

ANÁLISIS CROMOSÓMICO DE LA ESPECIE *Polylepis incana* EN TRES POBLACIONES DE LA ZONA CENTRO NORTE DEL ECUADOR (El Inga, Papallacta, El Ángel) A PARTIR DE MERISTEMOS RADICALES

Carlos Francisco Zurita¹; Claudia Segovia – Salcedo³; Mónica Jadán² y Cristian Peña²

¹Laboratorio de Conservación y Evolución – Universidad de las Fuerzas Armadas – E.S.P.E.
Sangolquí – Ecuador

pancho9-11mlc@hotmail.com

²Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. E.S.P.E –Universidad de las Fuerzas Armadas.

³Lab of Molecular Systematics and Genetic Evolution. University of Florida. Gainesville, Florida, USA.

RESUMEN Los estudios citogenéticos son una herramienta para inferir en modelos evolutivos, delimitar especies y detectar hibridaciones. En este género se han comprobado hibridaciones entre especies parentales a la especie *Polylepis incana*, lo cual puede causar una disminución en su potencial evolutivo. Se recolectaron plántulas en tres poblaciones del Ecuador: El Inga, Papallacta y El Ángel, las cuales muestran distintos niveles de injerencia humana. A partir de la generación y obtención de raíces en la zona de aclimatación, se aplicó un pre tratamiento a las raíces en base a agua destilada a 4° C, pH 5.8 por 24 horas, una fijación con Carnoy [3:1] por 24 horas, una hidrólisis con HCl [1N] por 25 min a 60° C y una tinción con Acetocarmín al 1 %, realizando lavados con agua destilada pH 5.8 entre cada proceso. En este estudio se consiguió determinar a partir de 225 conteos (75 de cada población), el número cromosómico preciso de la especie *Polylepis incana*, de las tres poblaciones analizadas, con un valor de $2n = 42$, evidenciando un nivel de ploidía hexaploide para esta especie ($2n = 6X$), en base al número cromosómico $X = 7$ de la familia Rosaceae. Es vital crear estrategias y fortalecer estudios que aporten al análisis poblacional de especies vulnerables y a su conservación, realizando planes de reforestación tecnificada, puntos necesarios para equilibrar los ecosistemas andinos, los cuales son generadores y controladores de vida.

Palabras Clave: Ecuador, número cromosómico, poliploidía, *Polylepis incana*.

ABSTRACT Cytogenetic analyses are used to infer evolutionary processes, delimiting species and detecting hybridizations. In this hybridizations between parental species to the *Polylepis incana* specie have been detected, which may cause a decrease in its evolutionary potential. Seedlings in three regions of Ecuador were collected, The Inga, Papallacta and The Angel, which show different levels of human interference. From the generation and production of roots in the acclimation area, a pretreatment with distilled water at 4° C, pH 5.8 for 24 hours was applied to the roots, a fixation with Carnoy [3:1] for 24 hours, hydrolysis with HCl [1N] for 25 minutes at 60° C and a stained with 1 % Acetocarmine performing

washed with distilled water pH 5.8 between each process. In this study it was possible to determine, from 225 counts (75 for each population), the precise chromosome number of the species *Polylepis incana*, from the three analyzed populations, with a value of $2n = 42$, showing a level of ploidy hexaploid for this specie ($2n = 6x$), based on the chromosome number $X = 7$ of the Rosaceae family. It is vital to create strategies and strengthen studies that contribute to the population analysis of vulnerable species and their conservation, creating plans of technified reforestation, points needed to balance the Andean ecosystems, which are generators and controllers of life.

Key words: Chromosome number, Ecuador, poliploidy, *Polylepis incana*.

I. INTRODUCCIÓN

Alrededor del mundo, se buscan estrategias eficientes para conservar ecosistemas, que están desapareciendo por efectos antropogénicos directos e indirectos. Los bosques de *Polylepis* [*poly* = muchas, *lepis* = capas], son ecosistemas susceptibles y substanciales, creando microambientes para especies de flora y fauna, además son reguladores intrínsecos del agua. *Polylepis* es el género arbóreo que domina altitudes entre los 3 000 a 5 000 metros (Simpson, 1979; Kessler, 2007). La actual clasificación de este género se basa en su morfología, produciendo una serie innecesaria de subdivisiones. En la actualidad los bosques de *Polylepis* que aún existen, están siendo deforestados para extender zonas de pastoreo y agricultura, lo cual afecta substancialmente la estructura del suelo, disminuyendo su capacidad de protección y regeneración (Hensen, *et al.*, 2011b).

En Ecuador se realizan procesos de reforestación con escasa información acerca de las plantas a ser introducidas. El proceso de hibridación entre plantas de un mismo género está comprobado, por lo que es deseable que las poblaciones seleccionadas, a ser forestadas o reforestadas, contengan la mayor diversidad genética posible, pero dentro de la misma especie, de tal manera, que se pueda asegurar el potencial evolutivo de la especie a ser intervenida (Levitus, *et al.*, 2010). Es necesario analizar que no exista interferencia de poblaciones introducidas en la supervivencia de especies nativas y endémicas, ya que causan introgresiones, sometiendo a las especies nativas a perder sus rasgos fenotípicos (Hedrick, 2001).

La mezcla de poblaciones genéticamente diversas es un procedimiento común en los esfuerzos de restauración. En este contexto, los estudios citogenéticos aportan información importante para disminuir los riesgos de cruces entre poblaciones, con variación cromosómica intraespecífica. Esto ocurre debido a una caracterización citológica inadecuada, muestreos incompletos, que no demuestran la magnitud de la especie investigada y la prevalencia de variación cromosómica de las especies introducidas. Todo esto sugiere, el aumento de la

probabilidad de que los descendientes hereden la variación cromosómica intraespecífica, y por lo tanto sean menos aptos para adaptarse a su medio (Severns & Liston, 2008).

Conocer el número de cromosomas de una especie es importante para los esfuerzos de protección ambiental, pero también para generar modelos que sirvan para estudios posteriores. En este caso se escogió a la especie *Polylepis incana*, para determinar el número cromosómico en tres poblaciones del Ecuador, El Inga, Papallacta y El Ángel, lo cual permitirá esclarecer a la hipótesis sobre el nivel de ploidía de esta especie, así como su posible hibridación con otras especies.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Fase de campo

Las plántulas de *P. incana* se colectaron evitando el estrés por manipulación. Se utilizaron herramientas que facilitaron el manejo de las plántulas, además del uso de materiales para no dañarlas. Se realizó el geo posicionamiento de los sectores analizados (Figura 1), utilizando un GPS de tres poblaciones en el Ecuador, El Inga (Pichincha), Papallacta (Pichincha) y El Ángel (Carchi). En cada población se colectaron plántulas entre 10 y 15 cm de longitud, a una distancia de 10 m entre cada una.

