

# UNIVERSIDAD DE CUENCA



## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

### “RESPUESTA GERMINATIVA DE CUATRO ESPECIES FORESTALES NATIVAS DEL MACIZO DEL CAJAS”

Tesis previa a la obtención  
del título de Ingeniero Agrónomo

#### AUTORES:

Alain JOSEPH  
Jhonny DELVA

#### DIRECTORA:

Ing. Paulina Villena Ochoa Msc.

CUENCA – ECUADOR

2016



## RESUMEN

La semilla es útil para la producción de plántulas con fines de restauración y conservación de germoplasma, asegurando así la sobrevivencia de las especies. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la respuesta germinativa de cuatro especies forestales nativas (*Hedyosmum luteynii*, *Myrcianthes rhopaloides*, *Oreocallis grandiflora*, *Weinmannia fagaroides*) del macizo del Cajas. También caracterizarlas morfológicamente y fisiológicamente. Para este último se realizó una prueba de imbibición para determinar el tipo de testa de estas especies. Además, el tipo de endosperma, ubicación de los embriones y el tamaño de las semillas y de los embriones fue analizado. Adicionalmente, el color de las semillas fue analizado y evaluado. Para evaluar la respuesta germinativa, los siguientes tratamientos fueron aplicados: 1) Estratificación caliente. 2) Estratificación fría. 3) Inmersión en ácido giberélico. 4) Escarificación ácida. Los resultados mostraron que todas las especies presentaron testa permeable. El color de las semillas puede ser utilizada como un indicador de calidad para *H. luteynii* y *O. grandiflora*. Según sus endospermos y embriones *M. rhopaloides* y *O. grandiflora* fueron clasificadas como periférico, *H. luteynii* como lineal subdesarrollado y *W. fagaroides* como lineal totalmente desarrollado. Los tratamientos de estratificación no presentaron diferencias significativas entre sí para la germinación. La inmersión en ácido giberélico produjo germinación con mayores resultados y un número de días hasta la germinación menor que los otros tratamientos. La escarificación ácida produjo germinación con menores resultados que los otros tratamientos. El conocimiento generado en este estudio tendrá una aplicación práctica en los programas de reforestación y conservación.

**PALABRAS CLAVES:** SEMILLA, GERMINACIÓN, DORMANCIA, ESTRATIFICACIÓN, ESCARIFICACIÓN, AG, ESPECIES NATIVAS.



## SUMMARY

Seeds are very useful in plant production for restoration and germplasm conservation purposes. The main goal of this study was to evaluate the germinative response of four native tree species (*Hedyosmum luteynii*, *Myrcianthes rhopaloides*, *Oreocallis grandiflora*, *Weinmannia fagaroides*) from the Cajas Massif. Seed morphology and seed physiology of these species were evaluated, through an imbibition test in order to define seed coat type for each species. Moreover, the type of endosperm, location of the embryos and the size of seeds and embryos were analyzed. Additionally, seed color were evaluated. In order to evaluate the germinative response of the species above-mentioned, the following thermic treatments were applied: 1) Warm stratification. 2) Cold stratification. 3) Immersion in gibberellic acid. 4) Acid scarification. The results showed that all species had permeable seed coat and also the seed color was a positive indicator for germination for *H. luteynii* and *O. grandiflora*. The endosperm and embryos for *M. rhopaloides* and *O. grandiflora* were classified as peripheral from a morphological point of view, *H. luteynii* classified as linear underdeveloped and *W. fagaroides* as linear fully developed. The stratification treatments did not affect the germination rate. Immersion in gibberellic acid caused higher germination rate and reduced the days until germination. The acid scarification produced a low germination in comparison with other treatments. The knowledge generated in this study on native tree species will have an application in reforestation and conservation programs.

**KEYWORD:** SEED, GERMINATION, DORMANCY, STRATIFICATION, SCARIFICATION, GIBBERELIC ACID, NATIVE SPECIES.



## INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	2
SUMMARY .....	3
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....	19
CAPITULO II: JUSTIFICACIÓN .....	20
CAPITULO III: OBJETIVOS .....	22
3.1- OBJETIVO GENERAL .....	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3.3. Preguntas de Investigación.....	22
CAPITULO IV: MARCO TEÓRICO.....	23
4.1. Semilla .....	23
4.1.1. CLASIFICACIÓN DE LAS SEMILLAS SEGÚN SU VIABILIDAD .....	23
4.1.1.1. Semillas latentes .....	23
4.1.1.2. Semillas ortodoxas .....	23
4.1.1.3. Semillas recalcitrantes .....	24
4.1.1.4. Semillas erráticas .....	24
4.3. Germinación .....	24
4.4. Factores que afectan a la germinación. ....	25
4.4.1. Factores extrínsecos .....	25
4.4.2. Factores intrínsecos.....	25
4.4.2.1. El ácido abscísico (ABA).....	25
4.4.2.2. El AG (AG3) .....	25
4.5. Energía germinativa o vigor de germinación.....	¡Error! Marcador no definido.
4.6. Dormancia o dormición .....	26
4.6.1. Dormancia fisiológica.....	27



4.6.2. Dormancia morfológica.....	27
4.6.3. Dormancia morfo-fisiológica .....	27
4.6.4. Dormancia física .....	28
<b>5. CAPITULO V: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
5.1. Ubicación del área de estudio.....	32
5.2. Metodología para la investigación.....	33
5.2.1. Trabajo de campo .....	33
5.2.2. Trabajo de laboratorio .....	33
5.2.2.1. Características morfológicas y fisiológicas de las especies nativas.....	34
5.2.2.1.1. Prueba de imbibición.....	34
5.2.2.1.2. Prueba de viabilidad .....	34
5.2.2.1.3. Caracterización morfológica de las semillas de las cuatro especies nativas.....	34
5.2.2.1.5. Prueba de correlación .....	35
5.2.2.2. Estratificación fría.....	35
5.2.2.2.2. Estratificación caliente.....	35
5.2.2.2.3. Escarificación ácida .....	36
5.2.2.2.3. Inmersión en AG .....	36
5.3. Diseño experimental y análisis estadístico .....	37
<b>CAPITULO VI: RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
6.1. Características morfológicas y fisiológicas de las cuatro especies nativas .....	39
6.1.1. Prueba de imbibición.....	39
6.1.2. Tamaño de las semillas y embriones de las cuatro especies nativas. ....	41



6.1.3. Clasificación de las cuatro especies nativas según sus endospermos y embriones. ....	43
6.1.4. Características de las especies <i>H. luteynii</i> y <i>O. grandiflora</i> según sus colores:.....	44
<i>Las semillas de H. luteynii según sus colores pueden ser clasificadas en:</i> .....	45
6.1.5. Relación entre las variables biométricas de las semillas de <i>O. grandiflora</i> y su germinación:.....	47
6.1.6. Influencia de los tratamientos térmicos en la germinación de las cuatro especies forestales nativas:.....	49
6.1.6.2. Estratificación caliente:.....	50
6.1.7. Influencia del AG3 y el ácido sulfúrico en la germinación de cuatro las cuatro especies forestales nativas.....	52
6.1.7.1. Inmersión en AG <sub>3</sub> al 0.27 g/l (270 ppm).....	52
6.1.7.2. Inmersión en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1%:.....	55
6.1.8. Viabilidad de las cuatro especies forestales nativas: .....	57
6.1.9. Comparación de las cuatro especies nativas y todos los tratamientos. ....	57
<b>CAPITULO VII: DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
7.1. Características morfológicas y fisiológicas de las cuatro especies forestales. ....	59
7.2. Influencia de los tratamientos térmicos en la germinación de las cuatro especies forestales nativas:.....	61
7.3. Influencia del AG y el ácido sulfúrico en la germinación de cuatro las cuatro especies forestales nativas.....	61
<b>CAPITULO VIII: CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>



<b>8.1. Características morfológicas y fisiológicas de las cuatro especies nativas: .....</b>	<b>65</b>
<b>8.2. Influencia de los tratamientos térmicos en la germinación de las cuatro especies nativas: .....</b>	<b>65</b>
<b>8.3. Influencia del AG y el ácido sulfúrico en la germinación de las cuatro especies nativas: .....</b>	<b>66</b>
<b>CAPITULO IX: RECOMENDACIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>CAPÍTULO X: BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>68</b>
<b>CAPITULO XI: ANEXOS .....</b>	<b>75</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1: Descripción de las especies en estudio. ....** ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 2: Descripción de los tratamientos aplicados, con sus respectivos niveles. ....** ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 3: Tamaño (largo y ancho) de las semillas y embriones de las especies *H. luteynii*, *W. fagaroides*, *M. rhopaloides* y *O. grandiflora*:. ....** ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 4: Tipos de embriones con sus respectivas descripciones y la ilustración de los cotiledones y la ubicación de los embriones (Seguir la flecha) de las especies *H. luteynii* (a), *W. fagaroides* (b1: endospermo y b2: embriones), *M. rhopaloides* (c) y *O. grandiflora* (d).. ..** ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 5: Porcentaje de viabilidad para las especies *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*. ....** ¡Error! Marcador no definido.





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de ubicación de la zona de estudio .....	32
Figura 2: Curvas de regresión con intervalo de confianza al 95% para las medias del tiempo y el peso ganado de las semillas de las especies <i>H. luteynii</i> (a), <i>W. fagaroides</i> (b), <i>M. rhopaloides</i> (c) y <i>O. grandiflora</i> (d), n=4. ....	39
Figura 3: Porcentaje de germinación (a, b, c) y los días hasta la germinación (d, e, f) para las especies <i>M. rhopaloides</i> (a, d), <i>O. grandiflora</i> (b, e) y <i>W. fagaroides</i> (c, f) tras la aplicación de una imbibición por 72 horas a las semillas, n=4. ....	41
Figura 4: Ilustración de las semillas vacías del <i>H. luteynii</i> mediante un corte transversal. ....	45
Figura 5: Ilustración de las semillas gris claro (a), naranja amarillo claro (c) y marrón (c) del <i>O. grandiflora</i> .....	46
Figura 6: Porcentaje de germinación (a) y los días hasta la germinación (b) de la especie <i>O. grandiflora</i> para los diferentes colores de las semillas, n=4. ....	46
Figura 7: Relación cuadrática entre el largo de las semillas y los días hasta la germinación para el <i>O. grandiflora</i> (n=50): $Y = 9,62 - 0,12 * x + 1,39E - 3 * x^2$ .....	47
Figura 8: Ilustración de las semillas vacías del <i>H. luteynii</i> .....	48
Figura 9: Porcentaje de germinación (a, b, c) y los días hasta la germinación (d, e, f) para las especies <i>M. rhopaloides</i> (a, d), <i>O. grandiflora</i> (b, e) y <i>W. fagaroides</i> (c, f) tras la aplicación de los distintos niveles de la estratificación fría (Control, 7 días, 14 días, 21 días), n=4.....	50
Figura 10: Porcentaje de germinación (a, b, c) y los días hasta la germinación (d, e, f) para las especies <i>M. rhopaloides</i> (a, d), <i>O. grandiflora</i> (b, e) y <i>W. fagaroides</i> (c, f) tras la aplicación de los distintos niveles de la estratificación caliente (Control, 30°C, 50°C, 80°C), n=4. ....	52
Figura 11: Porcentaje de germinación (a, b, c) y los días hasta la germinación (d, e, f) para las especies <i>M. rhopaloides</i> (a, d), <i>O. grandiflora</i> (b, e) y <i>W. fagaroides</i> (c, f) tras la aplicación de los distintos niveles de la inmersión en AG <sub>3</sub> , n=4. ....	54
Figura 12: Porcentaje de germinación (a, b, c) y los días hasta la germinación (d, e, f) para las especies <i>M. rhopaloides</i> (a, d), <i>O. grandiflora</i> (b, e) y <i>W. fagaroides</i> (c, f) tras la aplicación de los distintos niveles de la inmersión en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Control, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos), n=4. ....	56



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1: Semillas de las cuatro especies nativas. ....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo 2: Embriones de las cuatro especies nativas. ....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo 3: Semillas de <i>O. grandiflora</i> y embriones de <i>W. fagaroides</i> después de la prueba de tetrazolio.....</b>	<b>76</b>
<b>Anexo 4: Germinación de las especies <i>M. rhopaloides</i>, <i>O. grandiflora</i> y <i>W.</i> <i>fagaroides</i>. ....</b>	<b>77</b>
<b>Anexo 5: Ilustración de la selección aleatoria de las 50 semillas para la prueba de correlación.....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo 6: Ilustración de medición de semillas mediante el programa INFINITY ANALIZE 1.....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo 7: Gráfico comparativo de las medias de la germinación de las cuatro especies nativas por tratamiento.....</b>	<b>80</b>
<b>Anexo 8: Gráficos comparativos de las medias de la germinación y tiempo hasta la germinación por tratamiento para las especies <i>M. rhopaloides</i>, <i>O.</i> <i>grandiflora</i> y <i>W. fagaroides</i>. ....</b>	<b>81</b>



## CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Alain JOSEPH autor de la tesis **“RESPUESTA GERMINATIVA DE CUATRO ESPECIES FORESTALES NATIVAS DEL MACIZO DEL CAJAS”** certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son exclusiva responsabilidad del autor.

Cuenca, diciembre, 2016.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Alain Joseph", written over a horizontal line.

Alain JOSEPH



## CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Jhonny DELVA autor de la tesis “**RESPUESTA GERMINATIVA DE CUATRO ESPECIES FORESTALES NATIVAS DEL MACIZO DEL CAJAS**” certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son exclusiva responsabilidad del autor.

Cuenca, diciembre, 2016.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jhonny Delva', written over a horizontal line.

Jhonny DELVA



## DERECHOS DEL AUTOR

Yo, Alain JOSEPH autor de la tesis “**RESPUESTA GERMINATIVA DE CUATRO ESPECIES FORESTALES NATIVAS DEL MACIZO DEL CAJAS**” reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su reglamento de propiedad intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Agrónomo. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, diciembre ,2016.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alain Joseph', written over a horizontal line.

Alain JOSEPH



## DERECHOS DEL AUTOR

Yo, Jhonny DELVA autor de la tesis “**RESPUESTA GERMINATIVA DE CUATRO ESPECIES FORESTALES NATIVAS DEL MACIZO DEL CAJAS**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su reglamento de propiedad intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Agrónomo. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, diciembre ,2016.

Jhonny DELVA



## DEDICATORIA

*A mi hermano Fred JOSEPH quien este proyecto es el resultado de su gran amor y su fe indestructible en mí.*

*A mi madre Fania SAINT-PREVIL, a mi padre Arnous JOSEPH y a mis hermanos Slande JOSEPH, Aviole JOSEPH, Junie JOSEPH y Violette JOSEPH que son la esencia de mi vida.*

*A mis sobrinos, mi ahijada Jade Ashley METELLUS, Luz Camila Juliana Guerrero López y Nahira Thamar Guerrero López.*

Alain JOSEPH



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por su amor y bendiciones, para los cuales nunca habrá palabras para describir su bondad. A la Universidad de Cuenca, en particular al Dr. Manuel Soria P., quien a pesar de que no dominaba el idioma confió en mí y me dio esta oportunidad para que hoy pueda lograr una meta de ser profesional. No puedo olvidar a la Dra. María Estela Encalada P., Cecilia Yolanda Farfán V., Mónica Mendoza del Pilar e Iván Muñoz Á., quienes me guiaron y me ayudaron a adaptarme en este hermoso país. A mi familia por el apoyo, la motivación y el amor constante que me han brindado. A mi hermano Fred JOSEPH que ha sido más que un hermano sino una fuente de energía y de motivación inagotable. A mi directora Ing. Paulina Germania Villena O. quien puso su conocimiento, su tiempo, su paciencia y toda su energía para la realización de este proyecto. A PhD Ximena Palomeque P., responsable del laboratorio de semillas, quien a más de su dedicación y sus consejos, fue una fuente de motivación, de confianza y una guía imprescindible. A todo el personal del centro de Agroforestería y Manejo del Paisaje quienes con sus consejos, críticas constructivas, experiencia y solidaridad contribuyeron en la realización de este proyecto. A la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC), quien financió esta tesis dentro del proyecto: “Efectos del cambio climático en la capacidad germinativa de semillas y producción de plántulas de especies forestales nativas andinas en la provincia del Azuay”. Al PhD Javier Aguirre de J. y Andrea Maza L. quienes colaboraron en este proyecto, invirtiendo su tiempo y conocimiento.

Alain JOSEPH





## DEDICATORIA

*Con todo mi amor y cariño dedico el presente trabajo de investigación a **Dios** quien es el único dueño de nuestra vida y destino.*

*A mis padres **Dufresne DELVA** y **Véronique Merzier** por su infinito amor, quienes a lo largo de su vida han velado por mi bienestar y educación, siendo mi apoyo en todo momento, depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba, sin dudar ni un solo momento en mi capacidad.*

*A mis hermanos/as: Venise, Losida, Patricia, Katia, Odlin, Wideline, Dina, Jenny y Janesley por su gran sencillez, confianza y colaboración quienes transitan conmigo por las sendas de la vida en busca de nuevas aspiraciones que de una u otra forma me ayudaron a cumplir todas mis metas propuestas,*

*A mis primos y demás familiares por su apoyo incondicional.*

Jhonny.



## AGRADECIMIENTO

En primer lugar quiero agradecer a Dios, el ser que me ilumina y me da fuerza para seguir adelante.

A mis padres y hermanos por siempre brindarme su confianza, paciencia, apoyo, comprensión y llenar mi vida de amor y felicidad.

Mis sinceros agradecimientos a toda la comunidad Universitaria de la Universidad de Cuenca.

A mi directora de tesis, la Ing. Paulina Villena, por su valioso apoyo y orientación en la ejecución del trabajo.

A todo el personal del Centro de Agroforestería y Manejo del Paisaje especialmente a la Dr. Ximena Palomeque por su constante apoyo en la realización del presente trabajo.

Mis más sinceros agradecimientos a mi compañero de tesis, amigo sobre todo hermano de alma Alain JOSEPH en los malos y buenos momentos por brindarme su paciencia, apoyo, amistad y dedicación incondicional.

También agradezco a todos mis compañeros y amigos de la carrera de Ingeniería Agronómica con quienes compartí las aulas universitarias.

Jhonny.



## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La semilla, mediante la germinación, es la mejor forma de propagación de las especies vegetales. Es útil para la producción de plántulas para la restauración y conservación de germoplasma; asegurando así la sobrevivencia de las especies y biodiversidad en la naturaleza (Vázquez et al. 1997; Molina, 2001). La propagación por semillas genera una mayor diversidad en la naturaleza debido a su composición genética única (Schmidt, 2000). Esto incide en una mayor resistencia de las plantas a plagas y enfermedades (Moreno, 1996; Schmidt, 2000). Sin embargo, en algunas especies la corta viabilidad, la dormancia, entre otros problemas de manejo, limitan la utilización de estas especies en programas de restauración como reforestación (Schmidt, 2000).

