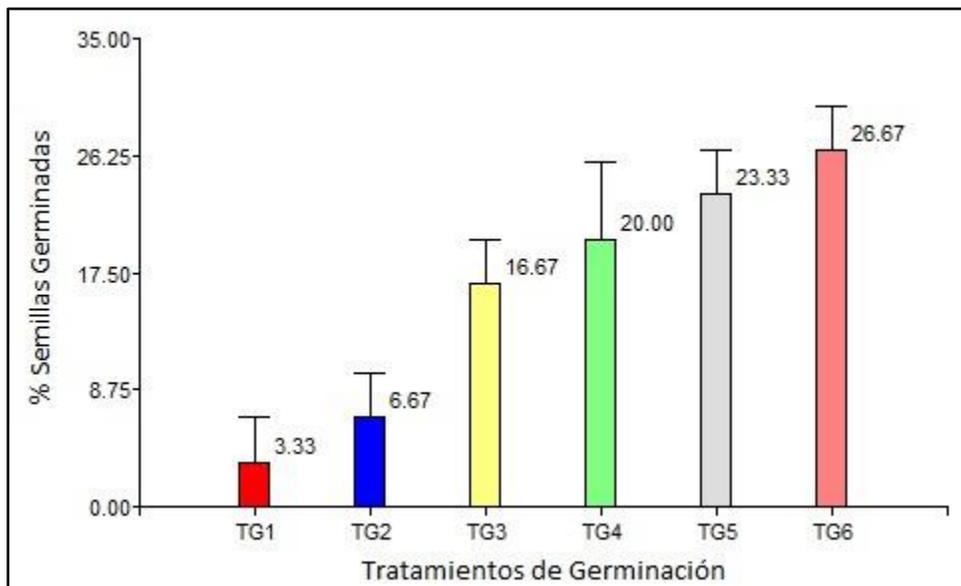
Variable	TR	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p – valor
%SG	TG1	3	3.33	5.77	0.00	11.23	0.0336
%SG	TG2	3	6.67	5.77	10.00		
%SG	TG3	3	16.67	5.77	20.00		
%SG	TG4	3	20.00	10.00	20.00		
%SG	TG5	3	23.33	5.77	20.00		
%SG	TG6	3	26.67	5.77	30.00		

Nota: %SG = %Semillas germinadas, Tratamientos: TG1 = 0 mg/L de GA₃ a 10°C, TG2 = 1 mg/L de GA₃ a 10°C, TG3 = 2 mg/L de GA₃ a 10°C, TG4 = 0 mg/L de GA₃ a 25°C, TG5 = 1 mg/L de GA₃ a 25°C, TG6 = 2 mg/L de GA₃ a 25°C, N = Tamaño muestral, D.E. = Desviación estándar, H = Estadístico de la prueba Kruskal Wallis.

Con el propósito de seleccionar el mejor tratamiento germinativo *in vitro* para las semillas, se recurrió a un gráfico de barras con las medias de los porcentajes de semillas germinadas de cada tratamiento (Figura 9).

Figura 9

Porcentajes de semillas germinadas de *Polylepis incana* en cada tratamiento de germinación *in vitro* aplicado.



Nota: Tratamientos de germinación *in vitro* aplicados a las semillas de *P. incana*: TG1 = 0 mg/L de GA₃ a 10°C, TG2 = 1 mg/L de GA₃ a 10°C, TG3 = 2 mg/L de GA₃ a 10°C, TG4 = 0 mg/L de GA₃ a 25°C, TG5 = 1 mg/L de GA₃ a 25°C, TG6 = 2 mg/L de GA₃ a 25°C