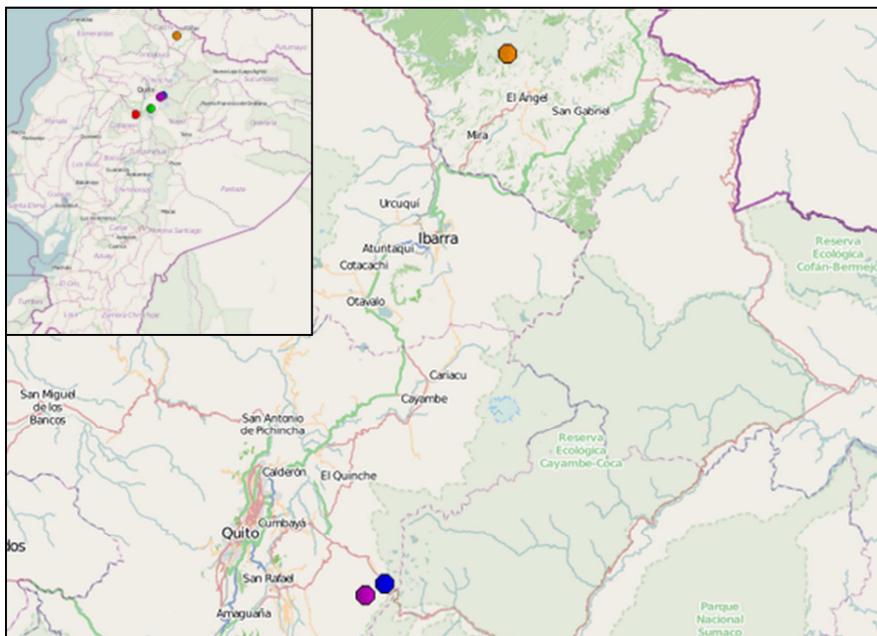


Figura 1: Vista satelital a una altura de 20 Km, *Polylepis* Lodge – El Ángel (anaranjado), Papallacta (azul), Hacienda Inga Raya – El Inga (Morado), (Schneider, 2013).

Establecimiento de plántulas en la zona de aclimatación

En los pasillos de los Laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales se estableció la zona de aclimatación, en donde se mantuvieron las plántulas colectadas, las condiciones necesarias para su supervivencia. Primero, se quitó la tierra original de su sitio de recolección, evitando dañar y arrancar las raíces de las plántulas. Segundo, se preparó una solución con el enraizador Multiraíces® a una concentración de 1 ml L⁻¹ (Montalvo, 2013). Tercero, se agregó la mezcla preparada de turba, tierra negra y cascajo en proporciones 2 : 1 : 1, junto con las plántulas que reposaron en el enraizador por 15 minutos, a macetas plásticas de 1 L, a las cuales se realizaron cinco agujeros de 5 mm de diámetro en su base. Cuarto, se colocó tres macetas en cada bandeja plástica, para que la forma de riego sea por inundación.

En este estudio se aplicó para el control de hongos una mezcla de Baczim 5 g L⁻¹ y Captan 5 g L⁻¹, y para el control de insectos Sapolio® en dosis recomendadas por el fabricante. Las fitohormonas utilizadas para promover la formación de brotes fueron Bencil Amino Purina (BAP) a 5 mg L⁻¹ y Brasinolida (BRA) a 5 mg L⁻¹, en aspergeos quincenales. Para el riego de las plántulas se utilizó el método por inundación o absorción, de una mezcla de enraizador Multiraíces®, a una concentración de 1 ml L⁻¹, con una frecuencia de riego de 15 días en invierno, y en verano cada 10 días.

Colección raíces y pre tratamiento

Se siguió el protocolo según Quijia, *et al.*, (2010), la cual señala que se debe colectar raíces de 1 a 2 cm de longitud, en el horario de 7:30 a 9:30 de la mañana. Utilizando pinzas limpias, microtubos llenos de agua a 4°C y pH 5,8, en una termo nevera portátil con hielos. Se colectó raíces gruesas y de punta con ligera coloración verdosa, evitando la colección con tierra, por lo que se lavó las raíces antes de introducirlas al tubo. Se seleccionaron las mejores raíces, 4 por cada individuo, introduciéndolas en cada microtubo. Una vez terminada la colección de raíces se colocó las muestras en refrigeración a 4° C por 24 horas.

Fijación con carnoy

Se midió tres partes de etanol al 99 % almacenado a -20° C y una parte de ácido acético glacial, la preparación se la realizó el mismo momento de la fijación, porque no se debe almacenar la preparación. Se extrajo el agua de los microtubos de 0,5 ml y se colocó el fijador Carnoy (250 a 300 µl), almacenando las muestras a 4° C por 24 horas.

Lavado de carnoy

Se extrajo el fijador Carnoy totalmente de los microtubos, se añadió agua destilada a las muestras (350 µl), las muestras fueron sometidas a centrifugación 600 RPM por 3 minutos a temperatura ambiente (20° C), los lavados se realizaron por tres ocasiones.

Hidrólisis con ácido clorhídrico

Para la hidrólisis se extrajo el agua que se utilizó para hacer los lavados y se añadió una solución de HCl 1 N, colocando las muestras en el termo bloque por 25 minutos a 60° C, para este paso se precalentó el termo bloque hasta obtener la temperatura necesaria. La solución de HCl se preparó de la siguiente manera:

Lavado de ácido clorhídrico

Se extrajo el HCl totalmente de los microtubos, se añadió agua destilada a las muestras (350 µl), las muestras fueron sometidas a centrifugación 600 RPM por 3 minutos a temperatura ambiente (20° C), los lavados se realizaron por tres ocasiones.

Tinción con acetocarmín

Para el proceso de tinción se preparó una solución de Acetocarmín al 1%, la cual se realizó de la siguiente manera:

Se agregó 1gr de Acetocarmín a una solución de ácido acético al 45 % (45 ml de ácido acético en + 55ml de agua destilada), al enfriar se almacenó a 4° C.

Para añadir el colorante se extrajo el agua del último lavado y se colocó 350 µl de Acetocarmín. Después de la tinción, se dejó reposar por un mínimo de 1 hora y un máximo de 2 horas a las raíces con el colorante a temperatura ambiente (20° C). Finalizado este periodo, se almacenaron los microtubos a temperatura de refrigeración (4° C).