Es importante mencionar que la dormancia fisiológica es la más corriente en la naturaleza. Está presente en las gimnospermas y en la mayoría de los grupos de angiospermas (Baskin & Baskin, 2004; Gimeno, 2009). Mientras que la dormancia física está presente en mínimo 18 familias de angiospermas (Baskin & Baskin, 2014).

En el Ecuador, a pesar de que las semillas forestales constituyen el núcleo de la forestación y reforestación, son muy poco estudiadas (Prado et al. 2010). Por lo tanto, la información técnica y científica sobre especies forestales nativas de interés y árboles semilleros son restringidas (Prado et al. 2010). Aun así, visto desde la perspectiva sostenible, los recursos forestales representan parte de la estabilidad ecológica del país (Silvia, 2010). En este sentido, Prado et al. (2010) manifiestan la necesidad de que los usuarios tengan un mayor acceso a la información técnica y científica acerca de las especies nativas según sus intereses. Ante eso se evidencia la necesidad de integrar más investigación en caracterización, evaluación, conservación, uso y manejo de especies forestales nativas.



## CAPITULO II: JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la degradación de los ecosistemas y la pérdida de biodiversidad se incrementan considerablemente. Esto es efecto de los incendios, la extensión de la frontera agrícola, la ganadería y la explotación irracional de los bosques por la industria maderable (Silvia, 2010; Guerrero & Luzón, 2012; Salinas, 2013).

Si bien es cierto, las semillas son una forma de propagación y contribuyen en la regeneración natural, también albergan una gran riqueza genética, resultante de la mezcla de los materiales genéticos parentales (Schmidt, 2000). Esta variación genética de las plántulas, potencia su adaptación ecológica en diferentes hábitats (Schmidt, 2000).

En algunas especies, las semillas generalmente se producen en grandes cantidades y están fácilmente disponibles cada año o en periodos más largos (Schmidt, 2000). Son generalmente pequeños paquetes concentrados de las plantas que contienen los nutrientes para el establecimiento de las plántulas (Schmidt, 2000). Incluso, las semillas generalmente son mucho más resistentes a los daños y estrés ambiental que la propagación vegetativa, a excepción de las semillas recalcitrantes (Schmidt, 2000). Estas últimas son susceptibles a ser almacenadas por largos periodos (Schmidt, 2000).

Por otro lado, la multiplicación y propagación de las semillas se ve limitada tanto por factores bióticos, por ejemplo, infestación por hongos y depredación por insectos (González et al. 2013). También se limita por factores fisiológicos presentes en las semillas, como por ejemplo, los diferentes tipos de dormancia (Baskin & Baskin, 2004; Courtis, 2013). González et al. (2013) analizaron la germinación, infestación y viabilidad de semillas de bellotas (fruto-semilla) en *Quercus polymorpha* (Schltdl. & Cham.) almacenadas por un año. En efecto, los resultados revelaron que el 70% de las bellotas fue infestado por insectos antes de su almacenamiento y el 20% de la viabilidad de las bellotas se perdió por factores fisiológicos. Por otra parte, los periodos pre-germinativos prolongados y



el bajo porcentaje de germinación que presentan algunas especies constituyen un limitante fundamental para la propagación de las especies forestales.

Por otra parte, el Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE, 2012) indica que en el transcurso de 2000-2008, la deforestación anual era de 77.647 ha/año; de las cuales, 1.058 ha se encontraron en la provincia del Azuay. En atención a la problemática expuesta, el Ministerio del Ambiente mediante diferentes programas; como por ejemplo, “Mi Bosque Del Futuro”; trata de recuperar las áreas degradadas; sembrando especies nativas (MAE, 2016). Estas últimas que no solo contribuyen en la conservación de sí misma y su diversidad genética, sino también son menos invasivas y corresponden mejor a las preferencias del pueblo local que las especies exóticas (Thomas et al. 2014). Una de las limitantes en el Ecuador es que la información técnica y científica sobre especies forestales nativas de interés y árboles semilleros son restringidas (Prado et al. 2010).

La información generada en este estudio podría ser utilizada por diferentes instituciones como el Ministerio del Ambiente (MAE), Empresa Pública Municipal De Telecomunicaciones, Agua Potable, Alcantarillado Y Saneamiento (ETAPA), agricultores, viveristas e investigadores, con interés en la propagación sexual de especies nativas y en la producción de plántulas de calidad para realizar actividades de restauración, rehabilitación, implementación de sistemas agroforestales, entre otros.



## CAPITULO III: OBJETIVOS

### 3.1- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta germinativa de cuatro especies forestales nativas (*H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*) del macizo del Cajas.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las características morfológicas (color, tamaño, tipos de testa, tipos de embriones) y fisiológicas (germinación, día hasta la germinación, dormancia) de las semillas de cuatro especies forestales nativas (*H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*) del Macizo del Cajas.
- Evaluar el porcentaje y tiempo hasta la germinación de cuatro especies forestales a diferentes tiempos de exposición a tratamientos térmicos, ácido sulfúrico y ácido giberélico.

### 3.3. Preguntas de Investigación

- a. ¿Cuáles son las características morfológicas y fisiológicas de las semillas de *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*?
- b. ¿Hay diferencias entre los tratamientos térmicos en la germinación de semillas de *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* a diferentes tiempos de exposición?
- c. ¿Hay diferencias entre los tratamientos ácido sulfúrico y ácido giberélico en la germinación de *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* a diferentes tiempos de exposición?



## **CAPITULO IV: MARCO TEÓRICO**

### **4.1. Semilla**

Es la unidad, producida por el desarrollo y la maduración del ovulo fecundado de una gimnosperma o angiosperma (Courtis, 2013). También se la conoce como la entidad de dispersión y perpetuación de la mayoría de las especies vegetales y la culminación de la evolución de las especies (Courtis, 2013).

La viabilidad es una de las principales características de una buena semilla (Romero & Nieto, 1999). Según estos últimos autores se considera como viable aquella semilla que está viva y que es capaz de germinar y producir una plántula normal. Hoy en día, existen diversas pruebas para determinar la viabilidad de un lote de semillas, tales como: la prueba de corte, de tetrazolio, de rayos X, escisión de embriones y peróxido de hidrogeno (Schmidt, 2000). De estas pruebas, la de tetrazolio es la más difundida (Schmidt, 2000). Hay que tener presente que la prueba de viabilidad es generalmente menos aplicable en semillas diminutas como las del eucalipto donde y la prueba por escisión de embriones es prácticamente imposible (Schmidt, 2000).

#### **4.1.1. CLASIFICACIÓN DE LAS SEMILLAS SEGÚN SU VIABILIDAD**

##### **4.1.1.1. Semillas latentes**

Son aquellas que necesitan ser almacenadas durante un periodo de tiempo para que el embrión complete su madurez fisiológica, no suelen germinar al ser sembradas inmediatamente después de ser extraídas del fruto (Iñiguez, 2008). Se pueden almacenar por varios meses hasta años (Iñiguez, 2008).

##### **4.1.1.2. Semillas ortodoxas**

Son aquellas que pueden secarse a niveles de humedad relativa entre 10 y 25%(FAO, 2014). Se pueden almacenar a baja humedad relativa y bajas temperaturas, 15% y -18°C generalmente, por periodos muy largos (FAO, 2014).



#### 4.1.1.3. Semillas recalcitrantes

Son aquellas que no toleran a la desecación y no se secan en las últimas etapas de desarrollo, permitiendo un rango de 0.3 – 4 gg<sup>-1</sup> de su contenido de agua (FAO, 2014). La pérdida de agua se traduce rápidamente en una disminución de vigor y viabilidad, y la muerte de las semillas con un contenido de agua relativamente alto (FAO, 2014). Según Walters et al. (2014) la única opción de conservar germoplasma de las semillas recalcitrantes por largo plazo es la criopreservación, que implica almacenar el germoplasma en líquido nitrogenado a una temperatura extremadamente baja (-196°C).

#### 4.1.1.4. Semillas erráticas

Son aquellas que no presentan una germinación uniforme bajo ningún tratamiento. Generalmente, estas semillas provienen de bosques secos y algunas de ellas pueden germinar a los pocos días. Mientras que las otras semillas pueden demorar desde semanas hasta meses para germinar (Iñiguez, 2008).

### 4.3. Germinación

Según la Asociación Internacional de Análisis de Semillas (ISTA, 2007), la germinación de una semilla es la aparición y el desarrollo de las estructuras esenciales de una plántula reflejan su capacidad de desarrollarse en una planta normal en condiciones favorables en suelo. Este proceso lleva a cabo mediante 3 etapas:

- **Fase I (Imbibición):** es la fase inicial de la germinación, en la cual la semilla embebe agua (Nonogaki et al. 2010; Zahia, 2014). Está fase va acompañada de una elevación de la intensidad respiratoria (Zahia, 2014).
- **Fase II:** conocida como la germinación stricto sensu, esta fase se caracteriza por la estabilidad de la hidratación (Nonogaki et al. 2010) y de la respiración a un nivel elevado. Durante esta fase, la semilla puede ser, reversiblemente,





deshidratada y rehidratada sin sufrir daño aparente en su viabilidad. Se termina con la emergencia de la radícula fuera de los tegumentos seminales (Zahia, 2014).

- **Fase III:** está caracterizada por reanudar la absorción de agua y un incremento del consumo de oxígeno, corresponde al proceso de crecimiento de la radícula y del tallo, debido a la división mitótica y la expansión de las células (Nonogaki et al. 2010; Zahia, 2014).

#### **4.4. Factores que afectan a la germinación.**

##### **4.4.1. Factores extrínsecos**

Son los factores externos, propios del ambiente en lo cual se encuentra la semilla, entre los cuales se encuentran la humedad, la temperatura, el oxígeno, etc. (Romero & Nieto, 1999).

##### **4.4.2. Factores intrínsecos**

Son los factores internos, aquellas que son propias de la semilla. Dentro de estos factores se encuentran: embrión fisiológicamente inmaduro, fitohormonas (ácido abscísico, etileno, y las giberelinas, principalmente), presencia de tegumentos duros, viabilidad, etc. (Courtis, 2013).

##### **4.4.2.1. El ácido abscísico (ABA)**

Conocido como regulador de crecimiento, el ABA controla la maduración de las semillas y es responsable de la inducción y el mantenimiento de la dormancia primaria (Courtis 2013). Esta última que impide que el embrión pase directamente de la embriogénesis a la germinación, por lo tanto el ABA es considerado como el supresor de la germinación (Gimeno, 2009; Courtis 2013).

##### **4.4.2.2. El ácido giberélico (AG)**

Es de mucha importancia en la fisiología de las semillas e indispensable para la germinación, por ser el principal precursor de esta junto con el etileno, a más de tener una acción antagónica al ABA. Es así que la dormancia fisiológica de una



semilla depende del ratio entre de ABA y el AG<sub>3</sub> (Baskin & Baskin, 2004; Gimeno, 2009).

Chen et al. (2007) demostraron que el contenido de ABA influye en la ruptura de la dormancia y la germinación, analizando y cuantificando los contenidos de ABA y AGs en semillas de *Prunus campanulata*. En efecto, los resultados revelaron que la concentración del ABA en las semillas o los tejidos embrionarios disminuyen durante la estratificación fría y/o caliente. Además, el contenido de ABA era aproximadamente 6 a 12 veces menor que en las semillas recién colectadas.

En este contexto, los mismos autores demostraron que la estratificación caliente-más-fría disminuye la concentración del ácido abscísico en la testa, el endocarpio y el embrión y al mismo tiempo estimula la dormancia. De hecho, la concentración del ABA era de 183 pg, 665 pg, y 416 pg en la testa, el endocarpio, y el embrión de las semillas germinadas, respectivamente. En cuanto a las semillas germinadas, la concentración del ABA estaba todavía más bajo: 183 pg en la testa, 665 pg en el endocarpio y 416 en el embrión. Por ende, obtuvieron unos porcentajes de germinación inferior a 3% en semillas recién colectadas y de 99% en semillas estratificadas, lo que sugiere que bajos contenidos de ABA puede mejorar la germinación.

Cabe precisar que el contenido de ABA encontrado en este estudio era aproximadamente 5 veces mayor que el nivel de AGs (1520 pg de ABA vs 289 pg de AGs). Por otro lado, reportaron que la aplicación de 10  $\mu$ M de ABA previene totalmente la germinación en *Prunus campanulata*.

#### **4.6. Dormancia o dormición**

La dormancia es una estrategia adaptativa desarrollada por la planta para que la germinación se produzca cuando las condiciones ambientales son óptimas (Courtis, 2013). Esto facilita la dispersión de las semillas de las especies vegetales del grupo de las espermatofitas (Courtis, 2013). La dormancia es también, la incapacidad de una semilla viable para germinar, a pesar de que las



condiciones ambientales son favorables (Baskin & Baskin, 2004; Gimeno, 2009). Existen varios tipos de dormancia como se describen a continuación.

#### **4.6.1. Dormancia fisiológica**

La dormancia fisiológica es la más corriente en la naturaleza (Baskin & Baskin, 2004; Gimeno, 2009). Está presente en las gimnospermas y en la mayoría de los grupos de angiospermas (Baskin & Baskin, 2004; Gimeno, 2009). Este tipo de dormancia está caracterizada por la presencia de inhibidores fisiológicos en la semilla, principalmente el ABA (Baskin & Baskin, 2004; 2014). Existen tres niveles de dormancia fisiológica: no-profundo, intermedio y profundo (Baskin & Baskin, 2004; 2014). Pues, las semillas dormancia fisiológica varían con respecto a la resistencia del mecanismo de inhibición fisiológica, respuesta al  $AG_3$  y los requerimientos para romper la dormancia (Baskin & Baskin, 2014).

#### **4.6.2. Dormancia morfológica**

Ocurre cuando el embrión de la semilla no alcanza su madurez completa (embrión subdesarrollado) (Baskin & Baskin, 2004; 2014). Sin embargo, el embrión está diferenciado, es decir que los cotiledones, hipocótilo y radícula pueden ser distinguidos (Baskin & Baskin, 2004). Los embriones en las semillas con dormancia morfológica no son fisiológicamente dormidos y no requieren de un pretratamiento para romper la dormancia. Por ende, solo necesitan tiempo para crecer hasta su tamaño completo y luego germinar (Baskin & Baskin, 2004).

#### **4.6.3. Dormancia morfo-fisiológica**

Presencia de la dormancia morfológica y fisiológica de forma combinada (Baskin & Baskin, 2004; 2014). Este tipo de dormancia ocurre en las semillas diferenciadas con embrión diferenciado como lineal subdesarrollado, rudimentario o espátula en forma (Baskin & Baskin, 2014). En general, dos cosas deben pasar antes de que las semillas las semillas pueden germinar: 1) el embrión debe crecer dentro de la semilla hasta un tamaño crítico, y 2) se debe romper la dormancia fisiológica del embrión (Baskin & Baskin, 2014). En el primer



caso, se requiere un periodo de tiempo considerablemente más largo que en las semillas con dormancia morfológica (Baskin & Baskin, 2004).

#### 4.6.4. Dormancia física

Este tipo de dormancia esta inducida por una o más capas impermeables al agua de las células de palizadas en la cubierta de la semilla o del fruto (Baskin & Baskin, 2004; 2014). Está presente en mínimo 18 familias de angiospermas (Baskin & Baskin, 2014). Generalmente, este tipo de dormancia se rompe bajo condiciones tanto naturales como artificiales, excepto la escarificación mecánica (Baskin & Baskin, 2004).

Frente a la dormancia existen tratamientos que permiten romper la dormancia para acelerar el proceso germinativo, de los cuales algunos han dado muy buenos resultados. Por ejemplo, en un estudio de la propagación de *Myrcianthes coquimbensis* a través semillas y esquejes, realizado en Chile por Saldías y Velozo (2014) se reportaron que la aplicación de AG<sub>3</sub> a una concentración de 15 g/l, permitió incrementar la germinación de alrededor del 48% a 68.25%.

Por otra parte, estudios realizados en Chile por Quiroz et al. (2009) demostraron que la germinación en *Weinmannia trichosperma* fue de 33% bajo la aplicación de AG a una concentración de 250 ppm por un tiempo de remojo de 3 horas.

En el Ecuador, Espinoza (2008) en su investigación denominada "Análisis de calidad y comportamiento de semillas de lupina (*Cytisus monspensulanus*) en distintas comunidades de Chimborazo"; reveló que los porcentajes de germinación no superaron el 42.75%. Resultados obtenidos con la aplicación de AG que es un estimulante de la germinación. De la misma manera, en un ensayo de evaluación de la propagación sexual de las especies forestales; *Psidium guajava*, *Piptocoma discolor*, *Ochroma pyramidale* y *Croton lechleri* bajo invernadero, en la provincia Zamora Chinchipe (Ecuador) realizado por Salinas (2013); han obtenido porcentajes muy bajos en *Piptocoma discolor* y *Croton*



*lechleri*, siendo 3.75% y 1.75% respectivamente. Algo similar ocurrió con Guerrero y Luzón (2012) en la misma provincia; donde obtuvieron resultados de germinación de 5% y 3.25% para *Alnus acuminata* para las semillas recién colectadas y almacenadas, respectivamente. Mientras que para *Croton lechleri* los resultados en semillas recién colectadas y almacenadas al ambiente fueron de 0%. Según los autores de ambos experimentos (Chimborazo y Zamora Chinchipe), la baja y nula germinación del *Croton lechleri* se debe, probablemente, a la falta de madurez fisiológica de las semillas (semillas sin embrión) por un lado. Por otro lado a la falta de desarrollo de los embriones, también conocido como dormancia morfológica (Baskin & Baskin, 2004, 2014).

Otro tratamiento que se ha utilizado también, es la estratificación fría, la cual consiste en mantener las semillas a temperaturas entre 4 y 10°C. Con este último, han alcanzado germinación de 96% en las especies Roble (*Nothofagus obliqua*) y Raulí (*Nothofagus nervosa*) después de estratificación en arena húmeda entre 3 y 5°C por 90 días (Quiroz et al. 2009).