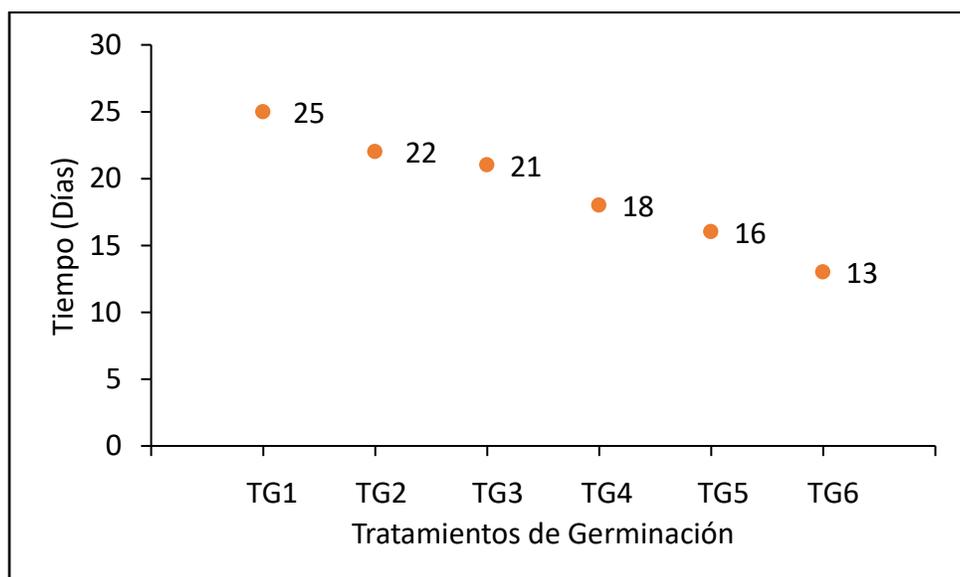
El tratamiento con mayor porcentaje de germinación (26.67%) fue TG6, por lo tanto, el tratamiento con las condiciones más óptimas para aumentar la capacidad germinativa fue aquel donde se mantuvo una temperatura constante 25°C y el medio MS fue suplementado con 2 mg/L de GA₃. Mientras que el tratamiento con las condiciones menos favorables para la germinación *in vitro* de las semillas fue TG1 (medio MS sin GA₃ y temperatura 10°C), pues presentó un porcentaje de germinación bajo de 3.33%. Además, cabe destacar que los tratamientos TG4, TG5 y TG6 que mantenían una temperatura de 25°C, tuvieron porcentajes de semillas germinadas superiores a los tratamientos TG1, TG2 y TG3 donde se condicionó una temperatura baja de 10°C.

Índice de latencia

El índice de latencia fue determinado a partir de los días que tardaron las semillas de *P. incana* en romper su dormancia. En la Figura 10 se puede observar el día en que se rompió el estado de latencia y se inició la germinación de las semillas.

Figura 10

Índice de latencia en las semillas de *Polylepis incana*.



Nota: Tratamientos de germinación *in vitro* aplicados a las semillas de *P. incana*: TG1 = 0 mg/L de GA₃ a 10°C, TG2 = 1 mg/L de GA₃ a 10°C, TG3 = 2 mg/L de GA₃ a 10°C, TG4 = 0 mg/L de GA₃ a 25°C, TG5 = 1 mg/L de GA₃ a 25°C, TG6 = 2 mg/L de GA₃ a 25°C

El tratamiento TG6 (medio MS suplementado con 2 mg/L de GA₃ a 25°C) interrumpió el estado de latencia de las semillas a los 13 días. Mientras que el resto de tratamientos tardaron más de 15 días. Por lo tanto, este tratamiento fue el más óptimo de todos, pues rompió la dormancia de las semillas en menor tiempo.

Capítulo V: Discusión

Los bosques andinos del Ecuador albergan gran parte de la diversidad y el endemismo del mundo. Tanto la flora como la fauna se han adaptado a las condiciones severas de estos ecosistemas montañosos como las bajas temperaturas, los altos rangos de humedad y la intensa radiación ultravioleta (Bussmann, 2005). Adicionalmente, estos bosques son de vital importancia para el ciclo hidrológico de sus alrededores, pues a través de sus árboles llevan a cabo la acumulación, la regulación, el mantenimiento y el suministro de agua a las poblaciones locales (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019; Romoleroux et al., 2016).

Los bosques andinos también brindan otros servicios ecológicos como el control de la erosión del suelo y la mitigación de los gases de efecto invernadero (Chuncho Morocho & Chuncho, 2019). Sin embargo, estos ecosistemas se encuentran vulnerables frente a las diferentes actividades antropogénicas (Cortés et al., 2020). Por esta razón, se han establecido programas de restauración y conservación de estos bosques, con el fin de preservar su diversidad biológica (Gómez-Ruiz et al., 2013).

La vegetación de los bosques andinos del Ecuador se encuentra conformada por especies leñosas y arbustivas. Entre las especies leñosas tenemos las especies del género *Polylepis*. Los bosques de *Polylepis* predominan en estos tipos de ecosistemas, donde la importancia de los mismos radica en la regulación de las fuentes hídricas, la formación de suelos fértiles, la captura de CO₂ y la mejora de la calidad del agua (Cuyckens & Renison, 2018). Además, dentro de las especies de *Polylepis*, encontramos *Polylepis incana* Kunth, siendo una de las más utilizadas para la reforestación de los bosques andinos en nuestro país (Boza & Kessler, 2022). No obstante, la falta de estrategias de restauración ecológica de este árbol, motiva el desarrollo de bancos de germoplasma destinados a la conservación de la diversidad genética de esta especie silvestre.

