

# DETERMINACIÓN DEL NÚMERO CROMOSÓMICO DE *Polylepis pauta* Y *Polylepis sericea* MEDIANTE CONTEO DIRECTO POR MICROSCOPIA ÓPTICA EN TRES POBLACIONES DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA

José Luis Montalvo<sup>1</sup>; C. Segovia<sup>2</sup>, M. Jadán<sup>3</sup> y K. Proaño<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Conservación y Evolución.  
Escuela Politécnica del Ejército (ESPE).  
Salgolquí-Ecuador.  
[jl\\_monpro7@hotmail.com](mailto:jl_monpro7@hotmail.com).

<sup>2</sup>Lab of Molecular Systematics and Genetic Evolution. University of Florida. Gainesville, FL

<sup>3</sup>Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Escuela Politécnica del Ejército (ESPE).

<sup>4</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Escuela Politécnica del Ejército (ESPE).

---

**RESUMEN** En el Ecuador, *Polylepis pauta* y *Polylepis sericea*, presentan caracteres morfológicos similares lo que no ha permitido una clara y precisa distribución y clasificación taxonómica en el país, principalmente en la provincia de Pichincha donde se observa una simpatria de estas especies. De esta forma se planteó la citogenética como estrategia de diferenciación entre estas especies, utilizando como herramienta el conteo cromosómico directo a partir de muestras de tejido meristemático de raíz. Se recolectaron plántulas de tamaño 10-15cm de semilleros naturales en poblaciones del Parque Nacional Cayambe Coca, Reserva Mojanda y Reserva Yanacocha. Una vez establecido el invernadero y aclimatadas las plantas, se extrajo el material vegetal radicular. Las raíces fueron sometidas a un proceso de pretratamiento con agua destilada a 4°C por 24 horas, a continuación una fijación con Carnoy, para luego hidrolizar el tejido con HCL 1N y teñirlo con aceto-carmin 1%. Fueron muy importantes los lavados con dH<sub>2</sub>O pH5.8 entre cada proceso. Se logró describir el número cromosómico exacto para las especies de *P. pauta* y *P. sericea* a partir de muestras de raíz meristemática. Se obtuvo dos grupos, uno con un valor de  $2n = 72$  para *P. pauta* en las poblaciones de Mojanda y Cayambe Coca y otro para *P. sericea* en la que se obtuvo un valor de  $2n = 82$  en la población de Yanacocha. Se evidenció un nivel de ploidía decaploide ( $2n = 10x$ ) para *P. pauta* y dodecaploide ( $2n = 12x$ ) para *P. sericea* en base al número cromosómico  $x = 7$  de la familia Rosaceae. Este estudio permite generar una base científica fuerte, de tal forma que se la tome en cuenta como estrategia para modelar futuros planes de conservación y reforestación tecnificada de estos delicados bosques.

**Palabras clave:** *Polylepis*, conteo cromosómico, hibridación, nivel de ploidía, conservación.

**ABSTRACT** In Ecuador, both *Polylepis pauta* and *Polylepis sericea*, have similar morphological characters which did not allow a clear and precise taxonomic distribution in the country, mainly in the province of Pichincha where there is a sympatry of these species. Thus cytogenetics was raised as a strategy of differentiation between these species, using direct chromosome counting from samples of root meristem as a tool. Seedlings were collected with an average size of 10-15cm from natural seedbeds in three different populations: Cayambe Coca National Park, Reserve Mojanda and Reserve Yanacocha. Roots were extracted from seedling once the greenhouse was established and the plants were properly acclimatized. The roots tissue were subjected to a pretreatment process with distilled water at 4 ° C for 24 hours, Carnoy fixation at 4 ° C for 24 hours , then the tissue was hydrolyzed with HCl 1N for 25 minutes at 60 ° C and finally dye it with carmine-acetone 1%. They were very important pH5.8 dH<sub>2</sub>O washes between each process. It was possible

to describe the exact chromosome number for both *P. pauta* and *P. sericea* from meristematic root samples. The results show two groups, one with a value of  $2n = 72$  for *P. pauta* in populations of Cayambe Coca and Mojanda and the other one for *P. sericea* that shows a value of  $2n = 82$  in Yanacocha. There appeared a ploidy level ( $2n = 10x$ ) for *P. pauta* and ( $2n = 12x$ ) to *P. sericea* based on chromosome number  $x = 7$  from Rosaceae family. This research provides strong scientific base, so it should be taken into account as a strategy to shape future conservation and reforestation plans of these delicate tech forests.

**Key words:** *Polylepis*, chromosome counting, hybridization, ploidy level, conservancy.

## I. INTRODUCCIÓN

El páramo es un conjunto de ecosistemas que permite mantener un equilibrio hidrológico a nivel regional, lo cual es muy importante para lograr satisfacer varias necesidades del ser humano. Un elemento vital de los Andes sudamericanos que ayuda a conservar el equilibrio hídrico de los ecosistemas alto andinos (Simpson, 1979; Hensen, 1995; Kessler, 2007) es el género *Polylepis* [*poly* = muchas, *lepis* = capas]. En algunos lugares *Polylepis* es el único árbol que crece a alturas que sobrepasan los 3500m y alberga una cantidad considerable de flora y fauna relacionada. Se estima que alrededor del 98% de la cobertura original de los bosques de *Polylepis* se han perdido debido a la tala, quema, expansión agrícola y urbana, y a la reforestación no tecnificada en los últimos mil años (Fjeldsa, 2002; Kessler, 2002; Renison *et al.*, 2005; Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2010).

En el Ecuador lamentablemente no existen estrategias efectivas, con respaldo científico, para la conservación adecuada de los bosques de *Polylepis* y se ha observado la introducción de especies exóticas en lugares donde especies propias de un lugar determinado han vivido por cientos de años. Esta inapropiada reforestación, podría causar una alteración del hábitat natural, ya sea por un desplazamiento por competencia entre

especies o por procesos de poliploidía e hibridación, lo cual dificultaría aún más la diferenciación taxonómica entre especies (Segovia-Salcedo, 2011).