Al respecto, Baskin y Baskin (1988) indican que la temperatura es el primer factor ambiental que regula la germinación por su papel decisivo en la ruptura de la dormancia. Este proporciona a la mayoría de las especies un periodo de frío invernal (5°C temperatura óptima para la mayoría de las especies), antes de la germinación, o para incrementar la tasa de germinación en primavera (Baskin y Baskin, 1988). Por consiguiente, mejora la permeabilidad de la testa en las semillas con dormancia física (Baskin y Baskin, 1988). En el caso de la dormancia fisiológica se requiere bajas o altas temperaturas para romper la dormancia y en caso de la dormancia morfofisiológica temperaturas frías (Baskin & Baskin, 1988).

Estudios realizados en Ecuador con especies forestales nativas en Riobamba, Quishpe (2009) probó la estratificación en agua a 50°C por 80 minutos en arupo (*Chionanthus pubescens* kunth). Los resultados demostraron que el tiempo de



germinación disminuyó de 110 días a 32 días y el porcentaje de germinación incrementó de 50.67% (control) a 84.67%.

Por otra parte, Jiménez (2013) reportó que en *Hesperomeles ferruginea* el mejor resultado que se ha encontrado fue mediante la extracción de los embriones con un 94%. Estos resultados fueron superiores a los tratamientos por inmersión en agua destilada por 7 días con 4.67% de germinación. La escarificación mecánica (Lijado y corte de las puntas de las semillas) y el testigo, ambos con 8.67% de germinación. En cuanto a los tratamientos de escarificación con ácido sulfúrico al 10%, estratificación con agua hervida y la estratificación a 4°C los resultados de germinación fueron nulos.

Otro aspecto importante que limita la propagación por semillas son los periodos pregerminativos prolongados. Como es el caso del *Croton lechleri* que inició su germinación a los 84 días, aun cuando se sometió a tratamientos estimulantes de germinación (Salinas, 2013); en *Myrcianthes coquimbensis* se evidenció germinación a los 90 días después de la siembra con un 51% de germinación en verano y 29% de germinación en invierno (Saldías & Velozo, 2014); en *Prunus campanulata* a los 112 días (16 semanas) el porcentaje de germinación fue inferior a 3% (Chen, et al. 2007); en *Myrica rubra* se registró 31.3% de germinación a los 140 días (20 semanas) (Chen, et al. 2008); *Sphaeralcea munroana* a los 180 días (6 meses) alcanzó la máxima germinación (93%) con tratamientos pregerminativos con temperaturas frías y calientes (Kildisheva et al. 2011); de ahí que, superar todas estas restricciones constituye un gran desafío para la ciencia.

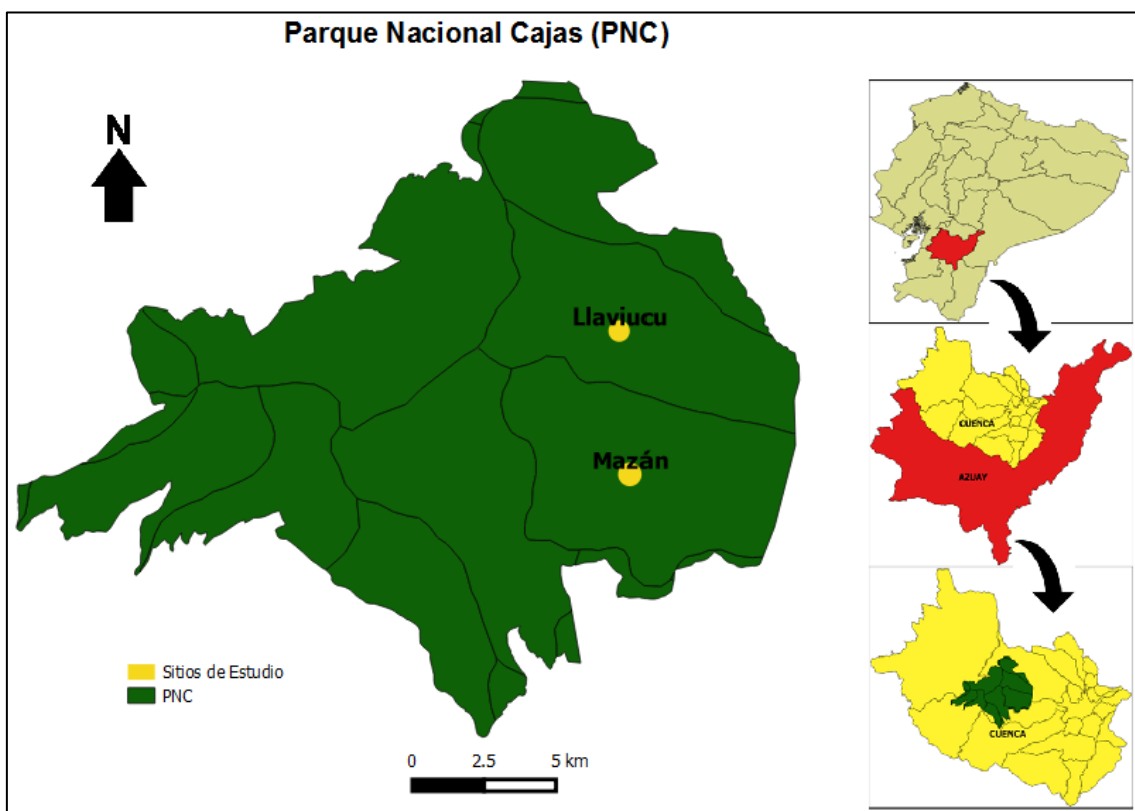
**Tabla 1: Descripción de las especies en estudio.**

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre vulgar</b>	<b>Descripción</b>
<b><i>Hedyosmum luteynii</i></b>	Borracho	Son árboles de 14 m de altura, con un diámetro mayor a 30 cm. Esta especie se encuentra en los bosques andinos, en lugares bien conservados y con pendientes poco pronunciadas. En el Ecuador esta distribuida en un rango altitudinal entre 2500 a 4000 m s.n.m (GAD Parroquial Octavio Cordero Palacios, s.f.; Castillo, 2013).
<b><i>Myrcianthes rhopaloides</i></b>	Arrayán	Son árboles de alrededor de 10 m de alto, sus hojas son totalmente glabras y su forma varia de elíptica a abovada u ovada. Es un árbol nativo de la región andina, distribuido entre los 2000 y 3000 m s.n.m. Su madera se utiliza en la construcción de casas, se usa para la leña, mientras que sus hojas se usan con fines medicinales para aliviar dolor de estómago, de garganta y para el resfrío (Fontenla, 2006).
<b><i>Oreocallis grandiflora</i></b>	Gañal	Llamado vulgarmente gañal, el <i>O. grandiflora</i> se encuentra en la zona andina del Perú y Ecuador entre un rango altitudinal de 1500 a 4000 m s.n.m.; se trata de un arbusto de 5-7 m de altura y su tallo mide 20 cm de diámetro, con una corteza externa agrietada de color grisáceo y su corteza interna de color blanquecino (Reynel & Marcelo, 2009; Delgado, 2013).
<b><i>Weinmannia fagaroides</i></b>	Sarar	Conocido comúnmente como sarar, el <i>W. fagaroides</i> es una especie típica del Ecuador. Se trata de un árbol de 1 a 10 m de alto, con tallo diminuto y denso o moderadamente puberulento o glabro con la edad. Está distribuido de Honduras, Costa Rica hasta Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia, creciendo en bosques secundarios, robledales, márgenes de páramos, áreas de vegetación subpáramosa, entre los 2200-3300 m s.n.m. (Morales, 2010).

## 5. CAPITULO V: MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Ubicación del área de estudio

Este experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Semillas de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, ubicada a 2590 m s.n.m. con una temperatura ambiental entre 15-17 °C y una precipitación de 878 mm. Las semillas de las especies en estudio (*H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*) fueron recolectadas dentro de los bosques de Mazán y Llaviucu (Figura 1), ambos ubicados en el macizo del Parque Nacional Cajas. Cabe indicar que este estudio se realizó dentro del proyecto de investigación “Efectos del cambio climático en la capacidad germinativa de semillas y producción de plántulas de especies forestales nativas andinas en dos bosques de la provincia del Azuay”.



**Figura 1:** Mapa de ubicación de la zona de estudio

(Elaborado por: Joseph & Delva, 2016)





## **5.2. Metodología para la investigación**

Esta investigación se llevó a cabo en dos fases: una de campo y otra de laboratorio.

### **5.2.1. Trabajo de campo**

Los frutos fueron colectados de individuos que están distribuidos ampliamente en los bosques de Mazán y Llaviucu dentro de su periodo de fructificación y su estado de madurez. Cabe mencionar que las especies son las mismas en los dos sitios donde la recolección de los frutos se inició en noviembre del 2015 hasta marzo del 2016.

### **5.2.2. Trabajo de laboratorio**

Una vez que los frutos fueron colectados, estos fueron transportados al laboratorio de semillas de la FCCAA, donde las semillas fueron extraídas para el análisis y proceder a los experimentos.

Es importante señalar que todas las semillas fueron sometidas a un mismo protocolo de desinfección estandarizado y aplicado en el laboratorio de Semillas, previo a la siembra, como se describe a continuación:

Las semillas fueron lavadas en agua corriente por 3 a 10 minutos, luego, se colocaron 3 a 8 gotas de jabón líquido, dependiendo del tamaño de la semilla y se las removió para que se homogenice el jabón. A continuación las semillas fueron nuevamente lavadas con agua corriente para eliminar el exceso de jabón y luego con agua destilada. Adicionalmente, fueron colocadas con alcohol por uno a cinco minutos dependiendo del tamaño de las semillas y, por último se enjuagaron con abundante agua destilada.



### **5.2.2.1. Características morfológicas y fisiológicas de las especies nativas.**

#### **5.2.2.1.1. Prueba de imbibición**

Con el propósito de determinar si las especies antes mencionadas tienen testa permeable, una prueba de imbibición fue realizada, lo que consistió en pesar un lote de 100 semillas secas y distribuir las en cuatro réplicas de 25 semillas. Seguidamente fueron colocadas en cajas petri y sumergidas en agua destilada para posteriormente tomar los datos a las 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas, mediante una balanza analítica (Orozco et al. 2007; Jiménez, 2013). Los resultados de esta prueba fueron analizados a través de un análisis de regresión con intervalo de confianza al 95% para el peso ganado de las semillas mientras fue incrementando el tiempo de imbibición. Finalmente, la capacidad germinativa de esas semillas fue evaluada.

#### **5.2.2.1.2. Prueba de viabilidad**

Esta prueba consistió en sumergir las semillas no germinadas en una solución de tetrazolio ( $C_{19}H_{15}ClN_4$ ) al 1%, por 24 horas. Este procedimiento consistió en sacar la testa de las semillas, sin causar daño a los cotiledones y embrión.

#### **5.2.2.1.3. Caracterización morfológica de las semillas de las cuatro especies nativas**

Para determinar las principales características morfológicas de las semillas se midieron el largo y el ancho de 100 semillas y 20 embriones por cada especie usando un estereoscopio OLYMPUS SZ61. Este equipo contiene un programa denominado "INFINITY ANALYZE 1" que permite medir línea, perímetro, área, etc. Por otro lado, las semillas fueron clasificadas en base a las características del embrión y del endospermo. Para tal efecto se utilizó la clave para la clasificación de semillas establecida por Martin (1946); la cual fue revisada y corregida por Baskin y Baskin (2007). Por lo tanto, las correcciones realizadas por Baskin y Baskin (2007) fueron consideradas para las observaciones en este



estudio. En cuanto a sus colores, las semillas fueron clasificadas basado en el libro: Revised Standard Soil Colour Charts (1992).

Adicionalmente, la calidad de las semillas fue evaluada según los distintos colores que presentaron después de la recolección.

#### **5.2.2.1.5. Prueba de correlación**

Se seleccionaron 50 semillas fueron seleccionadas aleatoriamente, usando la función "ALEATORIO.ENTRE" en Excel. Estas fueron pesadas y medidas (largo y ancho) con el propósito de determinar si existe o no una correlación entre la germinación y el largo, ancho y su peso. Cabe señalar que esta prueba no fue aplicada a las especies *W. fagaroides* y *M. rhopaloides*, debido a su tamaño (largo < 0.95 mm y ancho < 0.63 mm) y bajo peso de cada semilla de la *W. fagaroides*. En el caso del *M. rhopaloides*, que es una especie recalcitrante y que la prueba no coincidió con el periodo de fructificación.

#### **5.2.2.2. Estratificación fría**

La estratificación fría consistió en colocar papel absorbente en 12 cajas petri. El diseño consistió en ubicar las semillas en un total de 12 réplicas de 25 semillas cada una. Las semillas fueron humedecidas con agua destilada de acuerdo a los requerimientos y puestas en refrigeración a 4°C por 7, 14 y 21 días. Estos últimos representan los tres niveles de la estratificación fría, cuatro cajas (replicas) por cada nivel.

#### **5.2.2.2.2. Estratificación caliente**

La estratificación caliente consistió en sumergir las semillas en agua a 30, 50 y 80°C (niveles) y se dejó enfriar por 12 horas. Posteriormente, se colocó papel absorbente en un total de 12 cajas petri (réplicas) con 25 semillas cada una. Por cada nivel se contó con cuatro réplicas. Finalmente, las semillas fueron colocadas en la cámara de germinación.



### 5.2.2.2.3. Escarificación ácida

Tres niveles (tiempo de exposición) de escarificación fueron definidos: 10, 30 y 60 minutos; los cuales han sido diferente para la *W. fagaroides*, debido a su tamaño (largo < 0.95 mm y ancho < 0.63 mm). Por ende, los niveles de la escarificación para la *W. fagaroides* fueron de 3, 5 y 10 minutos.

La escarificación ácida consistió en sumergir las semillas en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% a los diferentes tiempos ya mencionados. Luego, fueron enjuagadas con abundante agua destilada y colocadas en papel absorbente en un total de 12 cajas petri (réplicas), con cuatro cajas petri de 25 semillas cada una por cada nivel. Finalmente, las semillas fueron transferidas en la cámara de germinación.

### 5.2.2.2.3. Inmersión en AG<sub>3</sub>

Las semillas fueron sumergidas en AG<sub>3</sub> al 0.27 g/l (270 ppm) en cuatro niveles (tiempo de exposición) de inmersión han sido definido; 12, 24, 36 y 48 horas. Posteriormente se las enjuagó con agua destilada y colocadas en papel absorbente en un total de 16 cajas petri (réplicas), con cuatro cajas petri de 25 semillas cada una, por cada nivel. Finalmente, las semillas fueron transferidas en la cámara de germinación.

Es importante mencionar que todos los ensayos fueron desarrollados a una temperatura controlada (25°C) y cada uno de los tratamientos ha tenido su control respectivo de cuatro replicas cada uno. Además, en este estudio se consideró como germinación la emergencia de los dos primordios foliares. Dicha germinación ha sido evaluada dentro de un periodo de 30 días a partir de la primera germinación registrada, en cualquiera de las cuatro repeticiones, de cada tratamiento. Mientras que los días hasta la germinación, los días transcurridos hasta la primera germinación registrada en cada replica.



### 5.3. Diseño experimental y análisis estadístico

Por cada especie en estudio (*M. rhopaloides*, *O. grandiflora*, *W. fagaroides* y *H. luteynii*) y por cada tratamiento (prueba de imbibición, escarificación ácida, estratificación caliente, estratificación fría, inmersión en AG<sub>3</sub>) se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) de un factor (One way).

**Tabla 2:** Descripción de los tratamientos aplicados, con sus respectivos niveles.

TRATAMIENTOS	NIVELES		
<b>Escarificación ácida</b> (Inmersión en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1%)	<b>Especies</b>		
	<i>H. luteynii</i>	<i>W. fagaroides</i>	
	<i>M. rhopaloides</i>		
	<i>O. grandiflora.</i>		
	Control	Control	
	10 minutos	3 minutos	
	30 minutos	5 minutos	
60 minutos	10 minutos		
<b>Estratificación caliente</b>	Control		
	30 °C		
	50 °C		
	80 °C		
<b>Estratificación fría</b>	Control		
	7 días		
	14 días		
	21 días		
<b>Inmersión en AG<sub>3</sub> al 0.27 g/l</b>	Control		
	12 horas		
	24 horas		
	36 horas		
	48 horas		



Las variables dependientes en el diseño fueron: la germinación y días hasta la germinación; los factores y los niveles que se incluyeron en el diseño para las especies estudiadas se muestran en la Tabla 2. La homogeneidad de varianza y normalidad fue evaluada previo el análisis; además se utilizó la prueba de Tukey (Post hoc,  $p < 0.05$ ) para las comparaciones entre niveles. El paquete estadístico utilizado fue SPSS 16.0 para Windows.

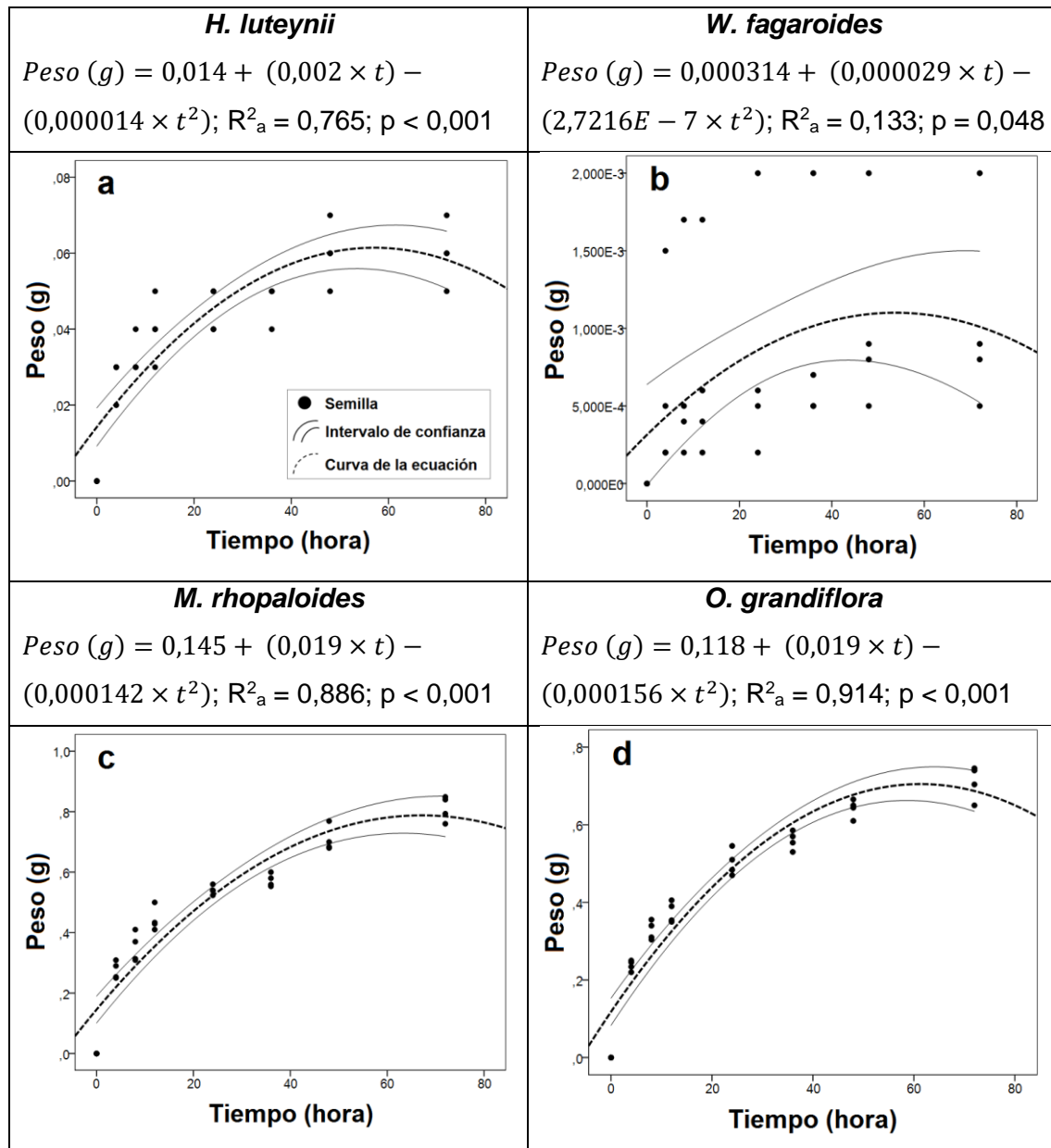
Adicionalmente, las diferencias entre especies han sido medidas con el test de comparaciones múltiples de Bonferroni, que consistió en aplicar una corrección al valor de  $P$  para reducir las posibilidades de obtener resultados falsos positivos (Matthew & Napierala, 2012).