Existen varios parámetros que se deben determinar con el objetivo de garantizar la conservación de semillas en los bancos de germoplasma (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010). La morfología, la tolerancia a la desecación, la viabilidad y el poder germinativo de las semillas, son parte de la información necesaria para establecer las condiciones su almacenamiento a mediano y largo plazo (Viana et al., 2011). De esta forma, el presente trabajo busca caracterizar la morfología, estandarizar protocolos de viabilidad y de germinación *in vitro* en semillas de *P. incana*, con el fin de conservar su diversidad genética en el banco de semillas HANS-BANK.

Características morfológicas de las semillas de *P. incana*

Las semillas de árboles nativos son el material básico para llevar a cabo los programas de recuperación y conservación *ex situ* de los bosques andinos. En primer lugar, para la selección de las especies a preservar en los bancos de germoplasma, se debe analizar el sitio de recolección de las semillas y determinar la morfología del fruto (Viana et al., 2011).

De acuerdo con Romero-Saritamá y Pérez (2016), la recolección de muestras de árboles forestales conlleva mayor esfuerzo, tiempo y costo en comparación con las especies arbustivas o agrícolas. Esto se debe a que los frutos de las especies leñosas se encuentran generalmente localizados en las copas de los árboles, ya que debido a su gran altura suele ser necesario el uso de equipos de colección. Sin embargo, Boza y Kessler (2022) consideran que, a rangos de altitud elevados, la altura de los árboles de *Polylepis* se ve reducida por las bajas temperaturas y precipitaciones. Las muestras recolectadas para esta investigación se realizaron a una altitud de 3730.2 m.s.n.m en la Reserva Ecológica Antisana y a 3808.2 m.s.n.m. en el Área de Conservación Hídrica de Paluguillo, por lo que los árboles muestreados poseían una altura baja y los frutos estaban al alcance de la mano.

Además, se encontró que la morfología de los frutos de *P. incana* recolectados coincidía con las descripciones realizadas por Boza y Kessler (2022). Estos investigadores consideran

que los frutos de *Polylepis* se encuentran mal adaptados para la dispersión a largas distancias, ya que muchas de las especies de este género tienen frutos con alas delgadas supuestamente adaptadas a la dispersión del viento. Sin embargo, las distancias de vuelo que alcanzan solo llegan a decenas de metros. Otras especies, como *P. incana*, poseen frutos con crestas aplanadas que no parecen tener utilidad para ningún tipo de dispersión específica.

La caracterización morfológica de las semillas también es de suma importancia para la elección de las plantas a preservar en los bancos de germoplasma, ya que los rasgos morfológicos afectan los métodos de colección y conservación de las semillas (Romero-Saritama & Pérez, 2016; Viana et al., 2011). Los rasgos morfológicos a nivel cualitativo de las semillas como la forma, el color, el tipo de testa y de embrión, se pueden utilizar con el fin de mejorar los procesos de conservación *ex situ*. En las semillas de *P. incana* la forma fue ovada-turbinada con una coloración café claro, estos resultados son similares a los del estudio de Vega y sus colaboradores (2018) donde se identificó la misma forma y color en las semillas de *Polylepis incarum* (Bitter) M. Kessler & Schmidt-Leb.

Las semillas de *P. incana* presentaron una testa dura. De acuerdo con Romero-Saritama y Pérez (2016), las semillas con este tipo de testa requieren de un secado lento en largos periodos de tiempo, con el fin de llegar a acondicionarlas fisiológicamente para su almacenamiento en cámaras frías. Adicionalmente, la dureza de la cubierta seminal limita físicamente la germinación, puesto que afecta el intercambio gaseoso de las semillas y regula la entrada de agua al embrión. Por esta razón, la textura dura de la testa causa bajos porcentajes de germinación, lo cual también se ha observado en otras especies de *Polylepis* como *Polylepis neglecta* M. Kessler y *Polylepis pacensis* M. Kessler & Schmidt-Leb (Vega et al., 2018).

El tipo de embrión es un rasgo morfológico que se encuentra relacionado con la latencia y el comportamiento germinativo de las semillas. En las semillas de *P. incana* se identificó un

embrión de tipo axial espatulado casi sin endospermo. Este hallazgo concuerda con los datos presentados por Martin (1946) sobre el tipo de embrión de las especies de la familia Rosaceae. Sin embargo, aunque los embriones de *P. incana* logran desarrollarse completamente, también poseen una latencia fisiológica que solamente se puede romper al aplicar tratamientos post almacenamiento en las semillas (Romero-Saritama & Pérez, 2016).