En las últimas décadas se han realizado varios intentos de clarificar su filogenia a través de técnicas moleculares las cuales se han visto truncados por la falta de resolución en los análisis como ITS, AFPLs y Adh1 (Schmidt-Lebuhn, Kumar & Kessler, 2006a). Una de las posibles razones de esta falta de claridad es la frecuente hibridación e introgresión entre las especies de *Polylepis* debido a factores naturales como la movilidad del polen a través de largas distancias por efecto del viento (Hoch & Corner, 2005; Seltman *et al.*, 2007; Cierjacks *et al.*, 2007). Inclusive estudios ecológicos y biogeográficos referentes a *Polylepis* se han visto obstaculizados por problemas de delimitación entre especies. Se ha observado que muchas especies dentro del género *Polylepis* son muy similares morfológicamente, aunque tienen localizaciones geográficas distintas y poseen diferencias a nivel genético (Schmidt-Lebuhn, *et al.*, 2010).

En el Ecuador, *Polylepis pauta* y *Polylepis sericea*, presentan caracteres morfológicos muy similares, siendo difícil hacer una comparación morfológica de estas dos especies, lo que ha llevado a la falta de

una clara y precisa distribución y clasificación taxonómica de las mismas en el país, principalmente en la provincia de Pichincha donde se observa una simpatria de estas especies (Romoleroux, 1996; Segovia-Salcedo, 2010). Una herramienta importante es el estudio del ADN, ya que al ser una molécula propia para cada organismo y estar organizada en juegos únicos de cromosomas, permite descifrar las diferencias y relación existente entre dos especies similares, utilizando variables como el número cromosómico o su estructura.

La ciencia que intenta correlacionar los eventos celulares, especialmente aquellos de los cromosomas, con los fenómenos genéticos se la conoce como Citogenética (Stansfield, 1992), la cual se utilizará para establecer el estudio cromosómico como estrategia de diferenciación taxonómica, prerrequisito para estudios genéticos, de caracterización de germoplasma y de conservación de material *in vitro* (Pérez *et al.*, 2003).

Esta investigación utiliza el conteo cromosómico directo a partir de muestras de tejido meristemático de raíz de plántulas seleccionadas. Además es un aporte importante dentro de esta dinámica de manejo de los ecosistemas alto andinos, para el proceso de establecimiento de una línea base de conocimiento fundamentado en herramientas como el estudio citogenético para realizar una caracterización de nuestros bosques.

En este caso, se han escogido poblaciones de *Polylepis pauta* Hieron y *Polylepis sericea* Wedd debido a su alta similitud morfológica, lo cual ha dificultado su clasificación taxonómica especialmente en la provincia de Pichincha donde es prácticamente imposible diferenciarlas a simple vista, por ende determinar el número cromosómico de estas especies en las

poblaciones de Cayambe Coca, Mojanda y Yanacocha, permitirá esclarecer dudas acerca de la identificación de las mismas y contribuirá a esclarecer las hipótesis sobre poliploidía, así como supuestos casos de hibridación.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Recolección de explantes*

Se ubicaron tres poblaciones representativas dentro de la provincia de Pichincha, la primera situada al oeste de la ciudad de Quito sobre la cordillera Occidental (Yanacocha), la segunda ubicada al sur este de Pichincha en el límite provincial con Napo sobre la cordillera oriental (Parque Nacional Cayambe Coca) y la última localizada al noreste de Quito en el límite entre Imbabura y Pichincha también sobre el lado oriental de la cordillera (Mojanda).

En cada punto GPS, se colectaron plántulas con un tamaño promedio de 10-20 cm de longitud desde la base a su parte más alta y se colocó en fundas plásticas de material reciclable con un banco de tierra de 15 cm de diámetro y 15 cm de profundidad para evitar daño o pérdida de raíces y aumentar el índice de sobrevivencia hacia su destino final. Se estableció una distancia mínima de diez metros entre cada una de las plantas colectadas, para evitar la presencia de dos plántulas hijas de un mismo individuo.

### *Establecimiento de invernaderos*

Se retiró el banco de tierra original y se las colocó en una solución enraizadora de Multiraices® al 5%. Se preparó una mezcla de sustrato con turba, tierra negra y cascajo en proporción 2:1:1 con el fin de obtener muestras de raíz con tejido meristemático, de forma regular y en cantidades adecuadas. Se trasplantó las plántulas a macetas plásticas de 1 L con cinco agujeros de 0.5 cm de diámetro en el fondo, con el sustrato

preparado. Se colocó tres macetas en cada bandeja plástica de tal forma que el riego se dé por absorción. La frecuencia y volumen de riego tanto por absorción y aspersión, fue igual para todas las poblaciones. Se recolectaron un total de 164 plántulas, teniendo en cuenta la posibilidad de requerir reemplazo de individuos, para así mantener un número constante de 15 plántulas por cada localidad.

#### *Recolección de muestras vegetales*

Las raíces de - 2 cm de longitud se recolectaron mediante el uso de pinzas, se las limpió mediante agua destilada helada por aspersión y se las colocó en tubos eppendorf de 0.5 ml con agua destilada pH 5.8 a 4°C. Este proceso se llevó a cabo desde las 07H00 hasta las 09H30 debido a que en este periodo del día existe mayor número de células en división (Quijia, 2010) y por lo tanto más probabilidad de encontrar metafases para el posterior conteo cromosómico.