La correlación entre las variables morfométricas y los días hasta la germinación fueron evaluados a través del coeficiente de Pearson. Las diferencias en las variables morfométricas entre las semillas germinadas y no germinadas han sido evaluadas mediante un Análisis de Varianza de un factor: germinación, para la variable morfométrica largo de la semilla, empleando un Análisis de covarianza para las variables ancho y peso, añadiendo el peso y el ancho, respectivamente, como covariables; la homogeneidad de varianzas ha sido comprobada a través del test de Levene (Montgomery & Runger 2003).

## CAPITULO VI: RESULTADOS

### 6.1. Características morfológicas y fisiológicas de las cuatro especies nativas

#### 6.1.1. Prueba de imbibición



**Figura 2:** Curvas de regresión con intervalo de confianza al 95% para las medias del tiempo y el peso ganado de las semillas de las especies *H. luteynii* (a), *W. fagaroides* (b), *M. rhopaloides* (c) y *O. grandiflora* (d).  $n=4$ ;  $R^2_a$ : Coeficiente de determinación ajustado;  $P$ : Valor de significación del modelo.



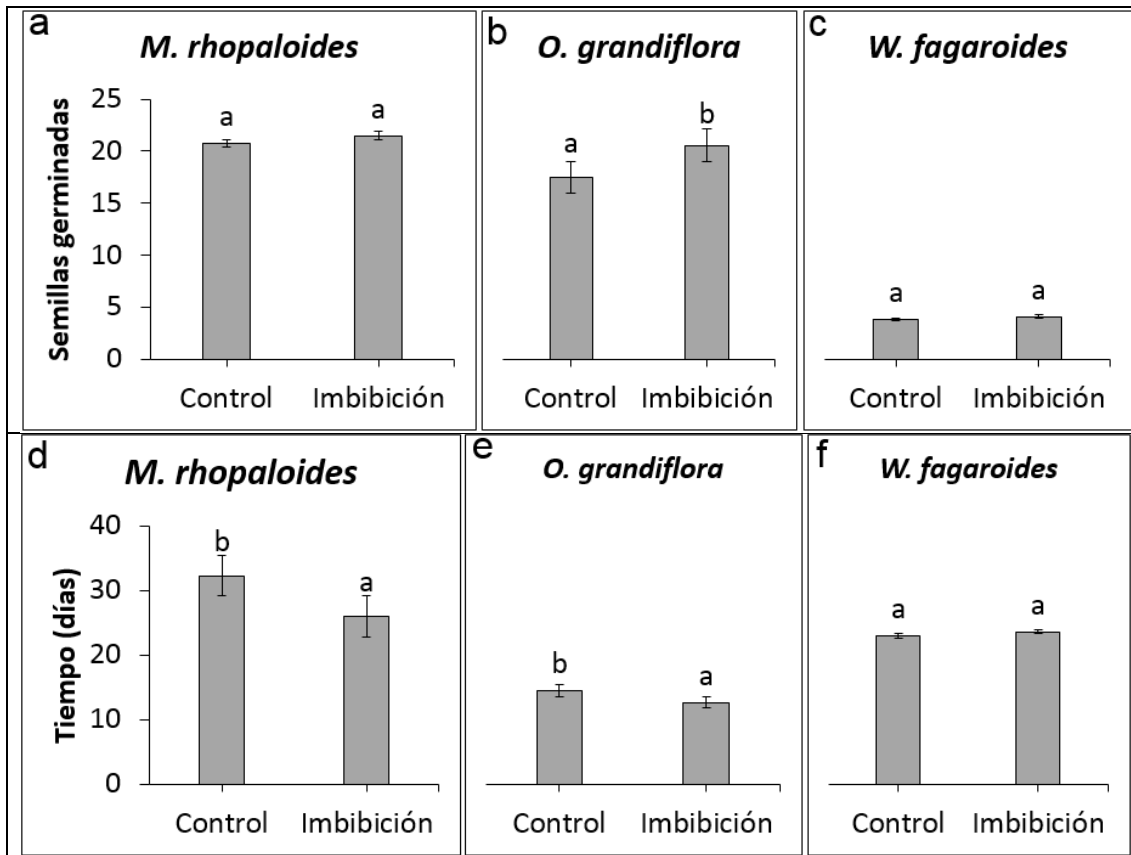
Después de las cuatro horas que fueron embebidas en agua destilada, se evidenció la absorción de agua para todas las especies; *H. luteynii*, *W. fagaroides*, *M. rhopaloides* y *O. grandiflora*. En todas evidenció un incremento de peso  $\geq 7\%$  (Figura 2 a, b, c, d).

*H. luteynii* exhibió una amplia variación en el peso de sus semillas (dispersión de los puntos, Figura 2a). Para *W. fagaroides* se registraron dos grupos de semillas muy distintos, de los cuales la mayoría de las semillas correspondiente a las de menor peso se encontraron en el grupo ubicado en la parte baja; mientras que el grupo de mayor peso se encontraron en la parte alta con respecto a la curva (Figura 2b). Con respecto al *M. rhopaloides* (Figura 2c) y *O. grandiflora* (Figura 2d) mostraron un comportamiento muy similar con respecto a la distribución de los puntos y la ganancia de peso (absorción de agua).

Las semillas de *M. rhopaloides* y *W. fagaroides* luego de ser embebidas en agua por 72 horas no mostraron diferencias significativas respecto a la germinación ( $p=0.320$  y  $p=1$ ) (Figura 3 a, c). No obstante, para *O. grandiflora* la germinación fue de 17 (68%) y 20 (80%) para los mismos niveles, bajo diferencias la cual fue estadísticas significativas ( $p=0.015$ ) (Figura 3b).

Las especies *M. rhopaloides* y *O. grandiflora* respondieron de manera similar a la prueba de imbibición, disminuyendo los días hasta la germinación. Para *M. rhopaloides* el número de días hasta la germinación fue de 32 días para el control y 26 días para la imbibición, estadísticamente significativo ( $p=0.001$ ) (Figura 3 d). Para *O. grandiflora* el número de días hasta la germinación fue de 14.5 y 12 días para el control y la imbibición, respectivamente ( $p<0.001$ ) (Figura 3 e). Mientras que para *W. fagaroides* el control y la imbibición no presentaron ninguna diferencia ( $p=0.814$ ) con respecto a los días hasta la germinación, transcurriendo ambos 22 días hasta la germinación (Figura 3f).





**Figura 3:** Promedio de número de semillas germinado (a, b, c) y los días hasta la germinación (d, e, f) para las especies *M. rhopaloides* (a, d), *O. grandiflora* (b, e) y *W. fagaroides* (c, f) tras la aplicación de una imbibición por 72 horas a las semillas, n=4.

### 6.1.2. Tamaño de las semillas y embriones de las cuatro especies nativas.

Las especies *H. luteynii*, *W. fagaroides*, *M. rhopaloides* y *O. grandiflora* no presentaron ninguna similitud en cuanto al tamaño de sus semillas y embriones (Tabla 3). Las especies con semillas y embriones de menor tamaño fueron *H. luteynii* con semillas de 3.66 (min) a 5.18 mm (max) de largo, 1.67 a 2.74 mm (mínimo y máximo) de ancho y embriones de 0.39 (min) a 0.96 mm (max) de largo, 0.25 a 0.76 mm (mínimo y máximo) de ancho (Tabla 2), y *W. fagaroides* con semillas de 0.62 (min) a 0.95 mm (max) de largo, 0.39 (min) a 0.63 mm (max) de ancho, los embriones no fueron evaluados debido a un incremento de tamaño (absorción de agua) asumido por el método utilizado (Tabla 3). Asimismo, los de mayor tamaño fueron *M. rhopaloides* con semillas de 5.59 (min) a 10.37 mm (max) de largo, 3.65 (min) a 7.93 mm (max) de ancho y embriones de 2.16 (min)



**Tabla 3:** Tamaño (largo y ancho) de las semillas y embriones de las especies *H. luteynii*, *W. fagaroides*, *M. rhopaloides* y *O. grandiflora*:

Especie	Variable	SEMILLA (n=100)		EMBRIÓN (n=20)	
		Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)
<b><i>H. luteynii</i></b>	Mínimo	3.66	1.67	0.39	0.25
	Máximo	5.18	2.74	0.96	0.76
	Media	4.36	2.27	0.61	0.42
	Varianza	0.12	0.03	0.03	0.01
	Desviación estándar	0.34	0.16	0.17	0.11
<b><i>W. fagaroides</i></b>	Mínimo	0.62	0.39	-	-
	Máximo	0.95	0.63	-	-
	Media	0.79	0.49	-	-
	Varianza	0.01	0.00	-	-
	Desviación estándar	0.07	0.04	-	-
<b><i>M. rhopaloides</i></b>	Mínimo	5.59	3.65	2.16	1.15
	Máximo	10.37	7.93	3.79	2.47
	Media	8.51	5.93	2.84	1.83
	Varianza	1.10	0.91	0.20	0.12
	Desviación estándar	1.05	0.95	0.44	0.34
<b><i>O. grandiflora</i></b>	Mínimo	5.54	3.08	1.08	0.65
	Máximo	12.20	6.83	2.23	0.96
	Media	7.44	4.80	1.74	0.84
	Varianza	1.07	0.67	0.07	0.01
	Desviación estándar	1.03	0.82	0.26	0.08

- : No evaluado

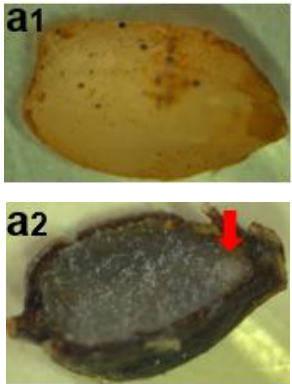
a 3.79 mm (max) de largo, 1.15 (min) a 2.47 mm (max) de ancho (Tabla 3), y *O. grandiflora* con semillas de 5.54 a 12.20 mm (mínimo y máximo) de largo, 3.08

(min) a 6.83 mm (max) de ancho y embriones de 1.08 (min) a 2.23 mm (max) de largo, 0.65 (min) a 0.96 mm (max) de ancho (Tabla 3).

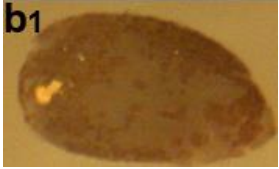
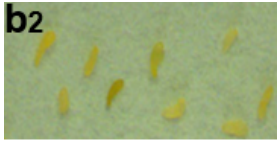
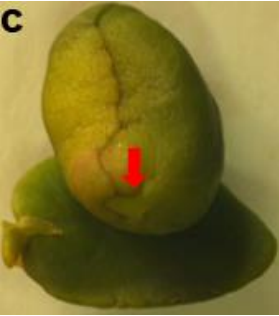
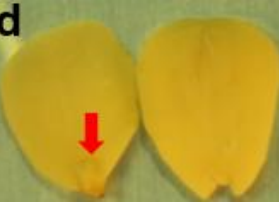
### 6.1.3. Clasificación de las cuatro especies nativas según sus endospermos y embriones

Las especies *H. luteynii* y *W. fagaroides* fueron similares en cuanto al tipo de endospermo (Tabla 4; ilustración a y b1). Asimismo, presentaron similitud en cuanto al tipo de embrión, siendo lineal para ambas especies con la diferencia de que *H. luteynii* presentó un tipo de embrión “lineal subdesarrollado” mientras que *W. fagaroides* un tipo de embrión “lineal totalmente desarrollado” (Tabla 3 y 4, ilustración b2). Asimismo, *M. rhopaloides* y *O. grandiflora* presentaron un tipo de endospermo similar y una ubicación análoga del embrión (Tabla 4, ilustración c y d). Por lo tanto, el embrión de estas últimas especies fueron clasificadas como “periférico” (Tabla 4, ilustración c y d).

**Tabla 4:** Tipos de embriones con sus respectivas descripciones y la ilustración de los cotiledones y la ubicación de los embriones (Seguir la flecha) de las especies *H. luteynii* (a), *W. fagaroides* (b1: endospermo y b2: embriones), *M. rhopaloides* (c) y *O. grandiflora* (d).

TIPO	DESCRIPCIÓN (Martin,1946; Baskin & Baskin 2007)	ESPECIE
<b>LINEAL SUBDESARROLLADO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Embrión diferenciado dentro de los órganos.</li> <li>- El embrión es pequeño en relación con endospermo y la longitud de la semilla.</li> <li>- Generalmente, un ratio E:S (Embrión:Semilla) de <math>\leq 0.5</math></li> <li>- Embrión más largo que ancho.</li> </ul>	 <p><i>H. luteynii</i></p>

Continuación Tabla 4:

TIPO	DESCRIPCIÓN (Martín,1946; Baskin & Baskin 2007)	ESPECIE
<p><b>LINEAL TOTALMENTE DESARROLLADO</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El embrión es grande en relación con el endospermo, o el endospermo es deficiente; generalmente un ratio E: S de &gt; 0.5.</li> <li>- Los cotiledones no son expandidos, el embrión es más largo que ancho.</li> </ul>	 <p><b>b1</b></p>  <p><b>b2</b></p> <p><b><i>W. fagaroides</i></b></p>
<p><b>PERIFÉRICO</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Endospermo generalmente presente y definitivamente amilácea (carencia de endospermo en algunas <i>Cactaceae</i> y en <i>Salicornia</i>, <i>Sarcobatus</i> y <i>Salsola</i>, los cuales tienen embriones enrollados en espiral).</li> <li>- Embrión o parte de él es periférico con respecto al endospermo.</li> <li>- Embrión evidentemente dicotiledónea (excepto en <i>Claytonia</i> and <i>Abronia</i>), elongado o largo.</li> </ul>	 <p><b>c</b></p> <p><b><i>M. rhopaloides</i></b></p>  <p><b>d</b></p> <p><b><i>O. grandiflora</i></b></p>

#### 6.1.4. Características de las especies *H. luteynii* y *O. grandiflora* según sus colores:

Las semillas fueron divididas en tres grupos según su color para *H. luteynii* y para *O. grandiflora*, los cuales se describen a continuación.

Las semillas de *H. luteynii* según sus colores pueden ser clasificadas en:

- a) **Marrón rojizo oscuro (Dark reddish brown):** En general fueron semillas totalmente vacías, por lo tanto el embrión estuvo ausente (Figura 4a).
- b) **Negro parduzco (Brownish black):** En general fueron semillas parcialmente vacías que no presentaron embrión (Figura 4b).
- c) **Negro rojizo (Reddish black):** Fueron semillas llenas que presentaron un endospermo generalmente semitransparente, a través de lo cual se pudo identificar fácilmente el embrión (Tabla 4, ilustración a).