Preparación de placas

Se extrajeron las raíces de los microtubos almacenados a 4° C en porta objetos, una raíz a la vez. Con la ayuda de un bisturí se cortó la punta de la raíz teñida observada desde el estéreo microscopio, eliminando la zona pilífera y la zona de alargamiento, dejando únicamente la zona apical. Con un cubre objetos se cubrió la punta extraída y se aplastó dando leves golpes para dispersar el tejido (células apicales en metafase). Finalmente se ejerció presión con el dedo pulgar para dispersar totalmente el tejido (técnica squash) y obtener un solo plano de observación.

Observación microscopio

La observación se realizó en un microscopio óptico efectuando un barrido completo de los campos ópticos de las placas obtenidas. Con la ayuda de la cámara y aditamento optovar

magnificador del campo óptico (1x, 1,25x, 1,6x y 2x) se obtuvo una imagen a 1 250 X, capturando las imágenes de las células y sus cromosomas en metafase.

Análisis de datos

En esta investigación se realizó el conteo cromosómico de muestras radicales de plántulas aclimatadas de la especie *P. incana*. Para la comparación del número cromosómico se analizó entre los puntos de cada población y entre las poblaciones aplicando el programa InfoStat 2012, obteniendo datos los cuales fueron sometidos a análisis estadísticos (ANOVA y LSD de Fisher), de los promedios resultantes. Este estudio está canalizado a la obtención no subjetiva de datos y fortalecer los argumentos de investigaciones anteriores, para dilucidar el número de cromosomas de esta especie alto andina.

III. RESULTADOS

La aclimatación de las plántulas para el desarrollo de esta investigación fue exitosa. Para los hongos, la aplicación de Baczim 5 g L⁻¹ y Captan 5 g L⁻¹ en aspergeos semanales, a las 8:00 am y a las 16:00 pm, disminuyeron en gran cantidad su propagación. Otro problema que se logró controlar, es la incidencia de insectos perjudiciales para el desarrollo de las plántulas de *Polylepis*, se decidió atacar este problema con el insecticida Sapolio® casa y jardín mata plagas. Se obtuvieron resultados alentadores en los periodos de riego que se realizaron en las plántulas de *Polylepis incana*.

La solución de enraizador 1 ml L⁻¹, fue sobresaliente para la generación de raíces. Se esperó de dos a tres meses, para observar raíces idóneas que se acoplen al requerimiento del protocolo de Quijia (2010). Durante la etapa de aclimatación y enraizamiento se trabajó con un total de 268 plántulas de *Polylepis incana*. Se logró mantener un número mayor de plantas a lo establecido como la muestra mínima para este estudio (15 por población). La tasa de mortalidad de la especie estudiada en la zona de aclimatación fue del 22 %. El total de conteos cromosómicos fue de 225, los cuales se generaron a partir de cinco conteos por planta, cinco plantas por punto (tres puntos por población), de un total de tres poblaciones (El Inga, Papallacta y El Ángel).

Población El Inga

Realizado el conteo en las placas analizadas (Figura 2), se obtuvo el número promedio de cromosomas de cada planta (Figura 3), además los valores promedios por punto o coordenada 17 M 803831 9964226 (3 592 m.s.n.m.), fue de 40,88, para la coordenada 17 M 804375 9962941 (3 698 m.s.n.m.), fue de 41,64 y para la coordenada 17 M 804552 9962327 (3 712 m.s.n.m.), fue de 41,44 (Figura 4). El valor promedio obtenido de la Población de El Inga es de 41,32, equivalente a $2n = 42$.

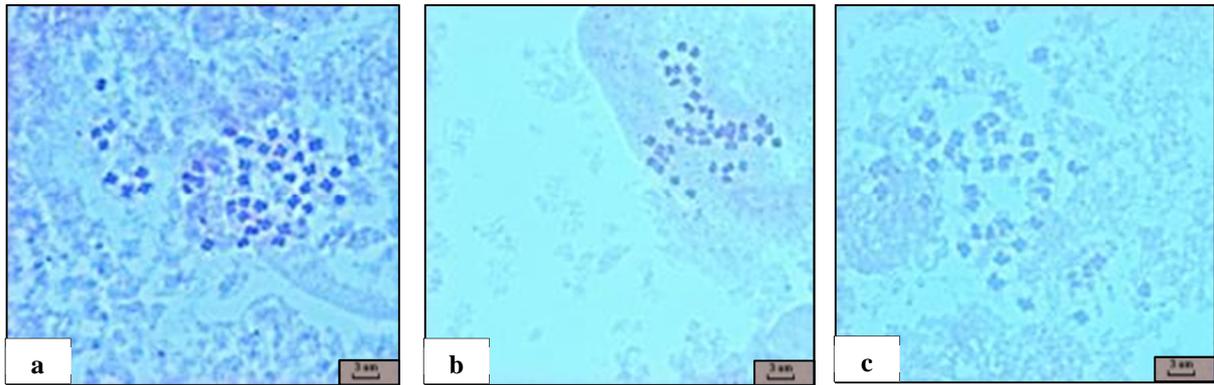


Figura 2: Fotografías de cromosomas metafásicos de *Polylepis incana* correspondientes a la Población de El Inga a) I.B-P1.4-4-42-1 250X. b) I.B-P2.3-5-42-1 250X. c) I.B-P3.2-4-42-1 250X. Se observa $2n = 42$. La barra representa 3 micrómetros (Software Infinity Analyze®).

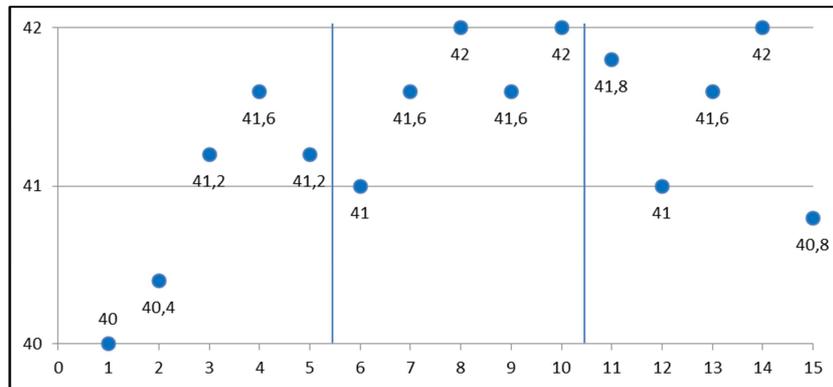


Figura 3: Promedios de conteos cromosómicos de cada planta de *Polylepis incana* en la población de El Inga.