En cuanto a los parámetros morfológicos a nivel cuantitativo, estos son esenciales para establecer las condiciones de almacenamiento de las semillas. El número de semillas por fruto es un rasgo importante para establecer las estrategias reproductivas de las plantas y mejorar los planes de recolección de semillas que serán utilizadas en programas de conservación *ex situ* (Romero-Saritama & Granda, 2020). Las especies del género *Polylepis* producen frutos secos monospermos e indehiscentes (Boza & Kessler, 2022). El número de semillas por fruto en *P. incana* fue de 1. Vega y otros investigadores (2019) encontraron resultados similares en *P. incarum*, siendo esta especie parte del mismo grupo evolutivo *Incanaeae*, al igual que *P. incana*. Las especies leñosas que presentan una semilla por fruto, tienden a generar gran cantidad de frutos ya que sus semillas poseen bajas posibilidades de sobrevivir y germinar debido a la falta de recursos nutricionales dentro de las mismas. De igual manera, cuando este tipo de especies producen más frutos, es más probable que los mismos sean interceptados por agentes dispersores y lleguen a lugares con mejores condiciones ambientales para establecerse. Adicionalmente, el tiempo y esfuerzo invertido en la colecta de frutos que contienen una sola semilla siempre será mayor con respecto a las especies que poseen frutos con gran cantidad de semillas (Romero-Saritama & Granda, 2020)

Los parámetros de tamaño, peso y contenido de humedad son rasgos relacionados con la tolerancia a la deshidratación y la germinación. Estos rasgos pueden indicar si la semilla es ortodoxa o recalcitrante. En cuanto al tamaño de las semillas de *P. incana*, este fue de 2.33 ± 0.05 mm de largo y 1.10 ± 0.01 mm de ancho. Dichas dimensiones se acercaron a las ya

registradas por Vega y sus colaboradores (2018) en otras especies de *Polylepis*, donde el tamaño de las semillas no superaba los 4mm de longitud por 2mm de ancho. Romero-Saritama y Pérez (2016) también señalan que las semillas de especies forestales con un tamaño promedio menor a 10 mm de largo x 6 mm de ancho son consideradas ortodoxas. Por lo tanto, las semillas de *P. incana*, en base a su tamaño, toleran los procesos de desecación

Por otro lado, un alto contenido de humedad se encuentra directamente relacionado con el peso, por lo que semillas con un peso menor a 3 gramos son más propensas a tener un comportamiento ortodoxo (Romero-Saritama & Pérez, 2016). Las semillas forestales con un contenido de humedad entre 5 y 8%, pueden tolerar la desecación y resistir temperaturas bajo cero de almacenamiento (Serrada, 2000). Las semillas de *P. incana* poseyeron un peso de 0.28 ± 0.03 g y un contenido de humedad de $7.39 \pm 2.32\%$. Por lo tanto, en base al peso y el porcentaje de humedad, también se logró ratificar que las semillas son ortodoxas, sobreviven los procesos de desecación y podrían almacenarse por largos periodos de tiempo sin perder su poder germinativo. Estos resultados fueron similares a los contenidos de humedad de *P. incarum* (10%), *P. pacensis* (8%) y *P. negligencia* (6%) descritos por Vega et al. (2019).

Por último, tanto el tamaño como el peso de las semillas de *Polylepis* tienen una correlación positiva con la germinación. De acuerdo con Domic y sus colaboradores (2020), las semillas de *Polylepis tomentella* Wedd más pesadas y grandes logran un mayor porcentaje de germinación, pues es más probable que contengan un embrión viable. Además, las plántulas que se generaron a partir de estas semillas, exhibieron altas tasas de crecimiento y altos porcentajes de supervivencia. De modo que, las semillas de *P. incana* utilizadas en nuestro trabajo se pueden considerar como pesadas y grandes, pues presentaron porcentajes de germinación superiores a los reportados por Wesche y sus colaboradores (2008), siendo de 2% en los ensayos mencionados.

Viabilidad y germinación de las semillas de *P. incana*

La prueba colorimétrica de tetrazolio sirve para identificar las semillas viables y el potencial de su capacidad para germinar. Los tejidos vivos de los embriones suelen teñirse de color rojo intenso, mientras los tejidos muertos permanecen incoloros (ISTA, 2016). En el presente estudio el porcentaje más alto de semillas viables (17.78%) se obtuvo con TZ al 0.5% con 48 horas de inmersión. Asimismo, Vega y sus colaboradores (2019) probaron un tratamiento con 0.5% de TZ en semillas de *Polylepis*, resultando en porcentajes de viabilidad de 15% y 24% para *P. incarum* y *P. pacensis*, respectivamente. A partir de esto, se puede inferir que los porcentajes de semillas no viables fueron superiores a los porcentajes viables, lo cual también es coincidente con nuestros resultados.