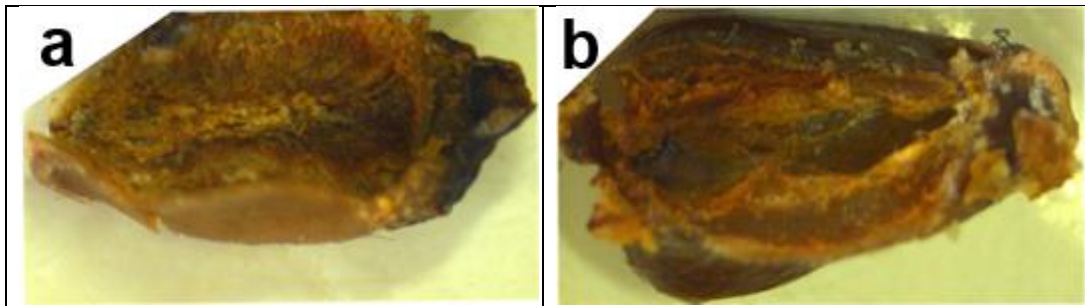


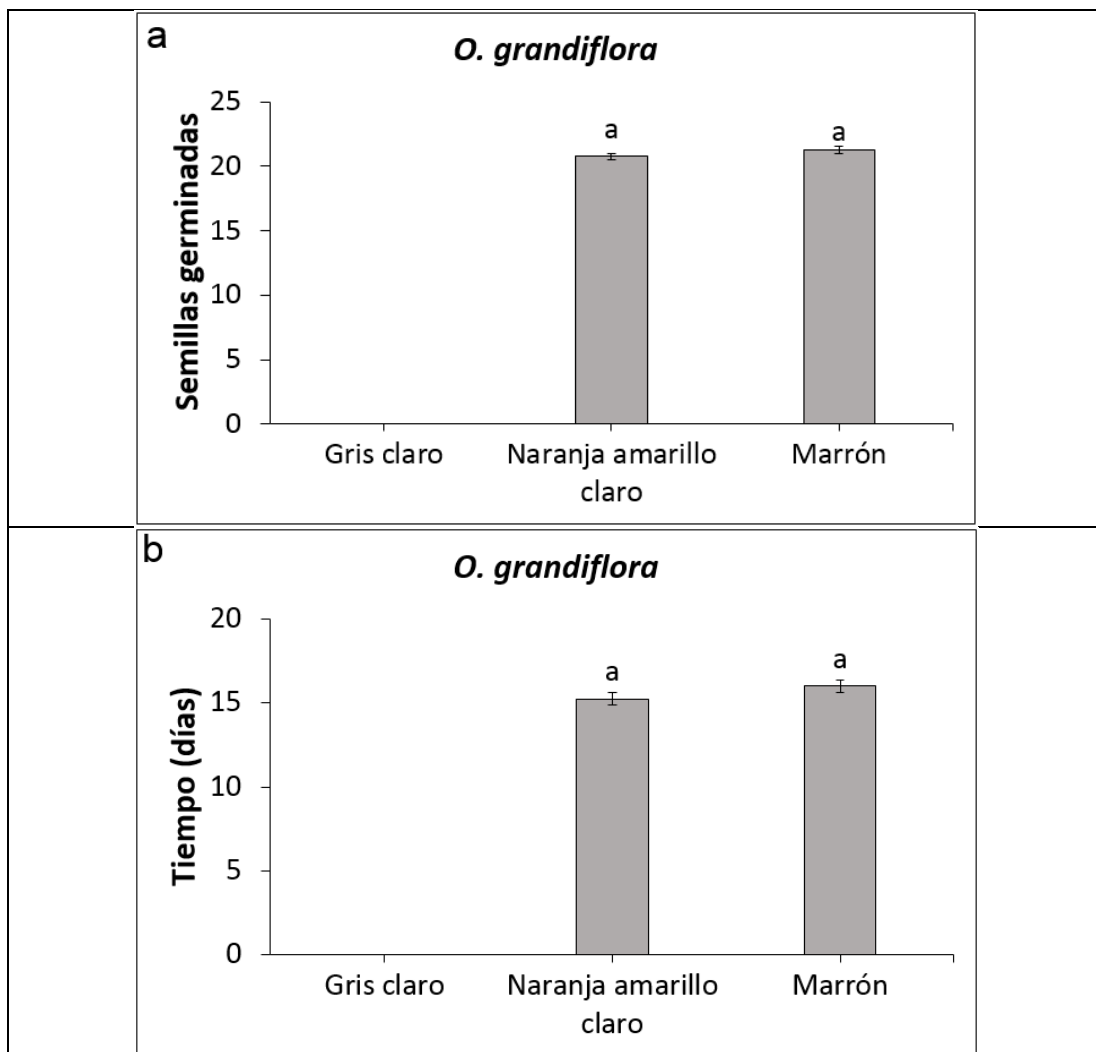
Figura 4: Ilustración de las semillas vacías del *H. luteynii* mediante un corte transversal.

En cuanto a las semillas de *O. grandiflora*, según sus colores pueden ser clasificadas en:

- a) Gris claro (Light gray).
- b) Naranja amarillo claro (Light yellow orange).
- c) Marrón (Brown).



**Figura 5:** Ilustración de las semillas gris claro (a), naranja amarillo claro (c) y marrón (c) del *O. grandiflora*.

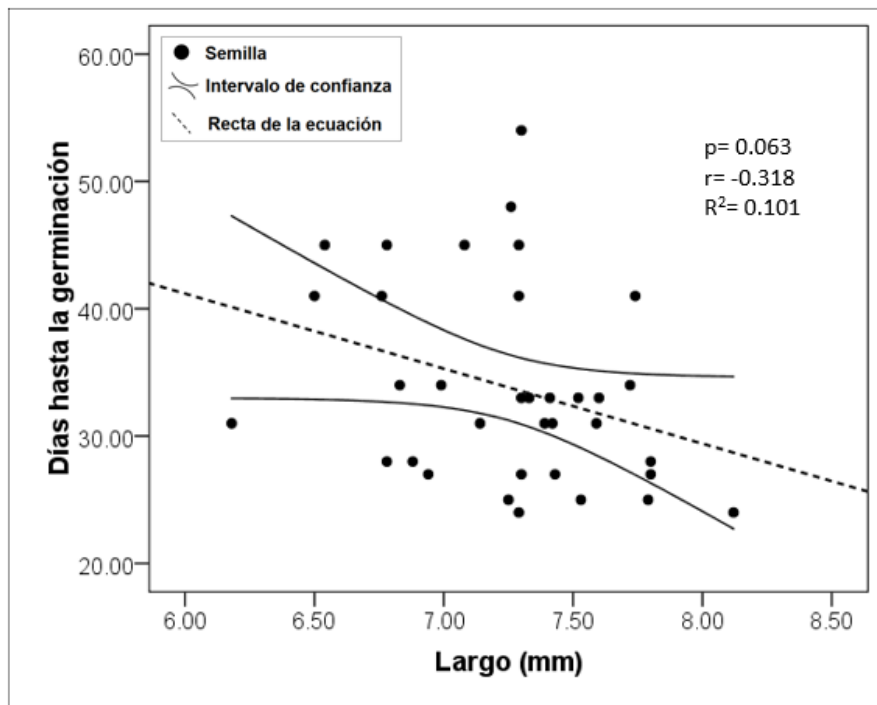


**Figura 6:** Promedio de número de semillas germinado (a) y los días hasta la germinación (b) de la especie *O. grandiflora* para los diferentes colores de las semillas, n=4.

Las semillas de color gris claro registraron germinación nula (Figura 6a). Mientras que la germinación de los grupos naranja amarillo claro y marrón presentaron una mayor similitud, tanto para el promedio de germinación, 20.75 (83%) y 21.25 (85%) semillas germinadas, respectivamente. También para los días transcurridos hasta la germinación, 15.25 y 16 respectivamente (Figura 6 a, b).

Por otro lado, no hubo diferencia en el color de las semillas de las especies *M. rhopaloides* y *W. fagaroides*, por lo tanto no fueron analizadas bajo este criterio. Los resultados de la prueba de corte realizado después de la prueba de germinación mostraron que las semillas del grupo gris claro (Figura 5a) se pudrieron antes de germinar (Figura 6a). Mientras que las semillas de los grupos naranja amarillo claro (Figura 5b) y marrón (Figura 5c) presentaron un alto promedio de semillas germinadas (Figura 6a).

#### 6.1.5. Relación entre las variables biométricas de las semillas de *O. grandiflora* y su germinación:



**Figura 7:** Relación lineal entre el largo de las semillas y los días hasta la germinación para el *O. grandiflora* (n=50). Ecuación:  $Y = -5.8882x + 76.51$

Los análisis según la prueba de correlación, las semillas de *O. grandiflora* no presentaron ninguna correlación entre su largo, ancho y su germinación. No obstante, se observó que hubo una correlación negativa ( $r=-0.318$ ) entre su peso y su germinación, de tal manera que cuanto más largas fueron las semillas, más temprano germinaron. Sin embargo, esta correlación no alcanzó la significación estadística ( $p=0.063$ ) bajo el análisis de regresión y el  $R^2$  explicó un 10% de esta relación (Figura 7).

Por otro lado, las especies *O. grandiflora* y *W. fagaroides* en un mismo lote de semillas presentaron dos grupos de semillas: uno que no necesitó ningún tipo de tratamiento para germinar. Otro grupo que, a pesar que resultó ser viables bajo la prueba de tetrazolio, no logró germinar sin la aplicación de un tratamiento pregerminativo.

Cabe recalcar que *H. luteynii* tuvo un comportamiento muy particular, presentando una germinación nula bajo todos los tratamientos, a excepción de la prueba de imbibición. Bajo este tratamiento presentó cinco semillas germinadas, alcanzando su primera germinación después de un largo periodo de tiempo con 92 días.



**Figura 8:** Ilustración de las semillas vacías del *H. luteynii*.

Frente a esta situación, se realizó una prueba de corte en 100 semillas para verificar su estado interno observado que 92 semillas fueron vacías (Figura 8).





Las ocho semillas restantes fueron semillas llenas con presencia de endospermo y embriones. De estas ocho, solo cuatro que resultaron ser viables bajo la prueba de tetrazolio. Este último resultado que coincidió con las cinco semillas germinadas que es la única germinación registrada en todos los tratamientos para esta especie.

#### **6.1.6. Influencia de los tratamientos térmicos en la germinación de las cuatro especies forestales nativas:**

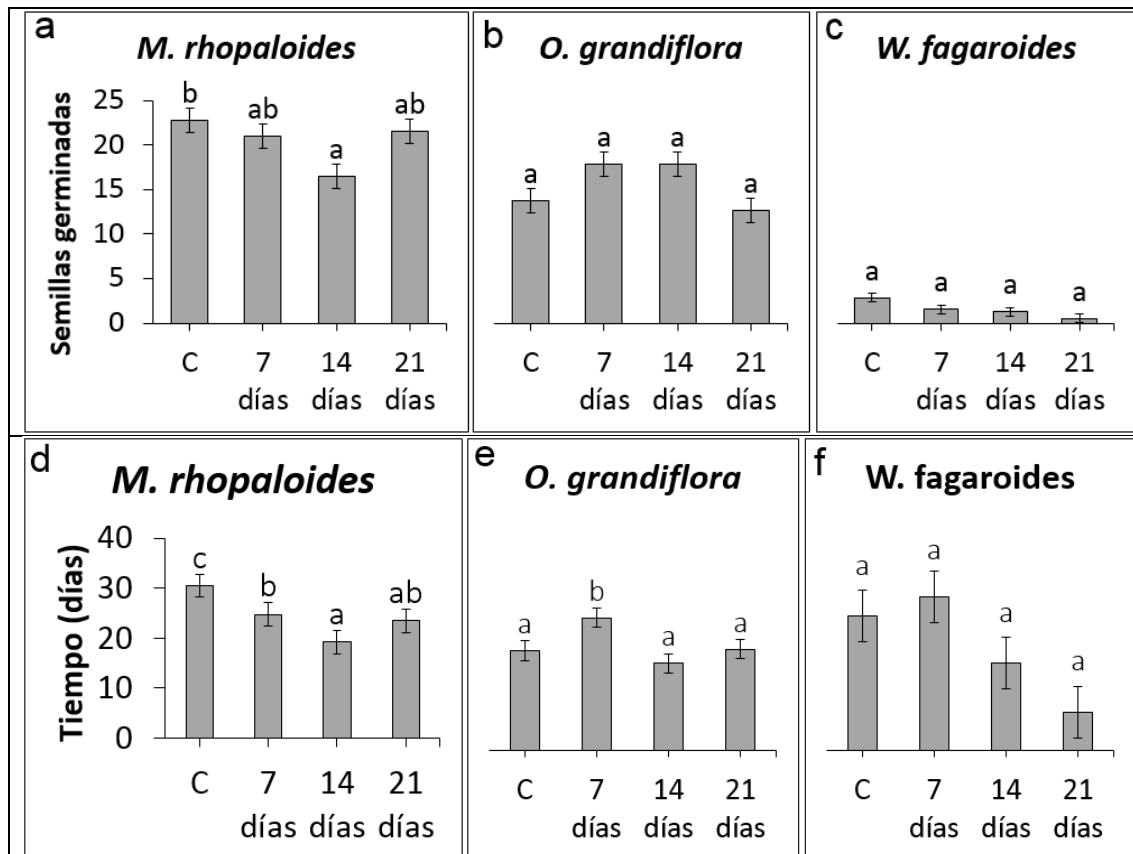
##### **6.1.6.1. Estratificación fría:**

*M. rhopaloides* registró alto promedio de semillas germinadas bajo todos los niveles de la estratificación, estadísticamente significativo ( $p=0.019$ ). Sin embargo, a los 14 días de exposición el promedio de semillas germinadas fue de 16.50 (66%), el mismo que fue el menor con respecto a los otros niveles de la estratificación (Figura 9 a).

En cuanto a *O. grandiflora* se observó que la germinación fue similar para todos los niveles de la estratificación (control, 7, 14 y 21 días), registrando menor promedio de semillas germinadas 12.25 (49%), para el último nivel experimental (Figura 9 b). La especie *W. fagaroides* presentó una germinación menor que las dos especies antes mencionadas, con mayor promedio de semillas germinadas para el control 2.75 (11%). Este promedio fue disminuyendo mientras se incrementó el número de días de exposición (Figura 9 c).

En cuanto a los días hasta la germinación, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* mostraron mayor similitud cuando se incrementó el número de días hasta la germinación en el nivel de 7 días, con 23 y 27 días, respectivamente (Figura 9 e, f). Para *O. grandiflora*, el nivel 14 días de exposición fue el que menor número de días hasta la germinación tuvo (15 días) (Figura 9 e). Mientras que para *W. fagaroides* el nivel 21 días de la estratificación fría presentó su primera germinación a los 7 días a partir de la siembra (Figura 9 f).

Para *M. rhopaloides*, los días de germinación disminuyeron conforme el tiempo de exposición se incrementó. Sin embargo, en el nivel 14 días de exposición se registró el menor número de días hasta la germinación (19). Además se observó que el control fue el nivel donde mayor número de días transcurridos se registró (31 días) (Figura 9 d).



**Figura 9:** Promedio de número de semillas germinado (a, b, c) y los días hasta la germinación (d, e, f) para las especies *M. rhopaloides* (a, d), *O. grandiflora* (b, e) y *W. fagaroides* (c, f) tras la aplicación de los distintos niveles de la estratificación fría (Control, 7 días, 14 días, 21 días), n=4.

#### 6.1.6.2. Estratificación caliente:

La respuesta germinativa de las especies *O. grandiflora* y *W. fagaroides* fue similar para el tratamiento estratificación caliente para los niveles control, 30°C, 50°C y 80°C (Figura 10 b, c).

*O. grandiflora* presentó una germinación similar para los niveles control, 30°C y 50°C, no presentando diferencia estadística entre sí ( $p=0.983$ ). No obstante, se



notó una leve diferencia en la germinación, registrando el menor promedio de semillas germinadas en el nivel 30°C, 16 (64%); mientras que el mayor promedio 16.75 (67%) fue registrado en el nivel 50°C (Figura 10 b).

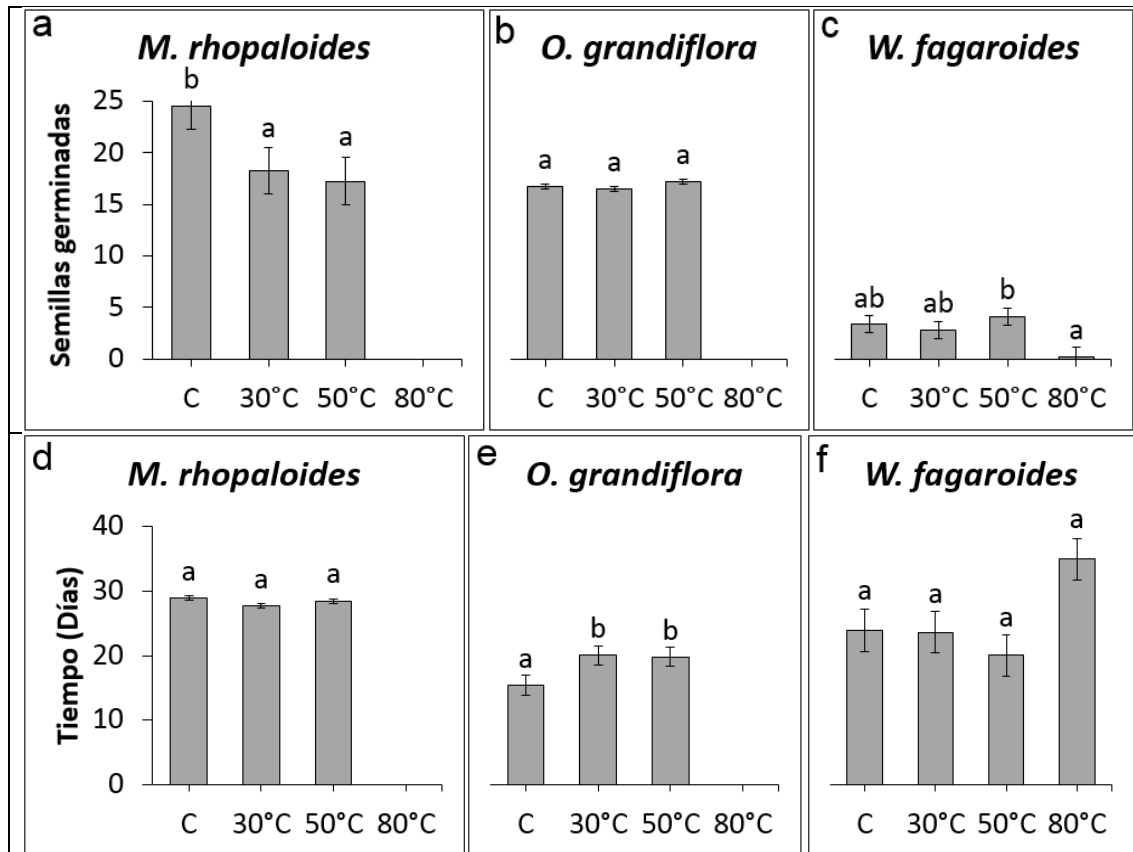
En *W. fagaroides* la germinación para los niveles control, 30°C y 50°C mostraron una mayor similitud para la estratificación caliente, sin diferencias estadísticas entre sí ( $p=0.689$ ). Sin embargo, hubo diferencias estadísticas ( $p=0.030$ ) entre todos los niveles de la estratificación (control, 30°C, 50°C, 80°C). Para esta especie, la estratificación a 30°C fue el nivel que produjo el menor promedio de semillas germinadas 2.75 (11%), mientras que el nivel 50°C alcanzó el promedio de semillas germinadas más alto (4) (Figura 10 c).

La especie *M. rhopaloides* presentó una germinación mayor que las dos especies antes mencionadas, con mayor promedio de semillas germinadas para el control 24.5 (98%). Este promedio fue disminuyendo mientras se incrementó la temperatura (Figura 10 a), lo cual fue estadísticamente significativa ( $p<0.001$ ).

En cuanto al nivel 80°C, la germinación fue nula, con diferencias estadísticas ( $p<0.001$ ) en comparación con los niveles control, 30°C y 50°C para las especies *M. rhopaloides* y *O. grandiflora*. Para *W. fagaroides* se registró una semilla germinada, como único registro para este nivel, después de 34 días a partir de la siembra (Figura 10 a, b, c).

Con respecto a los días hasta la germinación, *M. rhopaloides* y *W. fagaroides* mostraron mayor similitud, transcurriendo un número de días aproximadamente igual para los niveles control, 30°C y 50°C (Figura 10 d, f). Para *M. rhopaloides* el nivel 30°C fue el que menor número de días transcurrió (28 días) (Figura 10 d). Mientras que para *W. fagaroides* el nivel 50°C transcurrió un número menor de días (20 días) con respecto a los otros niveles (Figura 10 f).