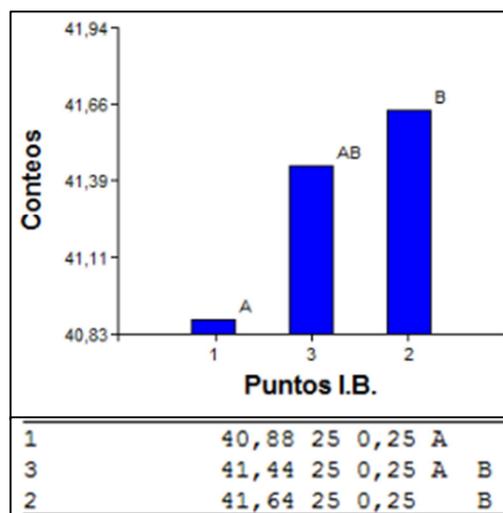


Figura 4: Promedios de los puntos o coordenada de *P. incana* en la población de El Inga.

La figura 3, indica que las primeras 5 pertenecen al primer punto, las siguientes 5 plantas pertenecen al punto 2 y las últimas 5 plantas pertenecen al punto número 3. Mediante esta imagen podemos observar que la mayoría de los promedios de cada planta, se encuentran en el intervalo de 41 a 42 cromosomas. En la figura 4, se observan dos grupos, A (punto 1) y B (punto 2), en el caso del punto 3, este punto puede pertenecer tanto al grupo A como al grupo B. Gracias a la prueba ANOVA estos grupos no muestran diferencias significativas, obteniendo un valor p del 9 %, este valor al ser mayor al 5%, rechaza la hipótesis alternativa H_a y acepta la hipótesis nula H_0 , esto representa que no existen diferencias significativas entre los valores de los grupos A y B, de conteos cromosómicos entre los puntos de recolección de la población El Inga.

Población Papallacta

A partir del conteo en las placas analizadas (Figura 5), se obtuvo el número promedio de cromosomas de cada planta (Figura 6), además los valores promedios por punto o coordenada 17 M 808854 9964678 (3 736 m.s.n.m.), fue de 41,68, para la coordenada 17 M 808228 9965683 (3 747 m.s.n.m.), fue de 41,68 y para la coordenada 17 M 807233 9966355 (3 691 m.s.n.m.), fue de 41,68 (Figura 7). El valor promedio obtenido de la Población de Papallacta es de 41, 68, equivalente a $2n = 42$.

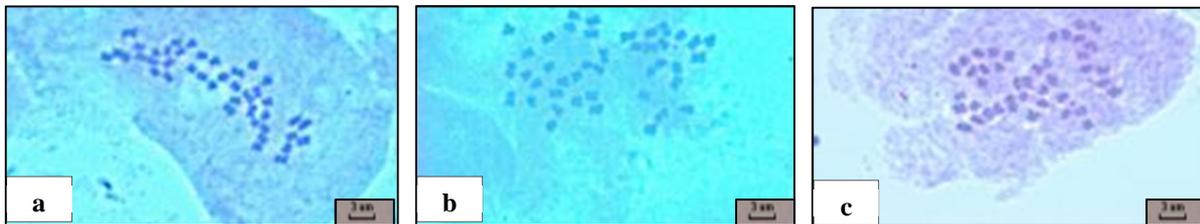


Figura 5: Fotografías de cromosomas de *Polylepis incana* correspondientes a la Población de Papallacta a) P.P-P1.1-4-42-1 250X. b) P.P-P2.1-1-42-1 250X. c) P.P-P3.3-3-42-1 250X. Se observa $2n = 42$. La barra representa 3 micrómetros (Software Infinity Analyze®).

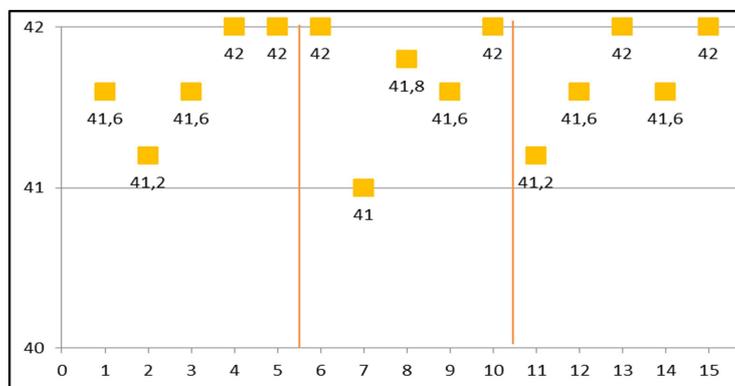


Figura 6: Promedios de conteos cromosómicos de cada planta de *P. incana* en la población de Papallacta.

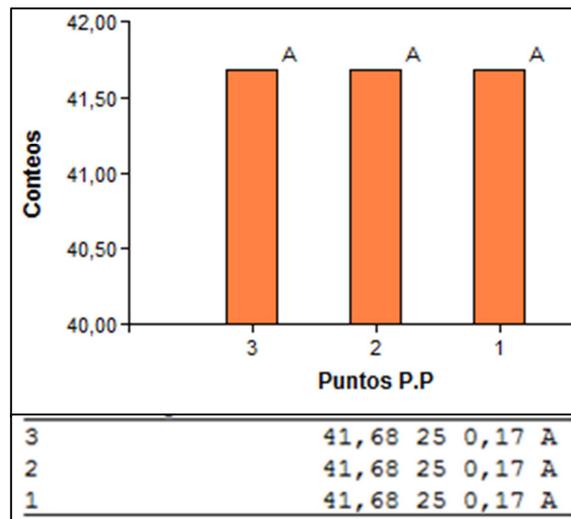


Figura7: Promedios de los puntos o coordenada de *P. incana* en la población de Papallacta.

Mediante la figura 6, se puede observar los promedios de cada planta, estos se encuentran en el intervalo de 41 a 42 cromosomas. En la figura 7, se pueden observar las medias de los tres puntos, se observa un grupos, A (punto 1, 2 y 3). Gracias a la prueba ANOVA estos puntos no muestran diferencias significativas, obteniendo un valor p del 99 %, este valor al ser mayor al 5 %, rechaza la hipótesis alternativa H_a y acepta la hipótesis nula H_0 , esto representa que no existen diferencias significativas entre los valores de conteos cromosómicos entre los puntos de recolección de la población Papallacta.