De acuerdo con Pretell (1985), gran parte de las semillas recolectadas de árboles de *P. incana* suelen estar vacías. La ausencia de embriones o embriones no completamente formados parece ser una característica de las especies de *Polylepis*, la cual es causada por la dicogamia y la polinización anemófila de estos árboles (Seltmann et al., 2007). Tanto los altos porcentajes de semillas no viables como de semillas vacías, ocasionan porcentajes de germinación bajos y problemas al momento de realizar planes de reforestación (Vega et al., 2019).

La técnica de cultivo *in vitro* es una herramienta que permite incrementar el porcentaje de germinación a través de la siembra de la semilla en un medio nutritivo estéril bajo condiciones controladas. La germinación *in vitro* también presenta otras ventajas como la reducción del tiempo de germinación, la solución de casos de inhibición de germinación y la generación rápida de plántulas que servirían para la restauración de ecosistemas (Zurita-Valencia et al., 2014).

La presencia de microorganismo como hongos y bacterias, afectan la viabilidad y la germinación *in vitro* de las semillas. Por lo tanto, se deben establecer protocolos para eliminar

los agentes infecciosos de las semillas sin dañarlas (García et al., 2015). Actualmente no existen estudios donde se hayan establecido protocolos de desinfección para semillas de *Polylepis*. Así pues, el protocolo aplicado en nuestro estudio se basó en tratamientos de desinfección realizados en semillas de la familia Rosaceae, ya que *P. incana* pertenece a esta familia. El protocolo de desinfección con mejores resultados en nuestro estudio fue aquel donde se usó etanol al 70% e hipoclorito de sodio (NaClO) al 7%. Cárdenas y Espinoza (2014) confirman que el alcohol etílico es un efectivo desinfectante para las semillas de la familia Rosaceae, puesto que disuelve las capas lipídicas y desnaturaliza las proteínas de las bacterias patógenas (Álvarez et al., 2008).

Por otra parte, Flores y otros investigadores (2008) mencionan que el hipoclorito de sodio en los procesos de desinfección aplicados a semillas forestales elimina los microorganismos resistentes, debido a que la combinación del cloro con las proteínas de las membranas celulares y de las enzimas, resulta letal tanto para bacterias como para hongos. Santillán (2022) utilizó NaClO al 2% para desinfectar semillas de la familia Rosaceae y obtuvo porcentajes de contaminación entre 0 y 6%. Sin embargo, el protocolo de desinfección para semillas de *P. incana* en este trabajo logró 0% de contaminación cuando se aplicó una concentración de 7% de NaClO.

En cuanto al ensayo de germinación *in vitro*, el porcentaje más alto de semillas germinadas de *P. incana* (26.67%) fue observado en el tratamiento donde el medio MS fue suplementado con 2mg/L de ácido giberélico (GA₃) y se mantuvo una temperatura de 25°C. Canales y Huarasa en 2020 registraron un porcentaje de germinación de 9%, aunque en su ensayo las semillas fueron sembradas en un sustrato conformado de tierra, arena y estiércol de ovino. La capacidad germinativa en nuestro estudio fue superior debido a que la siembra se realizó en un medio nutritivo estéril suplementado con GA₃, puesto que las giberelinas son fitohormonas que inducen la germinación de las semillas en diversas especies de plantas

(Amador-Alfárez et al., 2013). Además, a medida que se aumenta la concentración de GA₃, el porcentaje de germinación de las semillas también se incrementa (Chen et al., 2007). Esto se verifica en nuestros resultados, pues los tratamientos con GA₃ tuvieron mayor porcentaje de semillas que aquellos donde no se adicionó este fitorregulador.

De manera general, *P. incana* germina en un periodo de 15 a 49 días (Centro Ecuatoriano de Servicios Agrícolas, 1991). En los resultados de nuestro estudio, la latencia de las semillas de *P. incana* se interrumpió a los 13 días en el tratamiento más óptimo que contenía 2 mg/L de GA₃. Según Amador-Alfárez y sus colaboradores (2013), el ácido giberélico también cumple otra función, la cual es romper el estado de latencia y permitir el crecimiento del embrión de las semillas. Por lo tanto, el GA₃ incrementó la capacidad germinativa y disminuyó el tiempo de dormancia de las semillas de *P. incana*.