#### *Pretratamiento y fijación de la muestra*

Las muestras se pretrataron por 24 horas a 4 °C antes de su fijación (Quijia, 2010). Luego se añadió 350 µl de la solución fijadora Carnoy [etanol: ácido acético en proporción (3:1)] y dejar refrigerar otras 24 horas a 4°C controlando que la temperatura sea constante.

#### *Hidrolisis de la muestra*

Se realizó tres lavados con agua destilada pH 5.8 en la microcentrífuga. Se colocó una solución de ácido clorhídrico HCl 1N en cada tubo. A continuación, se calentó el termobloque hasta los 60 °C y se colocó los microtubos por un tiempo de 25 minutos.

#### *Tinción de la muestra*

Se realizó tres lavados con agua destilada pH 5.8 a 600 RPM durante tres minutos. se colocó 400 µl de aceto-carmin 1% en cada eppendorf. Se dejó reposar a

temperatura ambiente por dos horas y se refrigeró a 4 °C hasta su utilización.

#### *Preparación de placas y conteo cromosómico*

Se colocó la raíz en el portaobjetos y mediante el uso del estereomicroscopio se eliminó tanto la zona pilifera como la zona de alargamiento o crecimiento, dejando únicamente el meristema apical y la cofia o caliptra. Se realizó la técnica de aplastado o "squash", ejerciendo presión uniforme con el pulgar sobre el cubreobjetos, de tal forma que las células queden en un mismo plano y los cromosomas se dispersen. La muestra preparada en la placa se observó bajo el microscopio óptico y se realizó el conteo cromosómico a un aumento final de 1250X.

#### *Análisis de datos*

Se analizó cada población por separado y no como especie, de esta forma se comparó los números cromosómicos obtenidos entre cada punto GPS y entre poblaciones. Se tabularon los datos y se realizó un análisis de estadística descriptiva e inferencial de los promedios obtenidos en cada punto y entre poblaciones.

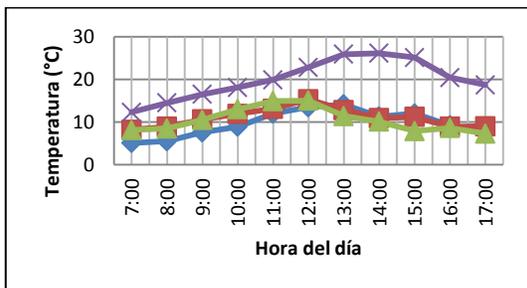
### III. RESULTADOS

#### *Recolección de explantes*

Se determinó que el tamaño óptimo de recolección de plántulas debe ser entre 10 – 20 cm debido a que plántulas muy pequeñas (3 - 5 cm) presentaran baja producción de raíces en el invernadero, mientras que plántulas muy grandes (25 - 30 cm) presentaron poca capacidad de adaptabilidad al nuevo ambiente de desarrollo en el invernadero. Se observó que las poblaciones de Cayambe Coca y Mojanda, se encuentran en el lado oriental de la cordillera, mientras que la población de Yanacocha se ubica al otro lado en la parte Oriental de la cordillera, teniendo a la ciudad de Quito y zonas pobladas cercanas, como una importante barrera geográfica.

### *Establecimiento y manejo de los invernaderos*

Se registró la temperatura diurna/vespertina en un periodo de 12 horas en las tres poblaciones del estudio así como en los invernaderos (Figura 1). Se observó los procesos de aclimatación y recolección de raíces generan niveles altos de estrés en las plantas de *P. pauta* y *P. sericea*. El aumento de la temperatura y la reducción en la humedad relativa del ambiente, provocó la deshidratación y pérdida del área foliar, y consecuentemente la muerte de la planta debido a la falta de procesos vitales como la fotosíntesis. Por otro lado, la poda de raíces en el proceso de recolección, provocó una disminución en la capacidad de absorción de agua, debilitando las yemas, secando los brotes y finalmente causando la muerte de la plántula a las 72 horas.



**Figura 1.** Registro de temperaturas (°C) para las poblaciones de Cayambe Coca (azul), Mojanda (rojo), Yanacocha (verde) e Invernadero (violeta) en un periodo de 10 horas.

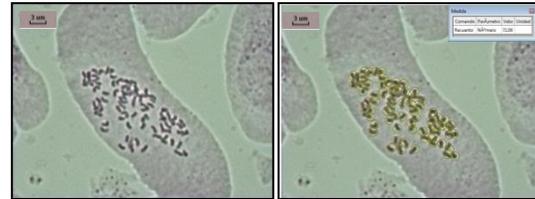
### *Conteo cromosómico*

En algunas ocasiones el conteo se dificultó por la presencia de restos de la rizodermis y parénquima cortical.

### *Población Cayambe Coca*

Una vez realizado el conteo cromosómico, se obtuvo el número cromosómico para cada raíz. El valor promedio para la coordenada uno (17 N

819052 9966764) fue de 71.53, para la coordenada dos (17 N 819466 9975197) fue de 71.8 y para la coordenada tres (17 N 818792 9979339) fue de 72.0. En general el valor promedio del número cromosómico para la población de Cayambe Coca es de  $2n=72$  (Figura 2).

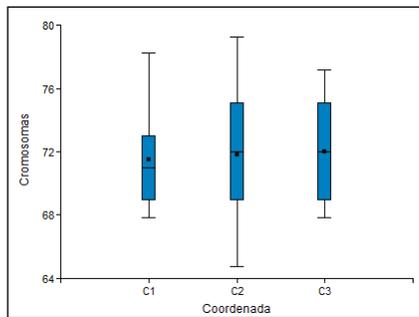


**Figura 2.** Microfotografías de cromosomas metafásicos de células de raíz *P. pauta* en la población de Parque Nacional Cayambe Coca. Aumento de 1250X. Se observa  $2n=72$ . (Software Infinity Analyze®). La barra representa 3 micrómetros.