Población El Ángel

Realizado el conteo en las placas analizadas (Figura 8), se obtuvo el número promedio de cromosomas de cada planta (Figura 9), además los valores promedios por punto o coordenada 18 N 167967 79034 (3 641 m.s.n.m.), fue de 41,20 y para la coordenada 18 N 167876 79237 (3 683 m.s.n.m.), fue de 42,00 (Figura 10). El valor promedio obtenido de la Población de El Ángel es de 41, 65, equivalente a $2n = 42$.

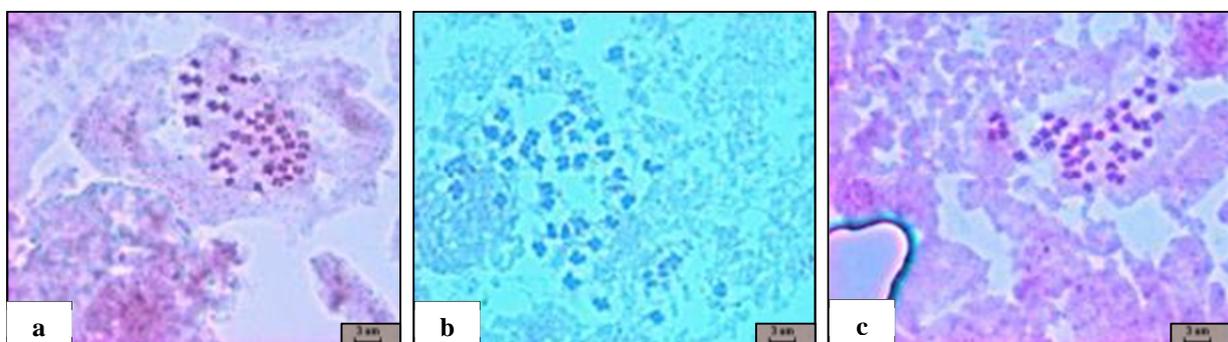


Figura 8: Fotografías de cromosomas de *Polylepis incana* correspondientes a la Población de El Ángel a) E.A-P1.1-2-42-1 250X, b) E.A-P2.1-1-42-1 250X, c) E.A-P3.5-1-42-1 250X. Se observa $2n = 42$. La barra representa 3 micrómetros (Software Infinity Analyze®).

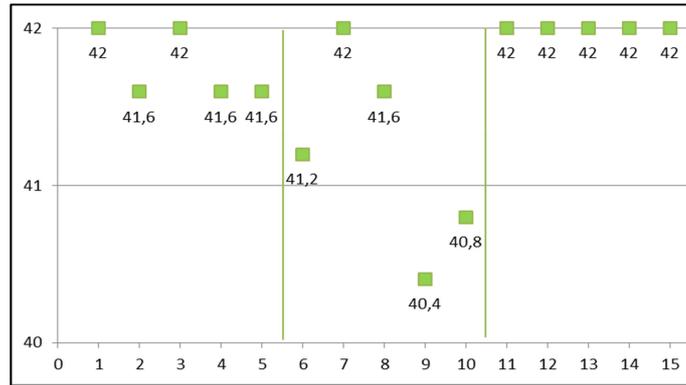


Figura 9: Promedios de conteos cromosómicos de cada planta de *Polylepis incana* en la población El Ángel.

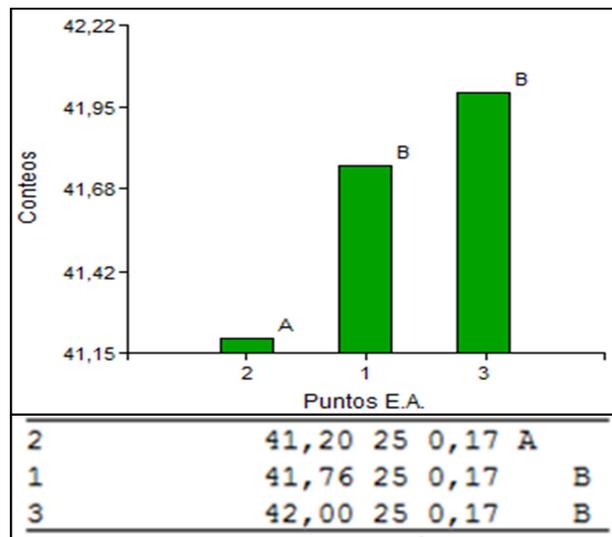


Figura 10: Promedios de los puntos o coordenada de *P. incana* en la población de El Ángel.

La figura 9, ilustra que la mayoría de los promedios de cada planta, se encuentran en el intervalo de 41 a 42 cromosomas, teniendo dos promedios de plantas en el intervalo entre 40 y 41. En la figura 10, se observa un grupo A, para el punto 2, y el grupo B abarca el punto 1 y 3. Aplicando la prueba ANOVA estos grupos muestran diferencias significativas, obteniendo un valor p del 0,3 %, porcentaje que es menor al 5 %, por lo que debemos aceptar la hipótesis alternativa H_a , demostrando que existen diferencias significativas en el número de cromosomas entre el grupo A y B en la población de El Ángel.

Análisis exploratorio de datos entre promedios de poblaciones

El análisis exploratorio de los valores obtenidos del conteo cromosómico entre los promedios de las poblaciones analizadas se realizó para visualizar gráficamente si existe algún promedio que se encuentre fuera de los intervalos definidos en este estudio, toda esta

información generada se plasmará en gráficos que ayudarán a entender los límites de los datos tabulados.

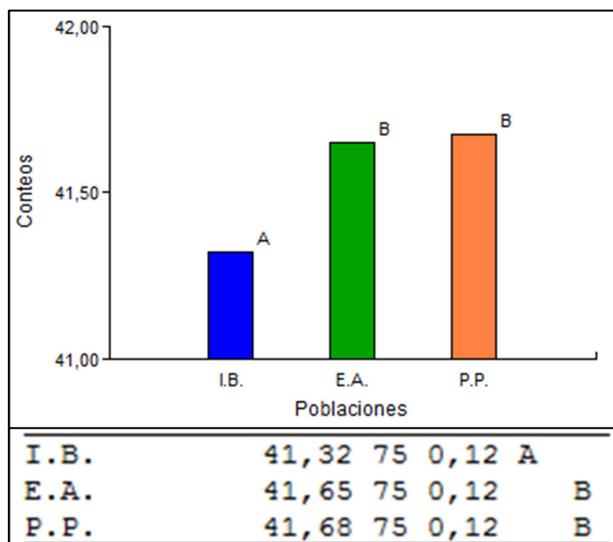


Figura 11: Imagen que ilustra las medias de los conteos cromosómicos de cada población de *Polylepis incana* en el Ecuador.