Las bajas temperaturas tienen un efecto negativo en los porcentajes de germinación de especies leñosas (Pais et al., 2012). De acuerdo con Boza y Kessler (2002), la capacidad germinativa de las semillas de *Polylepis* se ve reducida a medida que la temperatura disminuye en elevaciones altas, lo cual también concuerda con los estudios realizados en *Polylepis australis* Bitten (Pais et al., 2012). De igual manera, esto se verifica en nuestro trabajo, pues los porcentajes de semillas germinadas más bajos fueron obtenidos en los tratamientos donde se acondicionó una temperatura de 10°C. Caso contrario, una temperatura entre 20 y 30°C estimula la actividad enzimática de los tejidos de las semillas que incrementa la capacidad germinativa (Caroca et al., 2016; Chen et al., 2007), lo cual se evidencia en los valores obtenidos en nuestro estudio, ya que los porcentajes de germinación resultaron mayores en los tratamientos donde se mantuvo una temperatura constante de 25°C.

En resumen, los bosques andinos contienen una gran variedad de árboles y arbustos que no han sido estudiados a profundidad por los investigadores. El presente trabajo mostró la utilidad de la biotecnología en el análisis de especies de interés, como *Polylepis incana*, para

programas de reforestación y conservación de los ecosistemas montañosos. La caracterización morfológica, la viabilidad y la capacidad germinativa de las semillas presentadas sobre *P. incana*, sugieren que son aptas para la conservación en bancos de germoplasma que ayudarán a preservar la diversidad genética de los bosques andinos del Ecuador.

Capítulo VI: Conclusiones

El presente trabajo tuvo como propósito caracterizar los parámetros morfológicos y germinativos de las semillas de *Polylepis incana* Kunth en bosques andinos del Ecuador. En relación a esto, se llevaron a cabo ensayos de caracterización morfológica, viabilidad y germinación *in vitro* en semillas de la especie mencionada, llegando a concluir que:

- La recolección aleatoria de material vegetal de *P. incana* en diferentes parches de bosques andinos ecuatorianos facilitó la elaboración de una ficha técnica de la especie con información útil para la base de datos del banco de semillas HANS-BANK.
- Las semillas de *P. incana* fueron ovadas-turbinadas de color café claro, presentaron una testa dura y un embrión axial espatulado casi sin endospermo. Estos datos sugieren que las semillas poseen una latencia fisiológica.
- Las semillas de *P. incana* midieron 2.33 ± 0.05 mm de largo por 1.10 ± 0.01 mm de ancho, pesaron 0.28 ± 0.03 g/100 semillas y presentaron un porcentaje de humedad de 7.39 ± 2.32 %. Estos datos demuestran que las semillas son ortodoxas y se pueden almacenar a bajas temperaturas en bancos de germoplasma.
- El mejor tratamiento para establecer la viabilidad de las semillas de *P. incana* fue donde se aplicó tetrazolio al 0.5% y 48 horas de inmersión, presentando un porcentaje de semillas viables de 17.78%.
- El protocolo de desinfección más eficaz para las semillas de *P. incana* fue el tratamiento con hipoclorito de sodio al 7%, obteniéndose 0% de contaminación en los explantes.
- El tratamiento más óptimo para la germinación *in vitro* de las semillas de *P. incana* fue a temperatura constante de 25°C y medio MS suplementado con 2mg/L de ácido giberélico, determinando una capacidad germinativa de 26.67% y reduciendo el tiempo de latencia a 13 días en las semillas.

- Los parámetros morfológicos y los tratamientos de germinación *in vitro* aumentaron la capacidad germinativa de las semillas de *P. incana*.
- La caracterización morfológica, los ensayos de viabilidad y germinación *in vitro* en las semillas de *P. incana*, permitieron determinar que las semillas de esta especie son aptas para ser conservadas en bancos de germoplasma y utilizarse en procesos de reforestación en los boques andinos ecuatorianos.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda recolectar una gran cantidad de frutos de *P. incana*, pues de esta manera se obtendrá suficientes semillas tanto para su análisis como para procesos de conservación *ex situ*.

Usar medios suplementados con mayores concentraciones de ácido giberélico o diferentes concentraciones de auxinas, con el fin de incrementar la germinación y el crecimiento de las plántulas de *P. incana*.

Evaluar la germinación *in vitro* de las semillas de *P. incana* en periodos más largos de tiempo, puesto que el estado de latencia de las mismas es muy difícil de romper.

Realizar ensayos de caracterización molecular para diferenciar genotípicamente a la especie *P. incana*, debido a que la diferenciación fenotípica es compleja con respecto a otras especies de la misma categoría infragenérica *Incanaee*.