El análisis de varianza mostró  $p$  del 92 %. Este valor al ser mayor al 5%, rechaza la hipótesis alternativa  $H_a$  y acepta la hipótesis nula  $H_0$ , lo que sugiere que no existen diferencias significativas en el número cromosómico entre los lugares o coordenadas de recolección.

La prueba Duncan muestra un solo grupo estadísticamente similar y valores de media de 71.53 para la coordenada C1, de 71.8 para C2 y de 72 para C3, con 42 grados de libertad. Por lo tanto al estar en un mismo grupo, se deduce que los valores del número cromosómico en las tres coordenadas, no son significativamente diferentes.

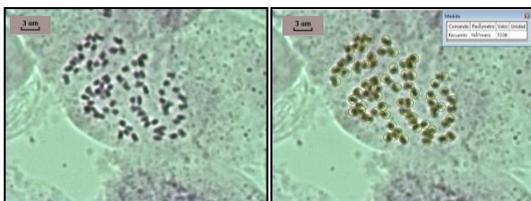
La prueba de Shapiro-Wilks demostró que los valores obtenidos son paramétricos y por lo tanto que los datos se ajustan a una distribución normal. La prueba de Kruskal-Wallis demostró que no existe diferencia significativa entre los valores de los cromosomas entre las tres coordenadas estudiadas y por lo tanto no se ajusta a un modelo no paramétrico. Además se comprobó mediante gráficos (Figura 3).



**Figura 3.** Gráfico de cajas (box-plot) para la variable cromosomas según coordenada de la población de Cayambe Coca correspondiente a *Polylepis pauta*. Puntos de recolección: C1 (17 N 819052 9966764), C2 (17 N 819466 9975197) y C3 (17 N 818792 9979339).

#### Población Mojanda

Una vez realizado el conteo cromosómico, se obtuvo el número cromosómico para cada raíz. El valor promedio del número cromosómico para la coordenada uno (17 N 803099 16624) fue de 71.67, para la coordenada dos (17 N 804306 13454) de 71.73 y para la coordenada tres (17 N 805732 15302) de 71.47. De manera general se observa un valor promedio de  $2n=72$  para el número cromosómico en la población de Mojanda. (Figura 4).

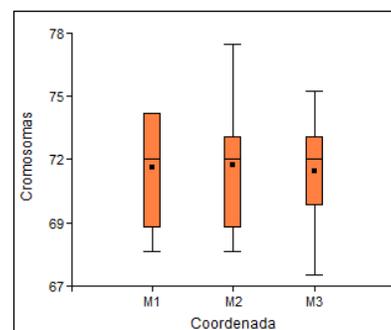


**Figura 4.** Microfotografías de cromosomas metafásicos de células de raíz *P. pauta* en Mojanda. Aumento de 1250X (Software Infinity Analyze®). Se observa  $2n=72$ . La barra representa 3 micrómetros.

El ANOVA mostró  $p$  del 95 %. Este valor al ser mayor al 5%, rechaza la hipótesis alternativa  $H_a$  y acepta la hipótesis nula  $H_0$ , por lo que no existen diferencias significativas en el número cromosómico entre los lugares o coordenadas de recolección. La prueba Duncan muestra un solo grupo (A) estadísticamente similar. Los valores de media de 71.67 para la

coordenada M1, de 71.73 para M2 y de 71.47 para M3, con 42 grados de libertad, deducen que los valores del número cromosómico en las tres coordenadas, no son significativamente diferentes y por lo tanto están en un mismo grupo.

La prueba de Shapiro-Wilks demostró mostró un valor  $p$  (unilateral D) de 30%, por lo que se concluye que los valores obtenidos son paramétricos, por lo tanto los datos se ajustan a una distribución normal. La prueba de Kruskal-Wallis mostró un valor  $p$  de 95%, así se concluye que no existe diferencia significativa entre los valores de los cromosomas entre las tres coordenadas y por lo tanto no se ajusta a un modelo no paramétrico. Además se comprobó mediante gráficos box-plot (Figura 5).

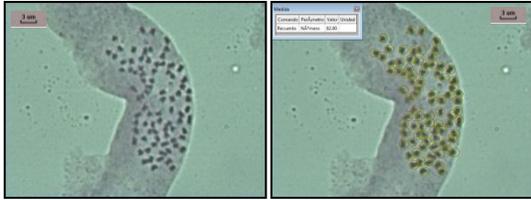


**Figura 5.** Gráfico de cajas (box-plot) para la variable cromosomas según coordenada de la población de Mojanda correspondiente a *Polylepis pauta*. Puntos de recolección: **M1** (17 N 803099 16624), **M2** (17 N 804306 13454) y **M3** (17 N 805732 15302).

#### Población Yanacocha

Una vez realizado el conteo cromosómico, se obtuvo el número cromosómico para cada raíz. El valor promedio obtenido para la coordenada uno (17 N 768313 9986267) fue de 81.07, para la coordenada dos (17 N 768697 9985884) fue de 82.80 y para la coordenada tres (17 N 768662 9985191) fue de 82.80. A pesar de no generar un valor fijo por motivos de solapamiento y pequeño tamaño de los cromosomas (aproximadamente 1  $\mu$ m), se

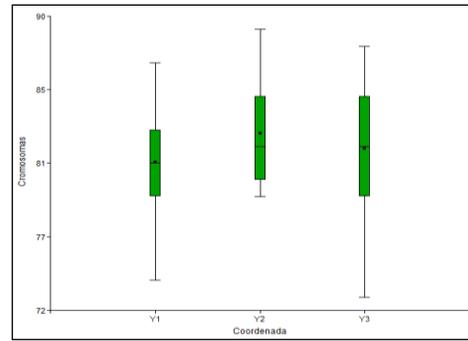
observa de forma general que la población Yanacocha muestra un valor promedio de  $2n=82$ . (Figura 6).