En cuanto al *O. grandiflora* el control fue el nivel que menor días hasta la germinación transcurrió (15), mientras que los niveles 30°C y 50°C transcurrieron un mayor número de días con 20 y 19 días respectivamente (Figura 10 e).



**Figura 10:** Promedio de número de semillas germinado (a, b, c) y los días hasta la germinación (d, e, f) para las especies *M. rhopaloides* (a, d), *O. grandiflora* (b, e) y *W. fagaroides* (c, f) tras la aplicación de los distintos niveles de la estratificación caliente (Control, 30°C, 50°C, 80°C), n=4.

### 6.1.7. Influencia del AG y el ácido sulfúrico en la germinación de cuatro las cuatro especies forestales nativas

#### 6.1.7.1. Inmersión en AG<sub>3</sub> al 0.27 g/l (270 ppm)

La respuesta germinativa de las especies *M. rhopaloides* y *O. grandiflora* fue similar para el tratamiento inmersión en AG<sub>3</sub>. Sin embargo, se observaron algunas diferencias en los porcentajes de germinación de estas dos especies con respecto a los diferentes tiempos de exposición (Figura 11 a, b).



Para *M. rhopaloides* la germinación se incrementó a medida que incrementó el tiempo de inmersión en AG<sub>3</sub> con significancias estadísticas ( $p=0.011$ ). Por lo tanto, esta especie presentó su mayor promedio de semillas germinadas a las 24 y 48 horas de inmersión, con 24.75 (99%) para ambos niveles (Figura 11 a). No obstante, su menor promedio 21.50 (86%) fue registrado a las 36 horas de inmersión (Figura 11 a).

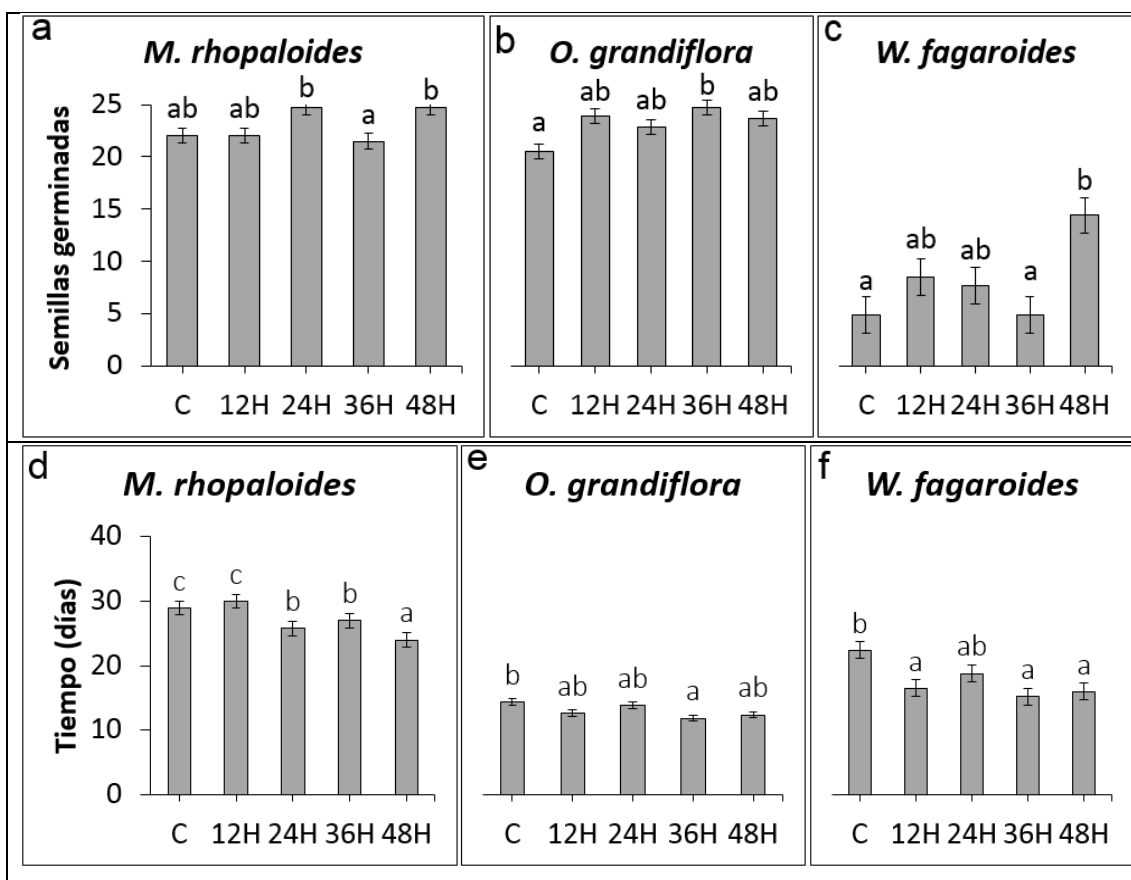
La germinación del *O. grandiflora* se incrementó de manera irregular conforme incrementó el tiempo de inmersión de las semillas, alcanzando su mayor promedio de germinación 24 (96%) a las 36 horas de inmersión. No obstante, el menor promedio 20 (80%) fue registrado en el control (Figura 11 b). La germinación de esta especie fue estadísticamente significativa ( $p=0.042$ ) para los distintos niveles de la inmersión en AG<sub>3</sub>.

El promedio de semillas germinadas en *W. fagaroides* se incrementó a partir de las 12 horas de inmersión 8.25 (33%), lo cual disminuyó levemente en el nivel 24 horas 7.50 (30%) y produjo su menor germinación 4.75 (19%) a las 36 horas de inmersión, este último nivel fue igual que el control (Figura 11 c). Sin embargo, su mayor promedio de semillas germinadas fue registrado en el nivel 48 horas de inmersión 14 (56%) (Figura 11 c).

En cuanto a los días hasta la germinación, las especies *O. grandiflora* y *W. fagaroides* mostraron mayor similitud, transcurriendo un menor número de días para el nivel 12 horas de inmersión. Estos días se incrementaron en el nivel 24 horas de inmersión y se estabilizaron en los niveles de 36 y 48 horas de inmersión en AG<sub>3</sub> (Figura 11 e, f). Para *O. grandiflora* los días hasta la germinación fueron estadísticamente significativa para los niveles control, 12 horas, 24 horas, 36 horas y 48 horas ( $p=0.021$ ). Los niveles 12, 36 y 48 horas de inmersión fueron los niveles que menor número de días hasta la germinación transcurrieron (12 días); mientras que el mayor número de días hasta la

germinación (14 días) fue registrado en los niveles control y 24 horas (Figura 11 e).

En *W. fagaroides* los días hasta la germinación para los distintos niveles de la inmersión fueron estadísticamente significativa ( $p=0.001$ ). La inmersión por 36 horas fue el nivel que menor día hasta la germinación transcurrió (15 días). No obstante, el control presentó su primera germinación después de 22 días a partir de la siembra, siendo el nivel más tardío para la germinación (Figura 11 f).



**Figura 11:** Promedio de número de semillas germinado (a, b, c) y los días hasta la germinación (d, e, f) para las especies *M. rhopaloides* (a, d), *O. grandiflora* (b, e) y *W. fagaroides* (c, f) tras la aplicación de los distintos niveles de la inmersión en AG<sub>3</sub>, n=4.

En *M. rhopaloides* los días hasta la germinación se incrementaron y alcanzaron el mayor número de días hasta la germinación en el nivel 12 horas (30 días). Estos días disminuyeron en los niveles 24 y 36, siendo 26 y 27 días



respectivamente, y fueron menor en el nivel 48 horas (24 días) (Figura 11 d). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para los distintos niveles de comparación respecto a la inmersión ( $p < 0.001$ ).

#### 6.1.7.2. Inmersión en $H_2SO_4$ al 1%:

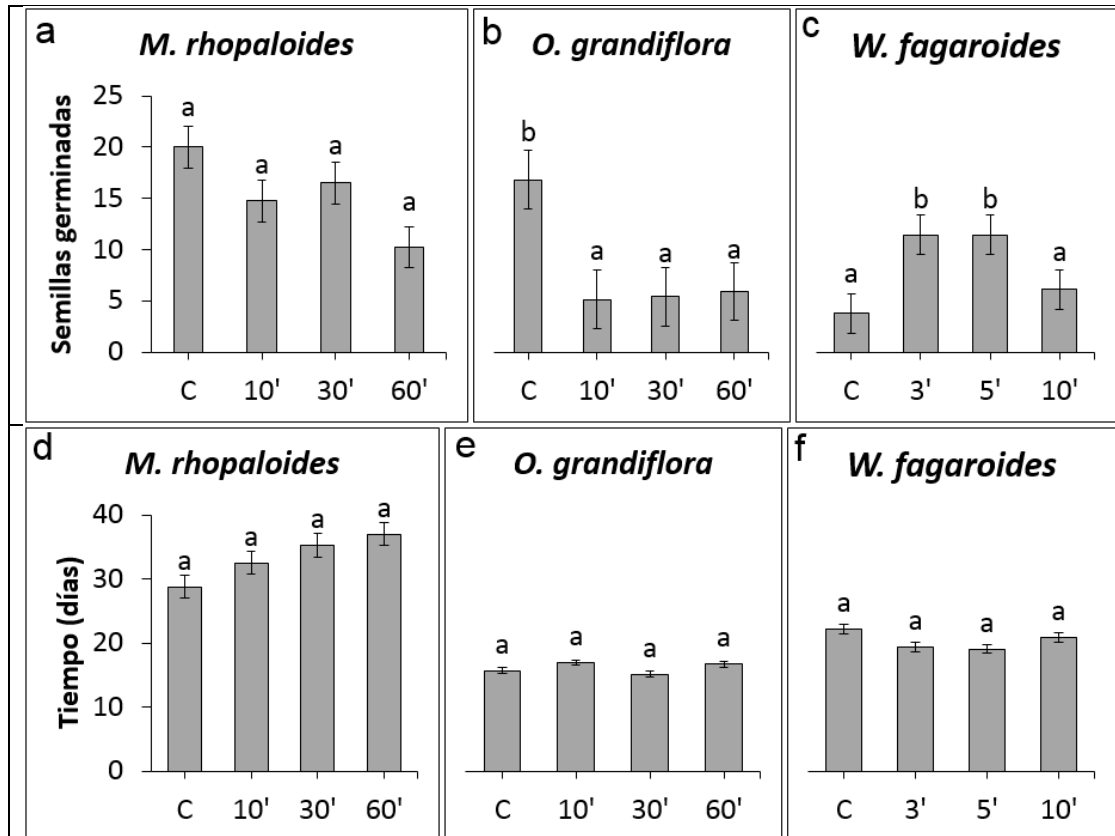
Los resultados mostraron que las especies *M. rhopaloides* y *O. grandiflora* presentaron una mayor similitud en su germinación para el tratamiento inmersión en  $H_2SO_4$ , la cual fue menor en los niveles 10, 30 y 60 minutos con respecto al control (Figura 12 a, b). En *M. rhopaloides*, el control fue el nivel que mayor promedio de semillas germinadas presentó 20 (80%) y el menor promedio en los niveles 10, 30 y 60 minutos de exposición. El último nivel registró menor promedio de semillas germinadas con respecto a los otros niveles 10 (40%). Sin embargo, no se registró diferencias significativas ( $p = 0.156$ ) (Figura 12 a).

En *O. grandiflora* el control fue el nivel que mayor promedio de semillas germinadas presentó 16 (64%), mientras que el nivel 10 minutos fue el nivel que presentó el menor promedio 5 (20%). Sin embargo, se observó un leve incremento en los niveles 30 y 60 minutos (Figura 12 b). En esta especie se registró diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) para el tratamiento inmersión en  $H_2SO_4$ .

En *W. fagaroides* el menor promedio de semillas germinadas fue registrado en el control 3.75 (15%), lo cual se incrementó a medida que aumentaba el tiempo de inmersión en los niveles 3 y 5 minutos 11.25 (45%) ambos; se redujo nuevamente en el nivel 10 minutos 6 (24%). Esta especie presentó una germinación estadísticamente significativa ( $p = 0.001$ ) para el tratamiento inmersión en (Figura 12 c).

Las especies *O. grandiflora* y *W. fagaroides* presentaron una mayor similitud con respecto a los días hasta la germinación, sin diferencias estadísticas para ambas especies;  $p = 0.274$  y  $p = 0.321$  sucesivamente (Figura 12 e, f). Para *O. grandiflora* los niveles control y 30 minutos fueron los que menor número de días hasta la

germinación transcurrieron (15 días). Mientras que el nivel 10 minutos transcurrió el mayor número de días hasta la germinación (17 días) (Figura 12 e). Asimismo, para *W. fagaroides* el mayor número de días hasta la germinación fue observada en el control (22 días). No obstante, los niveles 3 y 5 minutos presentaron su primera germinación después de los 19 días a partir de la siembra (Figura 12 f).



**Figura 12:** Promedio de número de semillas germinado (a, b, c) y los días hasta la germinación (d, e, f) para las especies *M. rhopaloides* (a, d), *O. grandiflora* (b, e) y *W. fagaroides* (c, f) tras la aplicación de los distintos niveles de la inmersión en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Control, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos), n=4.

Por otra parte, para *M. rhopaloides* el control fue el nivel que mostró el menor número de días hasta la germinación (29 días) los cuales fueron incrementando conforme incrementó el tiempo de exposición al H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Alcanzó su mayor número de días hasta la germinación en el nivel 60 minutos (37 días), sin registrar significancias estadísticas para los distintos niveles de la inmersión ( $p=0.151$ ).





### 6.1.8. Viabilidad de las cuatro especies forestales nativas:

La viabilidad de las especies *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* fue muy distinto, tal como se presenta en la Tabla 5:

**Tabla 5:** Porcentaje de viabilidad para las especies *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*.

Especie	Viabilidad (%)
<i>H. luteynii</i>	4%
<i>M. rhopaloides</i>	99%
<i>O. grandiflora</i>	92%
<i>W. fagaroides</i>	25%

La viabilidad de las especies antes *H. luteynii*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* fue evaluada mediante la prueba de tetrazolio. Sin embargo el protocolo se varió según las características de cada especie. Por lo tanto, para *H. luteynii*, *O. grandiflora* fue mediante la extracción de los cotiledones y su inmersión en una solución de tetrazolio al 1% por 24 horas. El procedimiento fue igual para *W. fagaroides* con la diferencia de que para esta especie se la realizó mediante la extracción de los embriones.

Para *M. rhopaloides*, no se observó ninguna diferencia en las semillas después de realizar la prueba de tetrazolio. Por ende, su viabilidad fue evaluada contando el número de semillas con radícula después del periodo de evaluación de la germinación.

### 6.1.9. Comparación de las cuatro especies nativas y todos los tratamientos.

En los anexos 7 y 8 se presentan los gráficos comparativos de los promedios de la germinación por tratamiento para las *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*. También se presentan los promedios de la germinación para todos los tratamientos (prueba de imbibición, escarificación ácida, estratificación



caliente, estratificación fría, inmersión en AG<sub>3</sub>) para las especies *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* por separado.

El AG fue el tratamiento que produjo una germinación superior y un menor número de días hasta la germinación en comparación a los otros tratamientos. La escarificación ácida, en cambio, fue el tratamiento que produjo una germinación menor para todas las especies con respecto a los otros tratamientos. Para *W. fagaroides* la estratificación fría fue el tratamiento que produjo una menor germinación con respecto a los otros tratamientos.



## CAPITULO VII: DISCUSIÓN

### 7.1. Características morfológicas y fisiológicas de las cuatro especies forestales.

De acuerdo con la prueba de imbibición las especies *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* fueron todas permeables. Bajo esta cualidad mostraron absorción de agua al poco tiempo después de haber sido embebidas. Estos resultados son similares con los de Orozco et al. (2007) quienes reportaron a la prueba de imbibición como la única manera de saber si una semilla es permeable. Desde el punto de vista del tiempo que les tomó a las semillas para absorber el agua varió de especie a especie. Por ejemplo, *H. luteynii* y *W. fagaroides* mostraron diferencias en su capacidad de absorción de agua. Asimismo, las semillas mostraron diferencias en su capacidad de absorción de agua, como es el caso de *W. fagaroides* que presentó dos grupos de semillas con una gran diferencia de peso. Lo que podría deberse a las características físicas de las semillas de esta especie (peso y tricomas de las semillas) que dificultaron la exclusión de las semillas que flotaron, debido a que todas las semillas, las llenas igual que las vacías fueron susceptibles a ser flotadas. Por lo tanto, al realizar la prueba de corte se encontró una gran cantidad de semillas vacías, por lo tanto se registró germinación inferior a 50% bajo todos los tratamientos. Sin embargo, para el tratamiento inmersión en AG<sub>3</sub> se registró germinación superior a 50%.

Las semillas de las especies *M. rhopaloides* y *O. grandiflora* exhibieron un comportamiento similar en su absorción de agua. Estas últimas especies, a su vez, fueron diferentes a las especies *H. luteynii* y *W. fagaroides*. En este sentido Amusa (2011) manifestó que la permeabilidad al agua y gases de la testa de las semillas varía de especie a especie.

Las especies *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* fueron distintas con respecto al tamaño de sus semillas y embriones. En cuanto a los tipos de endospermo y embriones, *H. luteynii* y *W. fagaroides* fueron distintos;



mientras que *M. rhopaloides* y *O. grandiflora* fueron idénticos. Al respecto, Gandhi (2011) reportó que dentro de especies de un mismo género las semillas difieren en tamaño y superficie, asumiendo que hay variación entre familias de plantas. Asimismo, Zorić et al. (2010) demostraron que la variación en la morfología de las semillas se manifiesta principalmente en tamaño, forma, color, entre otros.

Otro aspecto importante que se recalca en este estudio es la relación entre el color y la calidad de las semillas en las especies *H. luteynii*, y *O. grandiflora*. Por ejemplo, en *O. grandiflora* se observó claramente la relación entre el color y la capacidad de germinación. De esta manera, Mavi (2010) en *Citrullus lanatus* 'Crimson Sweet' y Atis et al. (2011) en *Trifolium pratense* demostraron la importancia del color de la testa en la calidad de las semillas y su capacidad a ser utilizado como un indicador positivo en la calidad de las semillas.