En la figura 11, se pueden observar las medias de las tres poblaciones analizadas en este estudio 41,32 – El Inga; 41,68 – Papallacta; 41,65 – El Ángel. La figura 12 grafica los promedios de cada punto de las tres poblaciones observadas. Mediante esta imagen podemos observar que la mayoría de los promedios, se encuentran en el intervalo 41 a 42 cromosomas, teniendo solo un promedio, de un punto de una población en el intervalo entre 40 y 41.

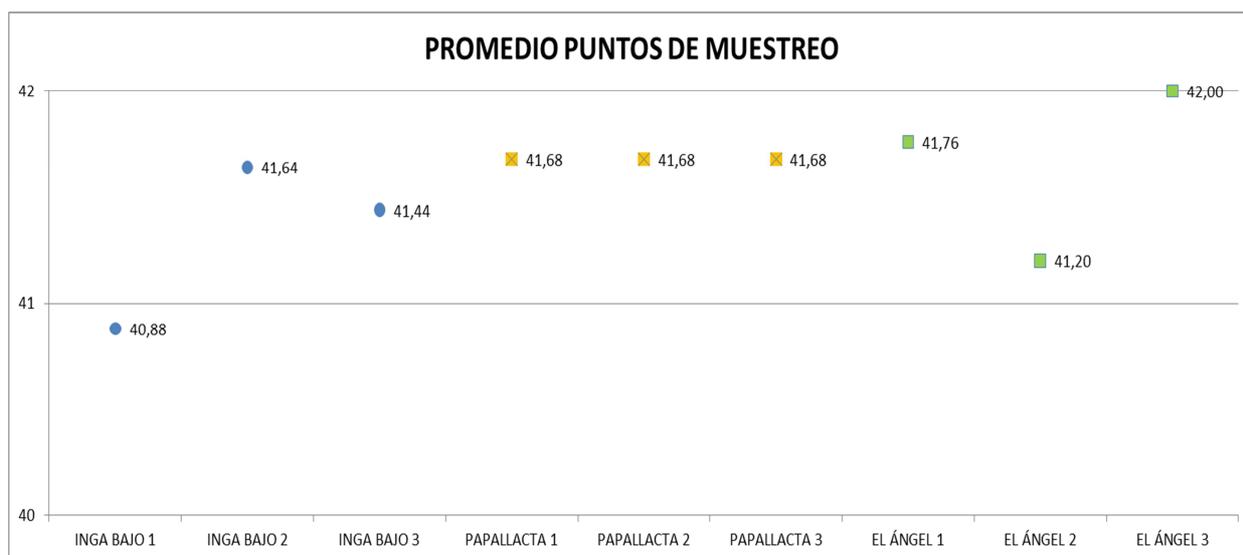


Figura 12: Imagen de promedios de conteos cromosómicos de cada punto de muestreo de las tres poblaciones de *Polylepis incana* en el Ecuador.

Análisis inferencial de datos entre promedios de poblaciones

Se procedió a realizar el análisis de varianza, con el cual se puede verificar si existen diferencias significativas entre la variable dependiente (número de cromosomas) y la variable independiente (poblaciones), utilizando un nivel de significancia de $\alpha = 5 \%$. Se obtuvo un valor $p = 6 \%$, porcentaje mayor a 5% , por lo que debemos aceptar la hipótesis nula H_0 , demostrando que no existen diferencias significativas entre los grupos establecidos A y B por la prueba ANOVA, respecto al número promedio de cromosomas de las poblaciones de los puntos de recolección analizados.

En la población del Inga Bajo el número de conteos que presentan 42 cromosomas son 56 conteos; 41 cromosomas 1 conteo; 40 cromosomas 10 conteos; 39 cromosomas 2 conteos; y 38 cromosomas 6 conteos, dando un total para esta población de 75 conteos. Para la población de Papallacta el número de conteos que presentan 42 cromosomas son 64 conteos; 41 cromosomas 2 conteos; 40 cromosomas 7; 39 cromosomas 0 conteos; y 38 cromosomas 2 conteos, dando un total para esta población de 75 conteos. Para la población de El Ángel el número de conteos que presentan 42 cromosomas son 64 conteos; 41 cromosomas 0 conteos; 40 cromosomas 9 conteos; 39 cromosomas 0 conteos; y 38 cromosomas 2 conteos, dando un total para esta población de 75 conteos (Figura 13).

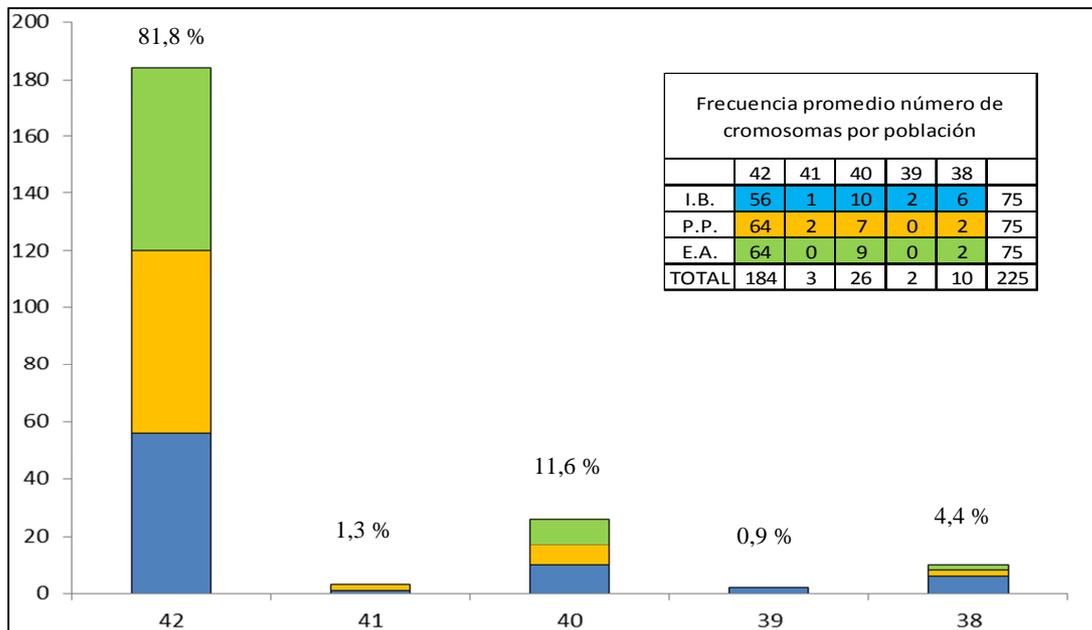


Figura 13: Imagen de la frecuencia de los promedios del número de cromosomas de las tres poblaciones estudiadas, El Inga (I.B.), Papallacta (P.P.) y El Ángel (E.A.) de *Polylepis incana* en el Ecuador.