**Figura 6.** Microfotografías de cromosomas metafásicos de células de raíz *P. sericea* en Yanacocha. Aumento de 1250X (Software Infinity Analyze®). Se observa  $2n=82$ . La barra representa 3 micrómetros.

El análisis de varianza mostró un valor p del 40 %, por lo tanto no existen diferencias significativas en el número cromosómico entre los lugares o coordenadas de recolección dentro de la Reserva Yanacocha. La prueba Duncan muestra un solo grupo (A) estadísticamente similar con valores de media de 81.07 para la coordenada Y1, de 82.80 para Y2 y de 81.87 para Y3, con 42 grados de libertad, por lo que se deduce que los valores del número cromosómico en las tres coordenadas, no son significativamente diferentes.

La prueba de Shapiro-Wilks mostró un valor de p (unilateral D) de 44 %, por lo se concluye que los valores obtenidos son paramétricos y que los datos se ajustan a una distribución normal. La prueba de Kruskal-Wallis mostró un valor p de 44%, por lo tanto se concluye que no existe diferencia significativa entre los valores de los cromosomas entre las tres coordenadas y que no se ajusta a un modelo no paramétrico. Además se comprobó mediante gráficos estadísticos (Figura 7).

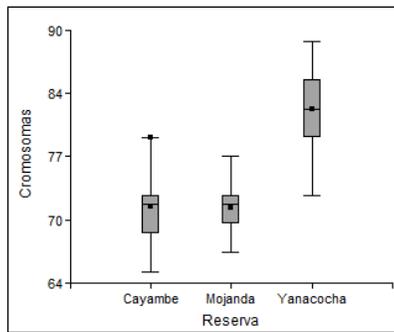


**Figura 7.** Gráfico de cajas (box-plot) para la variable cromosomas según coordenada de la población de Yanacocha correspondiente a *Polylepis sericea*. Puntos de recolección: Y1 (17 N 768313 9986267), Y2 (17 N 768697 9985884), Y3 (17 N 768662 9985191).

#### Análisis entre poblaciones

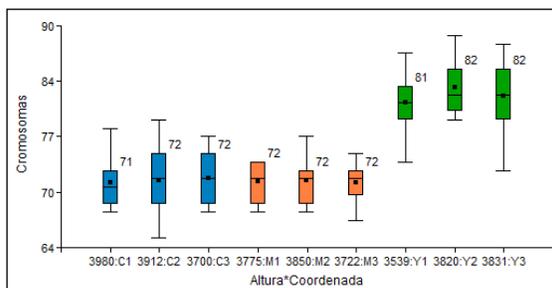
El ANOVA mostró un valor p del 0.01 %, lo que sugiere que existen diferencias significativas en el número cromosómico entre las tres poblaciones (Cayambe Coca, Mojanda y Yanacocha). La prueba Duncan mostró dos grupos estadísticamente diferentes (A y B) con 126 grados de libertad y un error estadístico compartido de 0.79. En el grupo A se encuentran las poblaciones de Cayambe Coca y Mojanda, mostrando una media en un rango entre 71.47 a 72.00. El grupo B, mostró una media promedio entre 81.07 a 82.80. Debido a la existencia de dos grupos, se dedujo que los valores del número cromosómico son significativamente diferentes tomando en cuenta el grupo al que corresponden.

La prueba de Kruskal-Wallis mostró un valor p de 0.01 %, por lo tanto se concluye que las medias que comparten un grupo (A o B) no son significativamente diferentes, mientras que si difieren en su grupo. Se deduce que sus valores si son significativamente diferentes y por lo tanto se ajusta a un modelo no paramétrico. Se graficó mediante box-plot para diferenciación entre grupos (Figura 8).



**Figura 8.** Gráfico de cajas (box-plot) para la variable cromosomas según localidad en las poblaciones de Yanacocha (*P. sericea*) y Mojanda (*P. pauta*) y Cayambe Coca (*P. pauta*)

Se realizó un gráfico de cajas (box-plot) que relaciona el número cromosómico obtenido de acuerdo a la coordenada de recolección de plántulas y su correspondiente altitud (Figura 9). El número cromosómico no muestra diferencias significativas cuando se analiza en función de la altitud, por lo que se mantiene una tendencia de  $2n = 82$  para la población de Yanacocha con un rango de 3539 - 3831m,  $2n = 72$  para Mojanda con un rango de altitud de 3722 - 3850m y finalmente de  $2n=72$  para Cayambe Coca con un rango entre 3700 – 3980m.



**Figura 9.** Gráfico de cajas (box-plot) para la variable cromosomas según punto de recolección y su altitud en las poblaciones de Yanacocha color verde (*P. sericea*), Mojanda color naranja (*P. pauta*) y Cayambe Coca color azul (*P. pauta*).

#### IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó en tres poblaciones de la provincia de Pichincha: Cayambe Coca, Mojanda y Yanacocha, las

cuales albergan bosques nativos de *Polylepis pauta* y *Polylepis sericea*. En estas zonas la diferenciación y clasificación taxonómica se ha visto dificultada debido a la alta similitud morfológica y simpatria entre estas especies (Romoleroux, 1996; Segovia-Salcedo, 2010). Se logró ubicar los lugares de recolección de plántulas en localidades designadas como poblaciones puras tanto para *P. pauta* (Reserva Mojanda) como para *P. sericea* (Reserva Yanacocha). La recolección de plántulas se realizó a partir de semilleros naturales cercanos a los árboles adultos ya que las plántulas logran establecerse más exitosamente debajo de la cobertura de éstos y no en entornos abiertos (Cuevas 2000; Cierjacks *et al.*, 2007; Rada *et al.*, 2011).