También es importante recalcar que en *O. grandiflora* se registró una correlación muy baja con respecto a sus características biométricas, de modo que mientras más largas fueron las semillas más pronto germinaron. Susko y Doust (2000) encontraron algo similar en la especie *Alliaria petiolata* en donde realizaron el estudio de los patrones de variación de la masa de la semilla y sus efectos sobre los rasgos de la plántula. También se manifiesta que mientras más pequeñas fueron las semillas más pronto germinaron, deduciendo que las semillas pequeñas embeben agua tempranamente y rompen la dormancia más temprano.

Las especies *O. grandiflora* y *W. fagaroides* presentaron dos grupos de semillas en un mismo lote. El primero que germinó sin la aplicación de ningún tratamiento y otro que no germinó sin un tratamiento previo. La explicación es que la dormancia podría darse en semillas de una misma especie (Rao et al. 2006). Al respecto, Orozco et al. (2007) manifestó que la dormancia fisiológica es la razón principal por la cual una semilla embebida, a pesar de que tienen embriones totalmente desarrollados, no logran germinar.



## **7.2. Influencia de los tratamientos térmicos en la germinación de las cuatro especies forestales nativas:**

Tras la aplicación de los tratamientos térmicos las especies *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* presentaron diferencias en la germinación y los días transcurridos hasta la germinación. Los días tienden a disminuirse con la aplicación de la estratificación fría y prolongarse con la estratificación caliente. Cabe recalcar que *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* presentaron una germinación nula en la estratificación a 80°C. Por ende, con la aplicación de la estratificación fría el porcentaje de germinación de las especies *M. rhopaloides* y *W. fagaroides* tiende a disminuir. No obstante, tiende a incrementarse en *O. grandiflora*, aunque no fue significativa. Baskin y Baskin (1988) indicaron que las semillas dormantes vuelvan no dormantes solamente a una temperatura específica, la cual está en relación con la especie. Por lo tanto, esta disminución en la germinación de las especies podría deberse a que las temperaturas utilizadas en este estudio no se aproximan a las óptimas.

Por otro lado, la germinación nula registrada en la estratificación a 80°C podría deberse a que, las semillas al ser expuestas a una temperatura encima del rango de tolerancia por un tiempo prolongado puede disminuir su porcentaje de germinación, causando daño a su embrión (Okunlola et al. 2011; Mohammadi et al. 2012).

## **7.3. Influencia del AG y el ácido sulfúrico en la germinación de cuatro las cuatro especies forestales nativas.**

La respuesta germinativa de las especies *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* al AG fue similar, pese a que se constató que la germinación y los días hasta la germinación variaron entre las especies, entre los niveles o tiempo de exposición. El AG fue el tratamiento que produjo germinación con mayores resultados y un número de días hasta la germinación menor que los otros tratamientos. Mientras que la escarificación ácida fue el tratamiento que produjo germinación con menores resultados respecto a los otros tratamientos,



produciendo una disminución en la germinación de *M. rhopaloides* y *O. grandiflora*. No obstante, en *W. fagaroides* produjo una germinación mayor que el control.

La mayor germinación registrada con el AG<sub>3</sub> podría deberse a que los AGs son capaces de contrarrestar el efecto del ABA (ácido abscísico). Este ácido es una hormona fuertemente correlacionados con la inducción, el mantenimiento y la ruptura de la dormancia en semillas maduras (Chen et al. 2007, 2008, 2009), y promover la germinación (Kucera et al. 2005). Por consiguiente, se presume que la mayor germinación alcanzada en *O. grandiflora* y *W. fagaroides* se debe a que el AG<sub>3</sub> logró romper la dormancia de aquellas semillas dormantes. Por otro lado, a pesar de que el *M. rhopaloides* no presentó dormancia fisiológica, es probable que el AG<sub>3</sub> aceleró la germinación, reduciendo el nivel de ABA y los días hasta la germinación. Esto ha permitido registrar una mayor germinación durante su periodo de evaluación (30 días). Estudios realizados por Chien et al. (1998) y Chen et al. (2007, 2008, 2009) demostraron que existe un alto contenido de ABA en las semillas no germinadas y un bajo contenido de AG. De la misma manera se registró un decremento del ABA y un incremento de las AG durante el proceso de germinación, lo que implica la ruptura de la dormancia. Además reportaron que la aplicación de AG exógeno incrementa la germinación de manera significativa (Chien et al. 1998 y Chen et al. 2007, 2008, 2009).

Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio se difieren de los obtenidos por Chen et al. (2007) en *Prunus campanulata* donde demostró que la aplicación de AG<sub>3</sub> endógeno no es muy efectiva en promover la germinación de semillas que la testa no ha sido removido. Coinciden con los resultados obtenidos por Chien et al. (1998) en *Taxus mairei* y Quiroz et al. (2009) quienes reportaron que la aplicación de 250 ppm de AG redujo la germinación de la *Weinmannia trichosperma* en un 27% con respecto al control.



Se presume que la disminución de la germinación producido en *M. rhopaloides* y *O. grandiflora* por el  $H_2SO_4$  se debe al daño que produjo, tanto al tipo de embrión (periférico es decir tuvo contacto directo con el  $H_2SO_4$ ) que presentan estas especies, como también el tiempo de exposición. Este último que podría justificarse por la mayor germinación registrada en *W. fagaroides* con la aplicación del  $H_2SO_4$  por 3 y 5 minutos. También por la disminución de la germinación en el nivel 10 minutos de exposición al  $H_2SO_4$ , y el tipo de embrión (lineal totalmente desarrollado es decir que está protegido por los cotiledones) que presentó. Estos resultados son similares a los obtenidos por Mandujó et al. (2005) en *Opuntia rastrera* donde se demostró que la escarificación ácida es perjudicial para las semillas debido a que redujo la germinación con respecto al control. Además, esta disminución en la germinación podría deberse a que la penetración del ácido dentro de la semilla (Zarchini et al. 2011) y los daños causados al embrión (Zarchini et al. 2011; Botsheleng et al. 2014). Por otro lado, podría deberse a que las semillas colocadas en ácido sulfúrico concentrado se convierten en carbón vegetal en el tiempo. Por lo tanto, la temperatura del ácido y la duración del tiempo de remojo son muy importantes (Mousavi et al. 2011; Warakagoda & Subasinghe, 2015). Este último factor que depende de la temperatura, la concentración del ácido y el tipo de semilla (Abdalla, 2004). Es así que las concentraciones y los tiempos de exposición utilizados en este estudio posiblemente no fueron los adecuados.

El *H. luteynii* tuvo un comportamiento muy particular. Presentó una germinación nula bajo todos los tratamientos; a excepción de la prueba de imbibición que presentó cinco semillas germinadas. Bajo este resultado alcanzó su primera germinación después de un periodo de tiempo 92 días, lo cual se puede explicar por el alto porcentaje de semillas vacías que presentó esta especie. De hecho, las dos razones más fácilmente identificadas en el fracaso de la germinación de las semillas son: la ausencia del embrión (semilla vacía) y el deterioro total del endospermo (Kolotelo, 1997); debido a una polinización deficiente, pobre desarrollo de los gametofitos, fertilización deficiente o degeneración del embrión



como resultado de la autofecundación (Markiewicz, 2006). Incluso, muchas gimnospermas y algunas angiospermas han retrasado la fertilización que tiene lugar mucho después de la polinización y el inicio del desarrollo de frutos. Es así que el fracaso de la fecundación o el aborto del embrión pueden resultar en semillas vacías o frutos vacíos (Fuentes & Schupp, 1998).

Es importante recalcar que el porcentaje de viabilidad de las semillas para las especies *H. luteynii* y *M. rhopaloides* se coincidió con sus porcentajes de germinación. Sin embargo, para *W. fagaroides* y *O. grandiflora* el porcentaje de viabilidad de las semillas no coincidió con los altos porcentajes de germinación obtenidos en algunos tratamientos, con el AG<sub>3</sub> por ejemplo. Ante esto se presume que existió una variación en los lotes de semillas de estas especies. Al respecto, Schmidt (2007) mencionó que existen diferentes tipos de dormancia y a veces más de una puede estar presente en la misma semilla, incluyendo semillas de un mismo lote. Por otra parte, Rao et al. (2006) reportaron que la prueba de tetrazolio no es una prueba absoluta de la viabilidad de semillas. Por lo tanto, para obtener fiabilidad esta prueba debe compararse con los resultados de las pruebas de germinación para cada especie (Rao et al. 2006).





## **CAPITULO VIII: CONCLUSIONES**

### **8.1. Características morfológicas y fisiológicas de las cuatro especies nativas:**

Las cuatro especies estudiadas: *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* presentaron testa permeable, por lo tanto, no presentaron dormancia física. Sin embargo, se constató la presencia de la dormancia fisiológica en las especies *O. grandiflora* y *W. fagaroides*.

Las especies *M. rhopaloides* y *O. grandiflora* presentaron embriones periféricos; mientras que las especies *H. luteynii* y *W. fagaroides* presentaron embriones lineal subdesarrollado y lineal totalmente desarrollado, respectivamente.

El color de la semilla fue un indicador de calidad para las especies *H. luteynii* y *O. grandiflora*. Por ejemplo, en *O. grandiflora* se observó claramente la relación entre el color y la capacidad de germinación, observando una germinación nula en las semillas de color gris claro; mientras que en las semillas de color naranja amarillo claro y marrón se registró un alto promedio de semillas germinadas, siendo 20.75 y 21.25 respectivamente.

Se presentó una correlación entre el largo y la germinación de las semillas de *O. grandiflora* de modo que mientras más largas fueron más temprano germinaron. Esta correlación no fue concluyente debido a que el  $R^2$  explicó solo el 10% de esta correlación, a más de ser estadísticamente no significativa.

### **8.2. Influencia de los tratamientos térmicos en la germinación de las cuatro especies nativas:**

Las especies *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* no presentaron diferencia ni en la germinación, ni en los días hasta la germinación para los tratamientos térmicos. Sin embargo con la estratificación fría los días hasta la germinación tienden a reducirse; mientras que con la estratificación caliente tienden a prologarse.



### 8.3. Influencia del AG y el ácido sulfúrico en la germinación de las cuatro especies nativas:

La respuesta germinativa de las especies *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* al AG fue similar, pese a que la germinación y los días hasta la germinación variaron tanto entre especies como entre niveles. El AG fue el tratamiento que produjo una germinación más alta y un número de días hasta la germinación menor que los otros tratamientos para todas las especies. Mientras que la escarificación ácida fue el tratamiento que produjo una germinación menor para todas las especies que los otros tratamientos, produciendo una disminución de la germinación del *M. rhopaloides* y el *O. grandiflora*; mientras que en *W. fagaroides* produjo una germinación mayor que el control.

La especie *H. luteynii* no presentó ninguna germinación para todos los tratamientos, a excepción de la prueba de imbibición, en la cual se registraron cinco semillas germinadas.



## CAPITULO IX: RECOMENDACIONES

- Usar el AG como tratamiento pregerminativo para las especies *H. luteynii*, *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*.
- Profundizar las investigaciones con AG, probando diferentes dosis y tiempo de exposición, considerando que si bien incrementa la germinación puede modificar la morfología de la plántula.
- Recolectar los frutos de *O. grandiflora* cuando alcanza su madurez óptimo, es decir, cuando los frutos empiezan a amarillarse.
- Profundizar las investigaciones acerca del *H. luteynii*, en cuanto a la reproducción, biología y ecología de semillas.
- Tomar en cuenta la capacidad de imbibición y el tipo de embrión de las especies para elegir los tratamientos pregerminativos y sus concentraciones.
- Comunicar la información generada en este estudio a viveristas, instituciones públicas y privadas, encargados de programas de reforestación, entre otros.



## CAPÍTULO X: BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, MA. 2000. Effect of Seed Scarification Methods on Germination and Seed Vigor of Poinciana. (*Delonix regia*). (en línea). Consultado 15 oct. 2016. Disponible en [http://khartoumspace.uofk.edu/bitstream/handle/123456789/10902/Effect%20Of%20Seed%20Scarification%20Methods%20On%20Germination%20And%20Seed%20Vigor%20Of%20Poinciana.%20\(Delonix%20Regia%20\).pdf?sequence=1](http://khartoumspace.uofk.edu/bitstream/handle/123456789/10902/Effect%20Of%20Seed%20Scarification%20Methods%20On%20Germination%20And%20Seed%20Vigor%20Of%20Poinciana.%20(Delonix%20Regia%20).pdf?sequence=1)
- Amusa, TO. 2011. Effects of three pre-treatment techniques on dormancy and germination of seeds of *Afzelia africana* (Sm. Ex pers). Journal of Horticulture and Forestry. 3(4):96-103.
- Atis, I; Atak, M; Can, E; Mavi, K. 2011. Seed coat color effects on seed quality and salt tolerance of red clover (*Trifolium pratense*). Int. J. Agric. Biol. 13: 363–368.
- Baskin, CC; Baskin, JM. 1988. Germination Ecophysiology of Herbaceous Plant Species in a Temperate Region. American Journal of Botany. 75(2):286-305.
- Baskin, CC; Baskin, JM. 2007. A revision of Martin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. Seed Science Research. 17:11-20. doi:10.1017/S0960258507383189
- Baskin, JM; Baskin, CC. 2004. A classification system for seed dormancy. Seed Science Research. 14:1-16.
- Baskin, JM; Baskin, CC. 2014. Germination Ecology of Seeds with Morphophysiological Dormancy. In Seeds Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. 2 ed. San Diego, US, Elsevier Inc. 119-143 p.
- Botsheleng, B; Mathowa, T; Mojeremane, W. 2014. Effects of Pre-Treatments Methods on the Germination of Pod Mahogany (*Afzelia Quanzensis*) and Mukusi (*Baikiaea Plurijuga*) Seeds. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. 3 (1). s.p.



- Castillo Guizado, OJ. 2013. Inventario de especies arbóreas del bosque nativo San José de Las Palmas, parroquia San Pablo, cantón San Miguel, provincia de Bolívar. Tesis Lic. Guaranda, EC. Universidad Estatal de Bolívar. 210 p.
- Chen, SY; Chien, CT; Baskin, JM; Baskin, CC. 2009. Storage behavior and changes in concentrations of abscisic acid and gibberellins during dormancy break and germination in seeds of *Phellodendron amurense* var. *wilsonii* (Rutaceae). *Tree Physiology*. 30(2):275-284.
- Chen, SY; Kuo, SR; Chien, CT. 2008. Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (*Myrica rubra*) seeds. *Tree Physiology*. 28 (9):1431-1439.
- CHIEN, CT; KUO-HUANG, LL; LIN, TP. 1998. Changes in Ultrastructure and Abscisic Acid Level, and Response to Applied Gibberellins in *Taxus mairei* Seeds Treated With Warm and Cold Stratification. *Annals of Botany*. 81:41-47.
- Courtis, AC. 2013. Germinación de semillas. (en línea). Consultado 3 mayo. 2015. Disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/GuiadeestudioGerminacion.pdf>
- Delgado, ER. 2013. Elaboración de una guía de educación ambiental y turística del bosque protector aguarongo destinada a niños de 6 a 11 años. Tesis Lic. Cuenca, EC. Universidad de Cuenca. 328 p.
- Espinoza, VM. 2008. Análisis de calidad y comportamiento de semillas de lupina (*Cytisus monspensulanus*) de origen conocido en distintas comunidades de Chimborazo. Tesis Lic. Riobamba, EC. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 107 p.
- FAO. (2014). Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev.ed. Rome.
- Fontenla Razzetto, G. 2006. Caracterización del aceite esencial de "Lanche" (*Myrciantes rhopaloides* (H.B.K) Mc Vaugh) proveniente del distrito de Chalaco, provincia de Morropón – Piura, obtenido por dos métodos de



- destilación. Tesis Lic. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 81 p.
- Fuentes, M; Schupp, EW. 1998. Empty seeds reduce seed predation by birds in *Juniperus osteosperma*. *Evolutionary Ecology*. 12:823-827.
  - GAD Parroquial Octavio Cordero Palacios. s.f. Actualización del plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la parroquia Octavio Cordero. (en línea). Consultado 25 nov. 2015. Disponible en [http://app.sni.gob.ec/visorseguimiento/DescargaGAD/data/sigadplusdiagnostico/0160027630001\\_ACTUALIZACION\\_PDOT\\_OCTAVIO\\_CORDERO\\_PALACIOS\\_15-05-2015\\_01-01-18.pdf](http://app.sni.gob.ec/visorseguimiento/DescargaGAD/data/sigadplusdiagnostico/0160027630001_ACTUALIZACION_PDOT_OCTAVIO_CORDERO_PALACIOS_15-05-2015_01-01-18.pdf)
  - Gandhi, D; Albert, S; Pandya, N. 2011. Morphological and micromorphological characterization of some legume seeds from Gujarat, India. *Environmental and Experimental Biology*. 9:105-113.
  - Gimeno-Gilles, C. 2009. Étude cellulaire et moléculaire de la germination chez *Medicago truncatula*. Tesis Ph.D. Angers, FR. Universidad de Angers. 175 p.
  - González-Salvatierra, C; Badano, EI; Flores, J; Rodas, JP. 2013. Germinación, infestación y viabilidad en bellotas de *Quercus polymorpha* (Schltdl. & Cham.) tras un año de almacenamiento. *Revista Chapingo*. 19(3):351-362.
  - Guerrero Sánchez, JV; Luzón Herrera, SD. 2012. Evaluación de los principales productos forestales no maderables de origen vegetal de la cuenca del río San Francisco, cantón Zamora, provincia de Zamora Chinchipe". Tesis Lic. Loja, EC. Universidad Nacional de Loja. 149 p.
  - Iñiguez Loján, LF. 2008. Propagación en vivero de seis especies forestales promisorias de la zona seca de la provincia de El Oro, para la reforestación en áreas de explotación de material pétreo y embellecimiento vial del proyecto Huaquillas – Santa Rosa. Tesis Lic. Loja, EC. Universidad Nacional de Loja. 142 p.
  - Jiménez Pesántez, MC. 2013. Dormancia y germinación en semillas de *Hesperomeles ferruginea* (Pers.) Benth (Rosaceae) un árbol nativo con



- potencial para la restauración ecológica. Tesis Lic. Cuenca, EC. Universidad Del Azuay. 52 p.
- Kildisheva, OA; Dumroese, RK; Davis, AS. 2011. Overcoming Dormancy and Enhancing Germination of *Sphaeralcea munroana* Seeds. HortScience. 46(12):1672-1676.
  - Kolotelo, D. 1997. Anatomy & Morphology of Conifer Tree Seed. Forest Nursery Technical Series; 1.1. B.C. Ministry of Forests, Surrey, B.C., Canada, 70 p.
  - Markiewicz, P. 2006. Problems With Seed Production Of European Larch In Seed Orchards In Poland. Forest Research Institute, Department of Genetics and Forest Tree Physiology, Tree Physiology Sękocin Stary, Braci Leśnej Street No 3, 05-090 Raszyn, POLAND.
  - Matthew; Napierala. 2012. What Is the Bonferroni Correction? AAOS Now. (en línea). Consultado 08 oct. 2016. Disponible en <https://docs.ufpr.br/~giolo/CE073/Dados/Apendice/Bonferroni%20Correction.pdf>
  - Mavi, K. 2010. The relationship between seed coat color and seed quality in watermelon Crimson sweet. Horticulture Science. (Prague). 37:62–69.
  - Ministerio del Ambiente (MAE). 2012. Línea Base de Deforestación del Ecuador Continental. (en línea). Consultado 4 ago. 2015. Disponible en <http://sociobosque.ambiente.gob.ec/files/Folleto%20mapa-parte1.pdf>
  - Ministerio Del Ambiente, MAE. 2016. 20 mil voluntarios se suman a reforestación nacional Mi Bosque del futuro. (en línea). Consultado 20 oct. 2016. Disponible en <http://www.ambiente.gob.ec/20-mil-voluntarios-se-suman-a-reforestacion-nacional-mi-bosque-del-futuro/>
  - Mohammadi, G; Khah, EM; Honarmand, SJ; Shirkhani, A; Shabani, G. 2012. Effects of Seed hardness Breaking Techniques on Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) Germination. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 4(6):264-273.
  - Molina, L. 2001. El buen sembrador. Manual de producción ecológica de plantas forestales autóctonas. Madrid, Esp, Artes Gráficas Iris, S.A. 36 p.