Bibliografía

- Alcantara, J. S., Acero, J., Alcántar, J. D., & Sánchez, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109–129.
- Alequin, F. (2019). *El proceso de la germinación de semillas. Factores que afectan a la germinación*. InfoAgro.
https://www.infoagro.com/documentos/el_proceso_germinacion_semillas__factores_que_afectan_a_germinacion.asp
- Álvarez, J. G., Rodríguez de la O, J. L., & García, J. (2008). Desinfección y selección de inóculo in vitro de *Abies religiosa*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 14(1), 11–14. <http://www.epa.gov/own/mtb/cs-99-062.pdf>.
- Amador-Alfárez, K. A., Na Díaz-González, J., Loza-Cornejo, S., & Yareth Bivián-Castro, E. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*, 35, 109–131.
- Boza, T. E., & Kessler, M. (2022). A monography of the genus *Polylepis* (Rosaceae). *PhytoKeys* 203: 1-274, 203, 1–274. <https://doi.org/10.3897/PHYTOKEYS.203.83529>
- Bussmann, R. W. (2005). Bosques andinos del sur de Ecuador, clasificación, regeneración y uso. *Revista Peruana de Biología*, 12(2), 203–216. <https://doi.org/10.15381/RPB.V12I2.2394>
- Camacho, M. (2013). *Los páramos ecuatorianos: Caracterización y consideraciones para su conservación y aprovechamiento sostenible*.
- Canales, Á., & Huarasa, Y. R. (2020). Germination power of *Polylepis incana* with application of different water treatments. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 8(3), 495–506.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-34692020000300495&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Cárdenas, A., & Espinoza, R. (2014). *Guía Práctica de Cultivo in vitro de Especies Vegetales*.

Caroca, R., Zapata, N., & Vargas, M. (2016). Efecto de la temperatura sobre la germinación de cuatro genotipos de maní (*Arachis hypogaea* L.). *Chilean J. Agric. Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 32(2), 94–101.

Centro Ecuatoriano de Servicios Agrícolas. (1991). *Experiencias sobre reforestación en la sierra ecuatoriana, con especies nativas*. <https://goo.gl/tYyL7U>

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>

Chuncho Morocho, C., & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), 71–83.

Cortés, L. A., Camacho-Ballesteros, S., & Matoma-Cardona, M. (2020). Estudio de la composición y estructura del bosque andino localizado en Potrero Grande, Chipaque (Colombia). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 23(1). <https://doi.org/10.31910/RUDCA.V23.N1.2020.1483>

Cuyckens, G., & Renison, D. (2018). Ecología y conservación de los bosques montanos de Polylepis. *Ecología Austral*, 28(1), 157–162. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X2018000200001&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Domic, A. I., Capriles, J. M., & Camilo, G. R. (2020). Evaluating the fitness effects of seed size and maternal tree size on *Polylepis tomentella* (Rosaceae) seed germination and seedling performance. *Journal of Tropical Ecology*, 36(3), 115–122.

<https://doi.org/10.1017/S0266467420000061>

Doria, J. (2010). Generalidades sobre semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74–85.

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000100011&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

[59362010000100011&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000100011&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Duque, A., Peña, M. A., Cuesta, F., González-Caro, S., Kennedy, P., Phillips, O. L., Calderón-Loor, M., Blundo, C., Carilla, J., Cayola, L., Farfán-Ríos, W., Fuentes, A., Grau, R., Homeier, J., Loza-Rivera, M. I., Malhi, Y., Malizia, A., Malizia, L., Martínez-Villa, J. A., ... Feeley, K. J. (2021). Mature Andean forests as globally important carbon sinks and future carbon refuges. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22459-8>

Eras García, M., Tamayo, J. P., & Mendoza, Z. A. (2021). Diversidad florística, endemismo y estado de conservación de los componentes arbustivo y herbáceo de un bosque andino en el sur del Ecuador. *Bosques Latitud Cero*, 11(1), 83–96.

Eycott, A. E., & Wilfahrt, P. A. (2022). *Seed viability, germinability, and dormancy*. *Climex Handbook*. <https://climexhandbook.w.uib.no/2019/11/04/seed-viability-germinability-and-dormancy/>

Flores, A., Álvarez, J., Rodríguez de la O, J., & Corona, A. (2008). Germinación in vitro de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana*, 10(2), 27–33.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49711436004>