El rango de altitud donde se encuentra *Polylepis pauta* y *P. sericea* va desde los 3500m a los 5100m. A esta altura, las condiciones ambientales son consideradas extremas respecto a temperatura, humedad relativa y radiación. Este género ha desarrollado estrategias de adaptación como reducción en el tamaño de los folíolos, presencia de vellosidades en el envés de las hojas, aislamiento térmico mediante cortezas con múltiples capas, modificación de la densidad estomática de acuerdo a la altitud y a la estacionalidad hídrica, entre otros (Rada *et al.*, 2001; Hoch & Körner, 2005; Álvarez-Flores *et al.*, 2006).

Sin embargo estas cualidades son útiles en su hábitat natural, por lo que existieron problemas en la aclimatación de las plántulas en los invernaderos del proyecto ya que las condiciones ambientales a 2610 metros de altitud son muy distintas a las del páramo (Ver Figura1). Éste y otros factores, causaron una notable susceptibilidad al ataque de patógenos y en consecuencia la muerte de las plántulas más débiles. La aplicación de la solución enraizadora Multiraíces® al 5% permitió obtener raíces en un mayor número y de muy buena calidad para el desarrollo de la investigación.

La recolección de raíces se debe realizar en el horario en que los tejidos generan mayor división celular. Según Quijia, 2010 en su trabajo previo con *Polylepis*, determinó que el horario óptimo de células en metafase era de 07H00 a 09H30. Los ensayos realizados en esta investigación confirman que en este período existe mayor número de células en división y por lo tanto más probabilidad de encontrar metafases con cromosomas condensados para el conteo cromosómico.

El conteo cromosómico de las muestras de raíz del género *Polylepis*, se realizó mediante el protocolo establecido por Quijia en el 2010. Quijia estandarizó la técnica para la observación de cromosomas metafásicos en varias especies de *Polylepis* en el Ecuador. En el presente trabajo en cambio se logró describir el número cromosómico exacto para las especies de *P. pauta* y *P. sericea*, permitiendo establecer una nueva estrategia de diferenciación taxonómica entre estas especies. El conteo cromosómico es un método directo que permite entender niveles de ploidía, relaciones entre especies, esclarecer diferencias taxonómicas entre especies que comparten características morfológicas, así como posibles casos de hibridación y tendencias evolutivas (Seminario, 2004; Jara *et al.*, 2006).

En la Reserva de Mojanda se obtuvo un rango de valores para el número cromosómico de  $2n = 67 - 77$  y en la Reserva Yanacocha de  $2n = 73 - 89$ . En el trabajo de Quijia, 2010 se analizó solamente una localidad en cada una de estas poblaciones y se encontró un rango de  $2n = 70 - 84$  en Mojanda y de  $2n = 59 - 77$  en Yanacocha. Estos datos no llegaron a determinar un número cromosómico fijo sobre la población total debido a que su estudio hacía referencia a la estandarización del método de observación de cromosomas y no a la diferenciación entre especies. Si bien se observa la existencia de poliploidía, lo cual

sugiere que las especies presentes en estas poblaciones se podrían encontrar en procesos evolutivos que desembocarían en una diversificación de las mismas (Doyle *et al.*, 2008), se debe tomar en cuenta que el pequeño tamaño de los cromosomas o su solapamiento al observarlos al microscopio, podrían ser los causantes de la variabilidad en los rangos obtenidos como ha sido registrado en otras especies de plantas (Kehinde & Adegbite, 2006). Se debe recalcar que hasta hace poco no existían registros previos de conteos cromosómicos en la población del Parque Nacional Cayambe Coca. El presente estudio logra determinar un rango de valores para el número cromosómico de  $2n = 65 - 79$ .

Al realizar una comparación interpoblacional mediante un análisis de varianza, se obtuvo un valor p del 0.01 %, lo cual al ser menor que el 5 % muestra que existe diferencias significativas en el número cromosómico analizado. La prueba de Duncan que se realizó, ubica claramente dos grupos estadísticos distintos, en el que se distingue a Mojanda y Cayambe Coca en el grupo A, mientras que Yanacocha lo ubica en el B. A pesar de esta variabilidad, se comprobó que no existe desviación de los datos y que se ajustan a una distribución normal. Los valores analizados muestran que el número cromosómico de  $2n = 72$ , es el que se presenta con mayor frecuencia para las poblaciones de Cayambe Coca y Mojanda. Por lo tanto al tomar los registros de Romoleroux (1996) sobre la distribución de *Polylepis pauta*, como la especie representativa en las tres coordenadas de recolección de plántulas en la localidad de Mojanda, se deduce en esta investigación que esta especie es la misma que se encuentra en los lugares de muestreo de la población Cayambe Coca. Algo totalmente diferente se encontró en la población de Yanacocha, donde el valor del número cromosómico con mayor frecuencia fue de  $2n$

= 82, por lo que se ubica a *Polylepis sericea* como especie única en esta localidad.

Al tratar de correlacionar el número cromosómico y la altitud, se observó que el número cromosómico no muestra diferencias significativas cuando se analiza en función de la altitud. La tendencia se mantiene en  $2n = 82$  para la población de Yanacocha con un rango de 3539 - 3831m,  $2n = 72$  para Mojanda con un rango de altitud de 3722 - 3850m y finalmente de  $2n=72$  para Cayambe Coca con un rango entre 3700 – 3980m. Esta poliploidía encontrada se corrobora con los estudios de McPherson (2000) y Jana (2006) quienes mencionan que existen varios fenómenos biológicos y ambientales asociados con la presencia de poliploidía. La prevalencia de este fenómeno es debido a factores como hábitats de mayor altitud, climas fríos, mayor latitud o con glaciación reciente (McPherson, 2000; Jana, 2006).