Es importante destacar que existe mayor número de datos para los conteos que presentan números pares 42, 40 y 38.

IV. DISCUSIÓN

Los bosques de *Polylepis* están considerados como uno de los ecosistemas forestales más amenazados del mundo, (Cierjacks, 2007a; Hensen, *et al.*, 2011a) y es inminente la necesidad de buscar estrategias eficientes para su conservación. Esta especie forma parte de los ecosistemas alto andinos, cumpliendo un rol fundamentalmente a nivel ecológico, creando microambientes, siendo el hábitat de varias especies de flora y fauna y como uno de los reguladores intrínsecos del agua. *P. incana* es la especie con la distribución más extensa en nuestro país, con rango altitudinal, entre 3000 a 5000 metros sobre el nivel del mar (Romoleroux, *et al.*, 1996; Tropicos.org., 2013).

La mayoría de las plántulas colectadas se localizaron cerca de un árbol de la misma especie, probablemente esto se deba a un efecto nodriza del árbol madre, el cual favorece las condiciones de temperatura, humedad y luz para las plántulas (Cierjacks, 2007a). Este comportamiento se ha observado también en otras especies de este género (*P. pauta* y *P. sericea*), (Rada, *et al.*, 2011; Montalvo, 2013).

Para disminuir el impacto de organismos oportunistas como hongos e insectos, se observó que la aplicación de Baczim 5g L⁻¹ de acción sistémica y Captan 5g L⁻¹ de acción por contacto, (Ecuaquímica, 2008), en aspergeos semanales, disminuyeron notablemente la propagación de hongos a nivel foliar y en la superficie del sustrato. En el caso de los insectos, estos se controlaron con el insecticida Sapolio®.

La solución de enraizador Multiraíces® 1ml L⁻¹, fue eficaz para incrementar el número y la calidad de raíces. De acuerdo a estudios anteriores Quijia (2010), las raíces deben presentar una coloración verdosa en la parte apical, un tamaño de 2 cm de largo, un grosor de 1mm de espesor, sin lastimaduras.

Durante la investigación se corroboró la información obtenida por Quijia (2010), donde se determinó que el mejor momento del día para recolectar raíces de *Polylepis* es entre las 7:30 y las 9:30 de la mañana. En el caso de este trabajo, se ratificó que alrededor de las 8:00 y 8:30 era el periodo donde se aumenta la probabilidad de encontrar células en metafase con sus cromosomas condensados, el cual fue punto esencial para el conteo de los mismos.

El pre tratamiento realizado en este estudio, siguió el protocolo de Quijia (2010) y Montalvo (2013). Este pre tratamiento se basa en una disminución de la energía de separación cromosómica, introduciendo agua destilada helada a 4°C y pH 5,8, al sistema de división celular (Orrillo & Bonierbale, 2009).

La adecuada concentración de ácido acético y alcohol en proporción 3:1 y el tiempo de permanencia de la muestra en este líquido fue importante para los resultados esperados (Rodríguez & Portieles, 2003; Quijia, 2010). En el caso del género *Polylepis*, Quijia (2010)

estandarizó estos parámetros a 60°C por 25 minutos, utilizando HCl 1N, los cuales fueron seguidos por Montalvo (2013), en plantas del mismo género, pero de la especie *P. pauta* y *P. sericea*, por lo que se aplicó también a *P. incana*, presentando buenos resultados.

Durante esta investigación se observó que es necesario que el proceso de aplastamiento sea rápido y cuidadoso, ya que el ácido acético junto al Carmín (Acetocarmín), pueden degenerarse y oxidar las muestras, por lo que siempre es necesario, mantener la cadena de frío 4°C, con la ayuda de una termo nevera portátil antes, durante y después de la aplicación de la técnica squash (Quijia, *et al.*, 2010; Montalvo, 2013).

A pesar de la importancia que posee este género para especies de flora y fauna, las poblaciones de *Polylepis* han disminuido de manera alarmante en los últimos 15 años. *Polylepis incana* se encuentra en la Lista Roja de Especies Amenazadas, como Vulnerable, por causa de la quema y tala, para la obtención de carbón vegetal (IUCN, 1998). Se conoce que el 98% de la cobertura original de estos bosques ha ido disminuyendo en el último milenio.

El género *Polylepis*, y la especie *P. incana* presentan una larga historia de procesos de hibridación tanto naturales como mediados por el hombre. Romolerux (1996) describió híbridos entre *P. pauta* y *P. incana*, en Mojanda, Segovia – Salcedo (2006) propone la existencia de híbridos por la introducción de especies foráneas (*P. racemosa*). Entonces es necesario comparar el número cromosómico entre individuos de cada población y entre poblaciones, ubicadas en diferentes localidades, para confirmar el estado citogenético de esta especie.

El número cromosómico obtenido en este estudio confirma un alto nivel de ploidía de la especie *P. incana*. Según Schmidt – Lebuhn y colaboradores (2010), el número básico de cromosomas de este género tendría un valor de $X = 20$, entonces, tomando como base éste número, la especie *incana* estaría en el rango de $(2x)$. Desde el punto de vista de la familia de las Rosáceas, las cuales presentan como número base $X = 7$, entonces se consideraría a la especie *incana* como hexaploide ($2n = 6X$) (Segovia-Salcedo, 2011). Estos niveles de ploidía, indican los cambios generacionales que han ocurrido gracias a la adaptación a nuevas condiciones ambientales (Montalvo, 2013).

Al analizar los porcentajes en relación al número de cromosomas, se obtuvo un 81,8 % de conteos que corresponden a células que poseen 42 cromosomas y un 18,2 % de conteos, que corresponden a células que contienen entre 41 y 38 cromosomas. Los porcentajes más bajos pertenecen a conteos o células que poseen un número de cromosomas impar, 41 (1,3 %) y 39 (0,9 %), mientras que 40 y 38 cromosomas tienen el 11,6 % y el 4,4 % correspondientemente. La tendencia potencial (Figura 13) es clara, por lo que existe una posibilidad mayor al 80% de encontrar 42 cromosomas en conteos que se realicen en células metafásicas de la especie *Polylepis incana*.

V. CONCLUSIONES

Las plántulas muestreadas cerca de semilleros de árboles adultos, se establecieron eficazmente en la zona de aclimatación, cerca de un 72% de supervivencia de estas plantas, formaron la línea base para el desarrollo de este estudio.