- García, D. L., Ocampo, M. L., & Mesa, N. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 76–84. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54277>
- Gómez-Ruiz, P. A., Lindig-Cisneros, R., & Vargas-Ríos, O. (2013). Facilitation among plants: A strategy for the ecological restoration of the high-andean forest (Bogotá, D.C.-Colombia). *Ecological Engineering*, 57, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.049>
- International Seed Testing Association. (2016). Reglas Internacionales para el Análisis de las Semillas. In *International Rules for Seed Testing* (Vol. 2016, Issue 1). International Seed Testing Association. <https://doi.org/10.15258/istarules.2016.f>
- Kessler, M. (2006). Bosques de *Polylepis*. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 1(1), 110–120.
- Lamont, B. B. (2022). Seed biologists beware: Estimates of initial viability based on ungerminated seeds at the end of an experiment may be error-prone. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 24(3), 399. <https://doi.org/10.1111/PLB.13407>
- Martin, A. C. (1946). The Comparative Internal Morphology of Seeds. *American Midland Naturalist*, 36(3), 513. <https://doi.org/10.2307/2421457>
- Pais, A. I., Tecco, P. A., Funes, G., & Cabido, M. (2012). Efecto de la temperatura en la regeneración de especies leñosas del Chaco Serrano e implicancias en la distribución actual y potencial de bosques. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 47(3–4), 401–410. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722012000200010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Pérez, F., & Pita, J. M. (2018). *Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas*.

- Pradhan, N., Fan, X., Martini, F., Chen, H., Liu, H., Gao, J., & Goodale, U. M. (2022). Seed viability testing for research and conservation of epiphytic and terrestrial orchids. *Botanical Studies*, 63(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S40529-022-00333-0/TABLES/3>
- Pretell, J. (1985). *Apuntes sobre algunas especies forestales nativas de la sierra peruana*. Ministerio de Agricultura.
- Robb, A. (2015). *What is Seed Germination? - Definition, Process, Steps & Factors*. Study.Com. <https://study.com/academy/lesson/what-is-seed-germination-definition-process-steps-factors.html>
- Romero-Saritama, J., & Granda, M. (2020). Variación del número de semillas en frutos de 156 especies leñosas del Ecuador. *AXIOMA*, 23, 52–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.26621/XVI23.2020.12.A09.PUCESI.2550.6684>
- Romero-Saritama, 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. (2018). *Bosques de polylepis en Ecuador*. <https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/home>
- Romoleroux, K., Cárate, D., Eler, R., & Navarete, H. (2016). *Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi* (1era Edición). Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Ruiz, M. de los Á. (2009). *El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas* (G. Covas, Ed.; 1era ed.). E.E.A. INTA Anguil. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-el_anlisis_de_tetrazolio_en_el_control_de_calidad_de_.pdf

- Sánchez-Chiang, N., & Jiménez, V. M. (2010). Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, 21(1), 193–205.
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212010000100020&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Santillán, M. E. (2022). *Determinación de un protocolo de germinación in vitro de semillas de cuatro especies del género Lachemilla (Focke) Rydberg (Rosaceae) recolectadas en el Parque Nacional Cayambe Coca, Ecuador*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Seltmann, P., Leyer, I., Renison, D., & Hensen, I. (2007). Variation of seed mass and its effects on germination in *Polylepis australis*: Implications for seed collection. *New Forests*, 33(2), 171–181. <https://doi.org/10.1007/s11056-006-9021-8>
- Serrada, R. (2000). *Apuntes de Repoblaciones Forestales*. Fundación Conde del Valle de Salazar.
- Simpson, B. B. (1986). *Speciation and Specialization of Polylepis in the Andes*. (F. Vullemeire & M. Monasterio, Eds.; Oxford University).
- Vargas, M. (1991). Factores que afectan la germinación de semillas. *BOLTEC*, 24(1), 26–31.
- 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. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X2018000200014&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Vega, C., Quezada, J., Rocabado, P., Villegas, G., & Bermejo, J. C. (2019). Assessment of Seed Quality and Germination Response in the Species of the Genus *Polylepis*. *Seed Dormancy and Germination*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.88010>
- Viana, M. L., Morandini, M. N., Giamminola, E. M., & Díaz, R. C. (2011). Conservación ex situ: un banco de germoplasma de especies nativas. *Biodiversidad*, 1(1), 35–41.
- Wesche, K., Cierjacks, A., Assefa, Y., Wagner, S., Fetene, M., & Hensen, I. (2008). Recruitment of trees at tropical alpine treelines: *Erica* in Africa versus *Polylepis* in South America. *Plant Ecology and Diversity*, 1(1), 35–46. <https://doi.org/10.1080/17550870802262166>
- Zurita-Valencia, W., Elmar Gómez-Cruz, J., Atrián-Mendoza, E., Hernández-García, A., Granados-García, E., Jesús García-Magaña, J., Salgado-Garciglia, R., & Sánchez-Vargas, N. M. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación in vitro y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (Tiliaceae). *PoliBotánica*, 38, 129–144.