Además, se menciona que la poliploidía es más frecuente en plantas perenes y con habilidad de autofertilizarse o con capacidad de cruces inter específicos como es el caso de *Polylepis* (Grant, 1971; Ramsey & Schemske, 1998). Así, se considera que estas especies han asumido la poliploidía como una estrategia evolutiva de adaptación a nuevos nichos y a cambios en las condiciones ambientales, gracias a que poseen un genoma más complejo (Brochmann *et al.*, 2004; Soltis, 2005).

Los conteos cromosómicos directos de la presente investigación se complementan con los datos moleculares obtenidos por Andrade (2012), quien realizó un estudio de genética poblacional en el que utilizó marcadores moleculares para diferenciar a las especies de *Polylepis pauta* y *Polylepis sericea* de las mismas localidades. Estos datos evidencian una distribución similar a la obtenida en el presente trabajo. Se logra así una fuerte base científica para concluir que no existen diferencias significativas dentro de

cada población estudiada y por lo tanto se ubicaría en cada localidad a una sola especie. Se ubica a *P. pauta* en la población de Mojanda y Cayambe Coca, mientras que *P. sericea* se encuentra hacia el otro lado de la cordillera en la población de Yanacocha.

Sería interesante ampliar esta estrategia de diferenciación taxonómica el análisis estadístico poblacional y las condiciones de aclimatación de plántulas, para así encontrar la distribución taxonómica a nivel de todo el País. El descifrar la distribución taxonómica de estas especies permitirá evitar reforestaciones no tecnificadas con especies exóticas que se dan por motivo de mitigar la pérdida de bosques de *Polylepis* causado por actividades humanas.

Finalmente, como menciona Severns (2008), la efectividad de la conservación de plantas incrementará cuando los datos demográficos y genéticos sean considerados simultáneamente. Por lo tanto, la información obtenida en el presente estudio se la debe considerar esencial al momento de generar planes de conservación y manejo de bosques de *Polylepis*, debido a que además de utilizar una herramienta de análisis científico a un costo moderado, permite descifrar la verdadera distribución de *P. pauta* y *P. sericea* en una determinada localidad, y así evitar la introducción de especies no nativas, ya sea por confusión debido a su similitud morfológica o por ventajas adaptativas entre especies.

## V. CONCLUSIONES

Se logró describir el número cromosómico exacto para las especies de *P. pauta* y *P. sericea* a partir de muestras de raíz meristemática. Se obtuvo dos grupos, uno con un valor de  $2n = 72$  para *P. pauta* en las poblaciones de Mojanda y Cayambe

Coca y otro para *P. sericea* en la que se obtuvo un valor de  $2n = 82$  en la población de Yanacocha. Se determinó que en las poblaciones de Cayambe Coca, Mojanda y Yanacocha, no existen especies híbridas entre *Polylepis pauta* y *Polylepis sericea* en base al análisis estadístico del número cromosómico. Se evidenció un nivel de ploidía decaploide ( $2n = 10x$ ) para *P. pauta* y dodecaploide ( $2n = 12x$ ) para *P. sericea* en base al número cromosómico  $x = 7$  de la familia Rosaceae. En base al número cromosómico  $x = 20$  del género *Polylepis*, se obtuvo un rango de tetraploidía ( $2n = 4x$ ) para ambas especies. El conteo cromosómico directo es una herramienta importante y confiable para los análisis intra e inter poblacionales, sistemáticos, taxonómicos, la cual puede ser una estrategia para modelar futuros planes de conservación y reforestación tecnificada de estos delicados bosques. El presente trabajo marca un inicio para futuras investigaciones relacionadas a la conservación y comprensión de la evolución de especies vegetales.

## VI. REFERENCIAS

- Álvarez-Flores, F., Melgarejo, L., Romero, H., Douchet, L. (2006). Patrones electroforéticos de proteínas y actividad anticongelante en el apoplasto de la hoja de la especie andina tropical *Senecio niveo aureus*. *Acta biol. Colomb.* [online]. 2006, vol.11, n.2 [cited 2013-04-17], pp. 103-111.
- Beltrán, K., Salgado, S., Cuesta, F., León-Yáñez, S., Romoleroux, K., Ortiz, E., Cárdenas, A., Velástegui, A. (2009). Distribución Espacial, Sistemas Ecológicos y Caracterización Florística de los Páramos en el Ecuador. *EcoCiencia*, Proyecto Páramo Andino y Herbario QCA. Quito.
- Brochmann, C., Brysting, A., Alsos, I., Borgen, L., Grundt, H., Scheen, A., Elven, R. (2004). Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 521–536.
- Bustamante, M., Albán, M., Arguello, A. (2011). Los páramos del Chimborazo. Un estudio socioambiental para la toma de decisiones. Gobierno autónomo descentralizado de Chimborazo. *Ecociencia*. CONDESAN. Programa BioAndes. Proyecto Páramo Andino. Quito.
- Cierjacks, A. J., Iglesias, K., Wesche, K., & Hensen, I. (2007). Impact of sowing, canopy cover and litter on seedling dynamics of two *Polylepis* species at upper tree lines in central Ecuador. *Journal of Tropical Ecology*, 23: 309-318.
- Colmenares-Arteaga, M., Rada, F., Luque, R. (2005). Anatomía foliar de *Polylepis sericea* WEDD. (Rosaceae) a dos altitudes en los altos Andes Venezolanos. *Plántula* 3(3): 141-148.
- Cranford, M., & S. Mourato. (2011). Community conservation and a two-stage approach to payments for ecosystem services. *Ecological Economics* 71: 89-98.
- Grant, V. (1971). *Plant Speciation*. Columbia Press, New York, N. Y.
- Hensen, I. (1995). Die Vegetation von *Polylepis*-Waldern der Ostkordillere Boliviens. *Phytocoenologia*, 25: 235– 277.
- Jameson, S., & Ramsay, P. (2007). Changes in high-altitude *Polylepis* forest cover and quality in the Vilcanota Cordillera, Peru 1956-2005. *Biological Conservation*, 138, 38-46.
- Kessler, M. (1995). The genus *Polylepis* (Rosaceae) in Bolivia. *Candollea*, 50: 31-71.
- Lacadena j. R. (1996). *Citogenética*. Editorial complutense. 991 pags.