La utilización del sustrato en base a turba, tierra negra y cascajo, en proporciones 2 : 1 : 1 correspondientemente, fue eficaz como material nutritivo, de soporte, y además brindó la porosidad necesaria para el crecimiento de las raíces de las plántulas.

El uso de enraizadores tales como: Multiraíces® 1ml L⁻¹, y Activa 1ml L⁻¹, generaron raíces idóneas, en un tiempo entre 2 a 3 meses, desde la fase de muestreo en campo.

La hora establecida para la recolección de las raíces, de las plántulas aclimatadas, fue afirmada en este estudio, las cuales oscilan entre las 7:30 y las 9:30, teniendo como mejor hora de recolección entre las 8:00 a 8:30, en este intervalo de tiempo se obtuvo la mayor cantidad de células en metafase.

Se comprobó que las plántulas de *Polylepis incana*, recolectadas en las tres poblaciones El Inga, Papallacta y El Ángel, no presentaban hibridaciones con otras plántulas, ya que aplicando el método estadístico entre poblaciones no se encontró diferencias significativas con un valor $p = 6\%$, entre sus promedios cromosómicos.

Se determinó el número cromosómico exacto de la especie *Polylepis incana* a partir de muestras de meristemos radicales de tres poblaciones del Ecuador, de las cuales se obtuvo el valor $2n = 42$ cromosomas.

Los conteos cromosómicos nos permitieron diferenciar si existen diferencias entre individuos de un mismo género, los cuales pueden presentar similitudes morfológicas o determinar la existencia de hibridaciones entre especies parentales.

Se corroboró la información generada por varios estudios anteriores, respecto al nivel de ploidía de este género, el cual tiene como número base $X = 7$, lo que nos permitió determinar que la especie *Polylepis incana* es hexaploide.

Se analizó minuciosamente el número de cromosomas de *Polylepis incana* en relación a su distribución geográfica, en lo cual, no se encontró diferencias o variaciones en el citotipaje de esta especie.

Existe una probabilidad mayor al 80% de encontrar 42 cromosomas en conteos que se realicen en células metafásicas de la especie *Polylepis incana*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Cierjacks, A. (2007a). *Environmental and Human Influences on tropical treeline formation: Insights from the regeneration ecology of Polylepis spp. in the Páramo de Papallacta, Ecuador*. Wittenberg: ULB Sachsen Anhalt.
- Cierjacks, A., Salgado, S., Wesche, K., & Hensen, I. (2007). Post-Fire Population Dynamics of Two Tree Species in High-Altitude Polylepis Forests of Central Ecuador. *Biotropica, The Journal of Tropical Biology and Conservation*. Recuperado el 2013, de Wiley online library: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7429.2007.00361.x/abstract>
- Ecuacuímica, C. (2008). *Vademécum Agrícola*. Quito: Edifarm.
- Hedrick, P. (2001). Conservation genetics: where are we now? *TRENDS in Ecology & Evolution*, 629-636.
- Hensen, I., Cierjacks, A., Hirsch, H., Kessler, M., Romoleroux, K., Renison, D., & Wesche, K. (2011a). Historic and recent fragmentation coupled with altitude affect the genetic population structure of one of the world's highest tropical tree line species. *Global Ecology and Biogeography a Journal of Macroecology*, 1-10.
- Hensen, I., Teich, I., Hirsch, H., von Wehrden, H., & Renison, D. 3. (2011b). Range-wide Genetic structure and diversity of the endemic tree line species *Polylepis australis* (Rosaceae) in Argentina. *American Journey of Botany*, 1825 - 1833.
- IUCN. (Enero de 1998). *The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.1*. Recuperado el Noviembre de 2013, de World Conservation Monitoring Centre: <http://www.iucnredlist.org/details/32990/0>
- Kessler, M. (2006). Bosques de Polylepis. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 110-120.
- Kessler, M., & Schmidt-Lebuhn, A. (2006). Taxonomical and distributional notes on *Polylepis* (Rosaceae). *Organism, Diversity and Evolution*, 1-10.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal II*. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Montalvo, J. (2013). *Determinación del número cromosómico de Polylepis pauta y Polylepis sericea presentes en la provincia de Pichincha*. Sangolquí: E.S.P.E.
- Orrillo, M., & Bonierbale, M. (2009). *Biología reproductiva y citogenética de la papa*. Lima: Centro Internacional de la Papa .

- Quijia, P., Segovia-Salcedo, C., Jadán, M., & Proaño, K. (2010). Estandarización de la metodología para el conteo cromosómico en especies del género *Polylepis* en el Ecuador. *Final Revista Ciencias*, 33-49.
- Rada, F., García, C., & Rangel, S. (2011). MICROCLIMA Y PATRONES DE REGENERACIÓN DE *Polylepis sericea* EN UN BOSQUE DEL 'TREELINE' EN LOS ANDES VENEZOLANOS. *Ecotrópicos, Sociedad Venezolana de Ecología*, 113-122.
- Romoleroux, K., Harling, G., & Andersson, L. (1996). *Rosaceae in Flora of Ecuador*. Copenhagen: Rialp.
- Schmidt - Lebuhn, A. N., Fuchs, J., Herte, D., Hirsch, H., Toivonen, J., & Kessler, M. (2010). *An Andean radiation: polyploidy in the tree genus Polylepis (Rosaceae, Sanguisorbeae)*. Zurich: German Botanical Society and The Royal Botanical Society of the Netherlands.
- Segovia-Salcedo, C., Quijia, P., Soltis, D., & Soltis, P. (2012). *Cytogeography of Four Species of Polylepis (Rosaceae) in Ecuador and its Relevance to Conservation of Andean Forests*. Gainesville: University of Florida, Florida Museum of Natural History.
- Segovia-Salcedo, M. C. (2011). Los riesgos de la reforestación de los páramos con especies exóticas: el caso *Polylepis racemosa*. *Propuestas Andinas Páramo*, 1-4.
- Severns, P., & Liston, A. (16 de Septiembre de 2008). *Conservation Science, Policy and Management*. Recuperado el 19 de Septiembre de 2013, de Conservation Science, Policy and Management: onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1523-1739.2008.0158.x/pdf
- Simpson, B. (1979). *A Revision of the Genus Polylepis (Rosaceae: Sanguisorbeae)*. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Tropicos.org., M. B. (11 de Enero de 2013). *Tropicos*. Recuperado el 11 de Enero de 2013, de Tropicos. org. M.B.G.: <<http://www.tropicos.org>>