Levan, A., Fredge, Y., Sandberg, A. (1964). Nomenclature for centromeric position in chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.

Matilde Orrillo & Merideth Bonierbale. (2009), Manual técnico: Biología reproductiva y citogenética de la papa. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP). Red LatinPapa.

Maynard-Smith, J., 1966. Sympatric speciation. *Amer. Nat.* 100: 637-650.

McPherson, M. (2000). The role of polyploidy in the speciation of flowering plants, Lecture: BIOL 606 Session, University of Alberta.

Naranjo, c. A., Molina, m. C. & Poggio, L. (1990). Evidencias de un número básico  $X=5$  en el género *Zea* y su importancia en estudios del origen del maíz. *Acad Nac Cs Ex Fis Nat*, Buenos Aires, Monografía 5: 43-53.

Ortiz, V. (2007). Chromosome numbers, nuclear DNA content, and polyploidy in *Consolea* (Cactaceae), an endemic cactus of the Caribbean Islands. *American Journal of Botany*, 94: 1360–1370.

Palacios, W., Cerón, P., Rodríguez, S. (2010). Estudio Etnobotánico de productos forestales no maderables en la Reserva Ecológica el Ángel, Provincia del Carchi (periodo 2007), Universidad Técnica Nacional – Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Ecuador.

Pérez, R., Hernández, M., Rose, V., Calleros, V., & Panzera, F. (2003). Citotaxonomía y evolución cromosómica en Triatominae, Insectos vectores de la enfermedad de Chagas (heteroptera- reduviidae). *Entomology Vector* 10: 543-550.

Poggio, L., Confalonieri, V., Comas, Cc., Gonzalez, G. & Naranjo, C. (2000).

Evolutionary relationships in the genus *Zea*: analysis of repetitive sequences used as Cytological FISH and GISH markers. *Genetics and Molecular Biology* (Brasil) 23: 4: 1021-1027.

Quijia-Lamina, P. Segovia-Salcedo, C. Jadán, MK. Proano. (2010). Estandarización de la metodología para el conteo cromosómico en *Polylepis incana* y *P. pautu*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* VIL 1-2 :33-49

Rada, F., García-Núñez, C., Boero, C., Gallardo, M., Hilal, M., González, J., Prado, F., Liberman-Cruz, M. and Azócar, A. (2001). Low-temperature resistance in *Polylepis tarapacana*, a tree growing at the highest altitudes in the world. *Plant, Cell & Environment*, 24: 377–381. doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00685.x

Ramsey. J. & Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29: 467-501.

Renison, D., Cingolani, A., Suarez, R. (2002). Efectos del fuego sobre un bosquecillo de *Polylepis australis* (Rosaceae) en las montañas de Córdoba, Argentina. *Revista chilena de historia natural*, SciELO Chile - Scientific Electronic Library, 2002.

Romoleroux, K. (1996). Rosaceae in Flora of Ecuador. G. Harling and L. Andersson, Copenhagen, Denmark

Schmidt-Lebuhn, A, Kessler, M., & Kumar, M. (2006). Promiscuity in the Andes: Species Relationships in *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) Based on AFLP and Morphology. *Systematic Botany*, 31: 547-559.

Schmidt-Lebuhn, A. N., Fuchs, J., Hertel, D., Hirsch, H., Toivonen, J. and Kessler, M.

- (2010), An Andean radiation: polyploidy in the tree genus *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae). *Plant Biology*, 12: 917–926. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00297.x
- Schmidt-Lebuhn, A., Kumar, M., & Kessler, M. (2006). An assessment of the genetic population structure of two species of *Polylepis* in the Chilean Andes. *Flora*, 201: 317-325.
- Segovia-Salcedo, M. C., Ballard, H. E., & Narvaez, A. (2000). Phenetic studies of *Polylepis* in Ecuador. In Herzog, S. K., Cahill, J. & Sagot, F. (Eds.). (Resúmenes del I Congreso internacional de ecología y conservación de bosques de *Polylepis*.) Resúmenes 28 de Agosto al 1 de Septiembre de 2000, 66.
- Seltmann, D., Cocucci, A., Hensen, I., & Jung, J. (2007). Fragment size, pollination efficiency and reproductive success in natural populations of wind-pollinated *Polylepis australis* (Rosaceae) trees. *Flora*, 202, 547-554.
- Sharma, A., A. Sharma. (1991). *Chromosome Techniques. Theory and Practice*. Third edition. University Park Press Baltimore and Butterworths London. England.
- Simpson, B. B. (1979). A revision of the genus *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisorbeae). *Smithsonian Contributions to botany*, 43: 1-62.
- Soltis, D. E. & Soltis, P. S. (1993). Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Science*. 12 (3): 243-273.
- Soltis, P. S. (2005), Ancient and recent polyploidy in angiosperms. *New Phytologist*, 166: 5–8. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01379.
- Stebbins, G.L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold (publishers) Ltda. London.
- Torres, F., Recharte, J. (2007). Economías sanas en ambientes sanos: Los páramos, el agua y la biodiversidad para el desarrollo y competitividad agraria del norte peruano. *Conversatorio sobre el ecosistema páramo*; 8-9.
- Tuna, M., Vogel, P., Arumuganathan, K. & Gill, S. (2001). DNA content and ploidy determination of bromegrass germplasm accessions by flow cytometry. *Crop Science*, 41: 1629–1634.
- Valladolid, A., Blas, R., Gonzáles, R. (2004). *Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas, RAICES ANDINAS: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Aspectos generales y recursos genéticos de las raíces andinas*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).