- Montgomery, DC; Runger, GC 2003. Applied Statistics and Probability for Engineers. 3 ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, US. 976 p.
- Morales, JF. 2010. Sinopsis del género *Weinmannia* (Cunoniaceae) en México y Centroamérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 67(2):137-155.
- Moreno Casasola, P. 1996. Vida y obra de granos y semillas. (en línea). Consultado 6 sep. 2015. Disponible en <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/146/htm/vidayob.htm>
- Mousavi, SR; Rezaei, M; Mousavi, A. 2011. A general overview on seed dormancy and methods of breaking it. *Advances in Environmental Biology*, 3333-3338.
- Nonogaki, H; Bassel, GW; Bewley, JD. 2010. Germination—Still a mystery. *Plant Science*. 179(6): 574-581.
- Okunlola, AI; Adebayo, RA; Orimogunje, AD. 2011. Methods of braking seed dormancy on germination and early seedling growth of African locust bean (*Parkia biglobosa*) (JACQ.) Benth. *Journal of Horticulture and Forestry*. 3(1):1-6.
- Orozco-Segovia, A., Márquez-Guzmán, J., Sánchez-Coronado, M. E., Gamboa de Buen, A., Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2007). Seed Anatomy and Water Uptake in Relation to Seed Dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Annals of Botany*. 99(4):581–592.
- Prado, L; Samaniego, C; Ugarte-Guerra, J. 2010. Estudio de las cadenas de abastecimiento de germoplasma forestal en Ecuador. ICRAF Working Paper no. 115. World Agroforestry Centre (ICRAF). Lima, PE.
- Quiroz Marchant, I; García Rivas, E; Gonzáles Ortega, M; Chung Gun-Po, P; Soto Guevara, H. 2009. Vivero Forestal: Producción de plantas nativas a raíz cubierta. Chile. *INFOR*. 128 p.
- Quishpe Ibujés, JA. 2009. Evaluación de seis tratamientos pre germinativos y cuatro tipos de sustratos para la propagación de arupo (*Chionanthus*





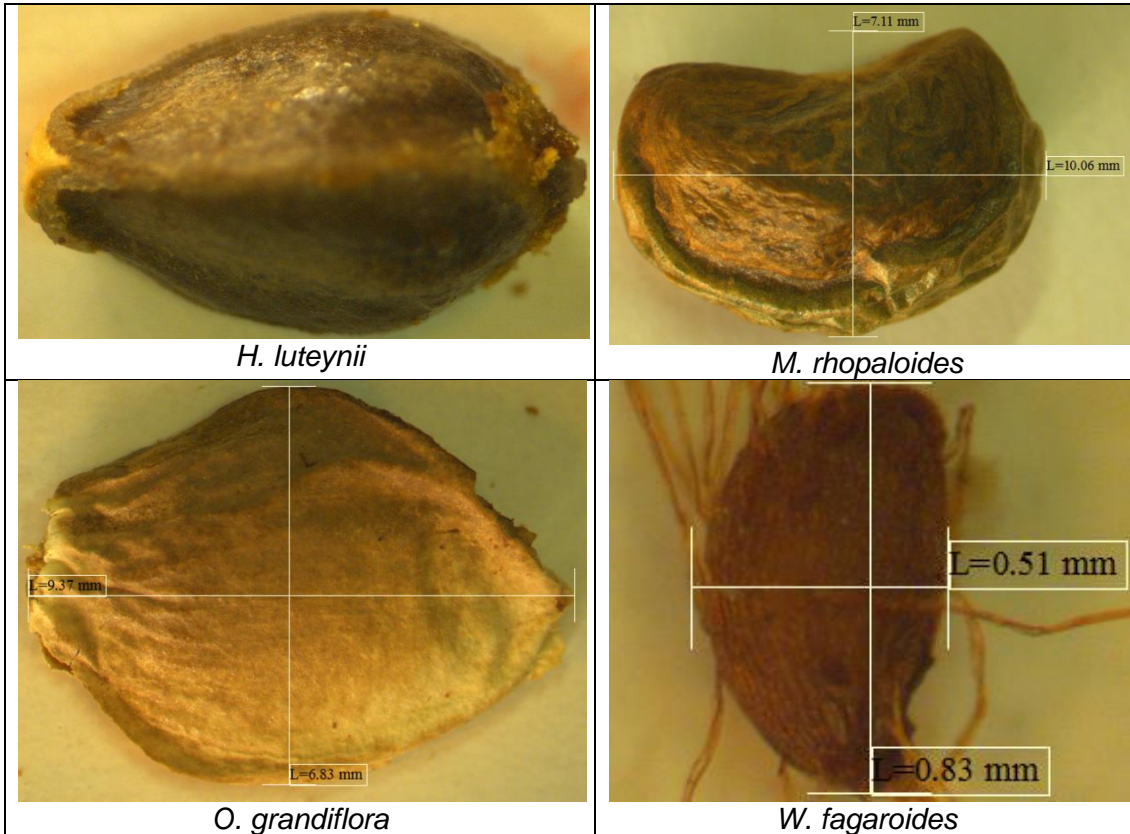
- pubescens* kunt.). Tesis Lic. Riobamba, EC. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 147 p.
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D and Larinde M. 2006. Manual of seed handling in genebanks. Handbooks for Genebanks No. 8. Bioversity International, Rome, Italy.
  - Revised standard soil colour charts, 1992. Eijkelkamp Agrisearch Equipment, The Netherlands.
  - Reynel, C; J. Marcelo. 2009. Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Serie Investigación y Sistematización No. 9. Programa Regional ECOBONA – INTERCOOPERATION. Lima.
  - Robertson BI; Small JGC. 1977. Germination of *Jubaeopsis caffra* seeds. Principles. 21(3):114-122.
  - Rodriguez Romero, J; Nieto Rodriguez, VM. 1999. Investigación en semillas forestales nativas. Santafé de Bogotá, Col, Penclips Editores. 89 p.
  - Saldías, G; Velozo, J. 2014. Estudio de la propagación de *Myrcianthes coquimbensis* (Barnéoud) Landrum et Grifo por semillas y esquejes. Gayana. Botánica. 72(1): s.p.
  - Salinas Jumbo, PA. 2013. Evaluar la propagación sexual de especies forestales en invernadero najo cuatro tipos de sustratos de la cuenca del río San Francisco del Cantón Zamora, provincia de Zamora Chinchipe. Tesis Lic. Loja, EC. Universidad Nacional de Loja. 76 p.
  - Schmidt, LH. 2000. Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. Danida Forest Seed Centre.
  - Schmidt LH. 2007. Tropical forest seeds: Seed Dormancy and Presowing Treatment. Tropical Forestry. 199-245 p.
  - Shun-Ying, C; Ching-Te, C; Jeng-Der, C; Yuh-Shyong, Y; Shing-Rong, K. 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. 17:21-32. doi:10.1017/S0960258507383190



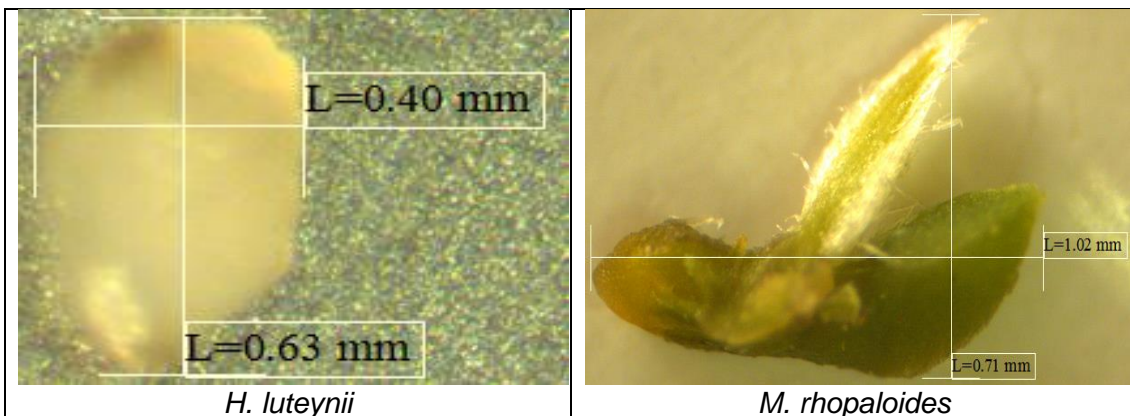
- Silvia Eufemia, GC. 2010. “Reproducción y aclimatación de cuatro especies nativas forestales: Quinoa (*Polylepis spp*), Romerillo (*Podocarpus sp*), Nogal (*Juglans regia*), Arrayán (*Myrcianthes sp*)” en el campus Juan Lunardi. Tesis Lic. Azuay, EC. Universidad Politécnica Salesiana. 94 p.
- Susko, D; Lovett-Doust, L. 2000. Patterns of Seed Mass Variation and Their Effects on Seedling Traits in *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*. 87(1):56-66.
- The International Seed Testing Association, ISTA. 2007. International rules for seed testing. Primera ed. CH-Switzerland.
- Thomas, E; Jalonen, R; Loo, J; Boshier, D; Gallo, L; Cavers, S; Bordács, S; Smith, P; Bozzano, M. 2014. Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species.
- Walters, C; Berjak, P; Pammenter, N; Kennedy, K; Raven P. 2013. Preservation of recalcitrant seeds. *Science* 339:915–916.
- Warakagoda, PS; Subasinghe, S. 2015. Studies on seed germination of *Coscinium fenestratum* (Menispermaceae): A threatened medicinal plant. *International Journal of Minor Fruits, Medicinal and Aromatic Plants*. 1(1):10p.
- Zahia, A. 2014. Contribución al estudio de la germinación y de los primeros estados de desarrollo de *Hedysarum sp*. Tesis M.Sc. Tizi Ouzou, Algeria. Universidad Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzo, 95 p.
- Zarchini, M; Hashemabadi, D; Kaviani, B; Fallahabadi, PR; Negahdar, N. Improved germination conditions in *Cycas revoluta* L. by using sulfuric acid and hot water. *Plant Omics Journal*. 4(7):350-353.
- Zorić, L; Merkulov, L; Luković; Boža, P. 2010. Comparative seed morphology of *Trifolium* L. Species (Fabaceae). *Periodicum Biologorum*. 112(3):263–272.

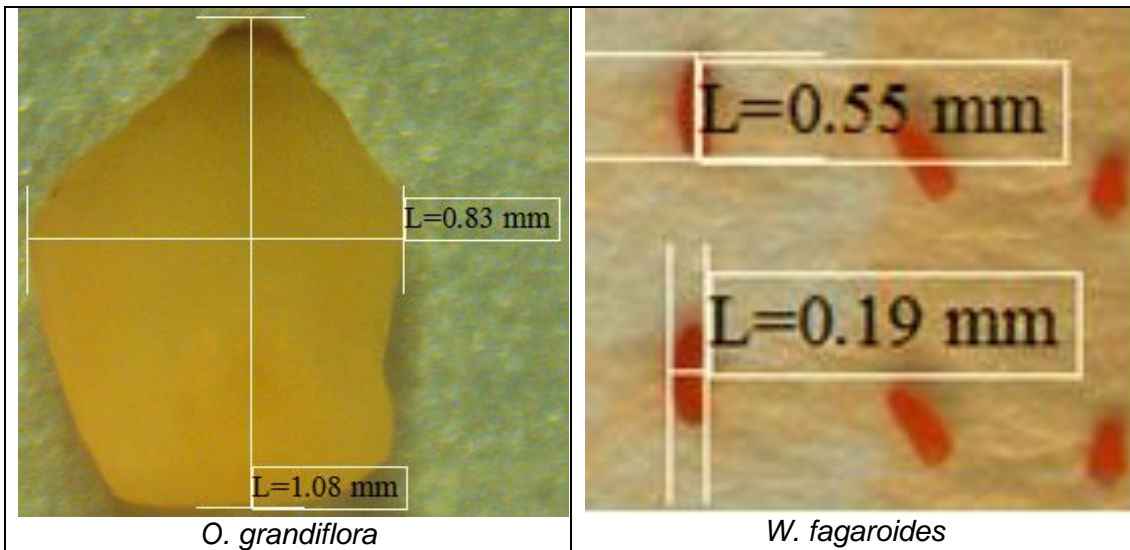
## CAPITULO XI: ANEXOS

### Anexo 1: Semillas de las cuatro especies nativas.

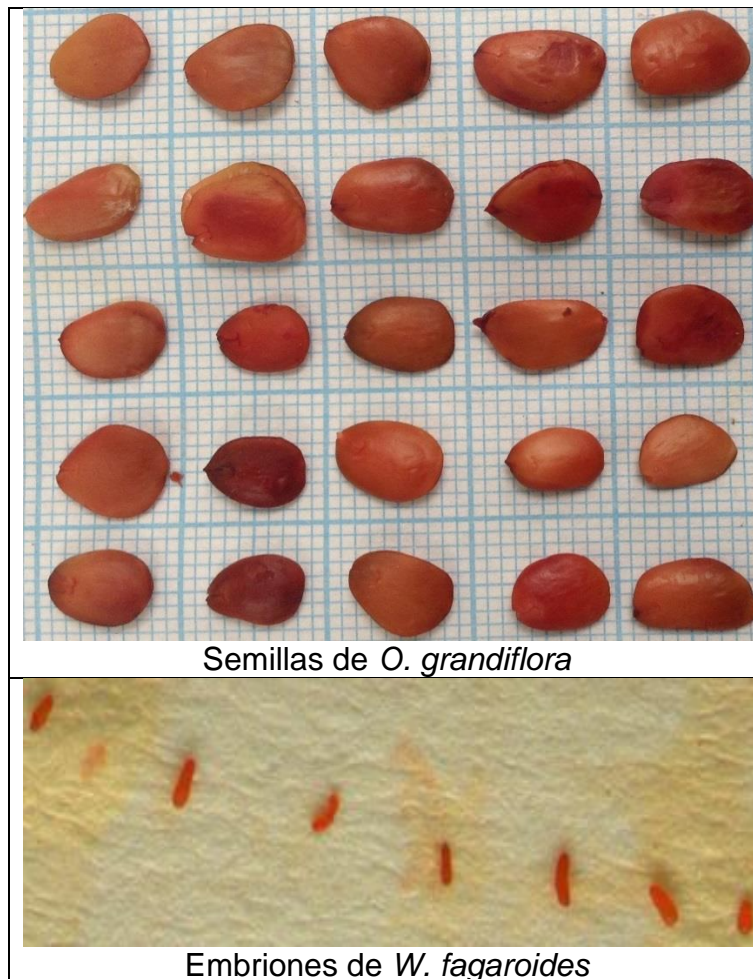


### Anexo 2: Embriones de las cuatro especies nativas.





**Anexo 3:** Semillas de *O. grandiflora* y embriones de *W. fagaroides* después de la prueba de tetrazolio.



**Anexo 4:** Germinación de las especies *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*.



*M. rhopaloides*



*O. grandiflora*

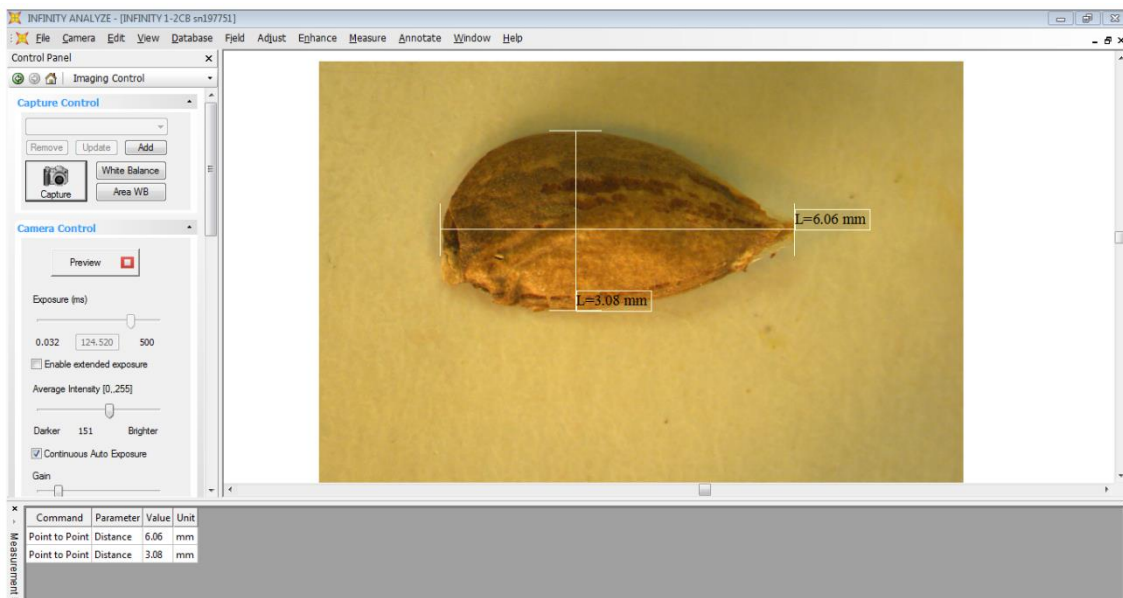


*W. fagaroides*

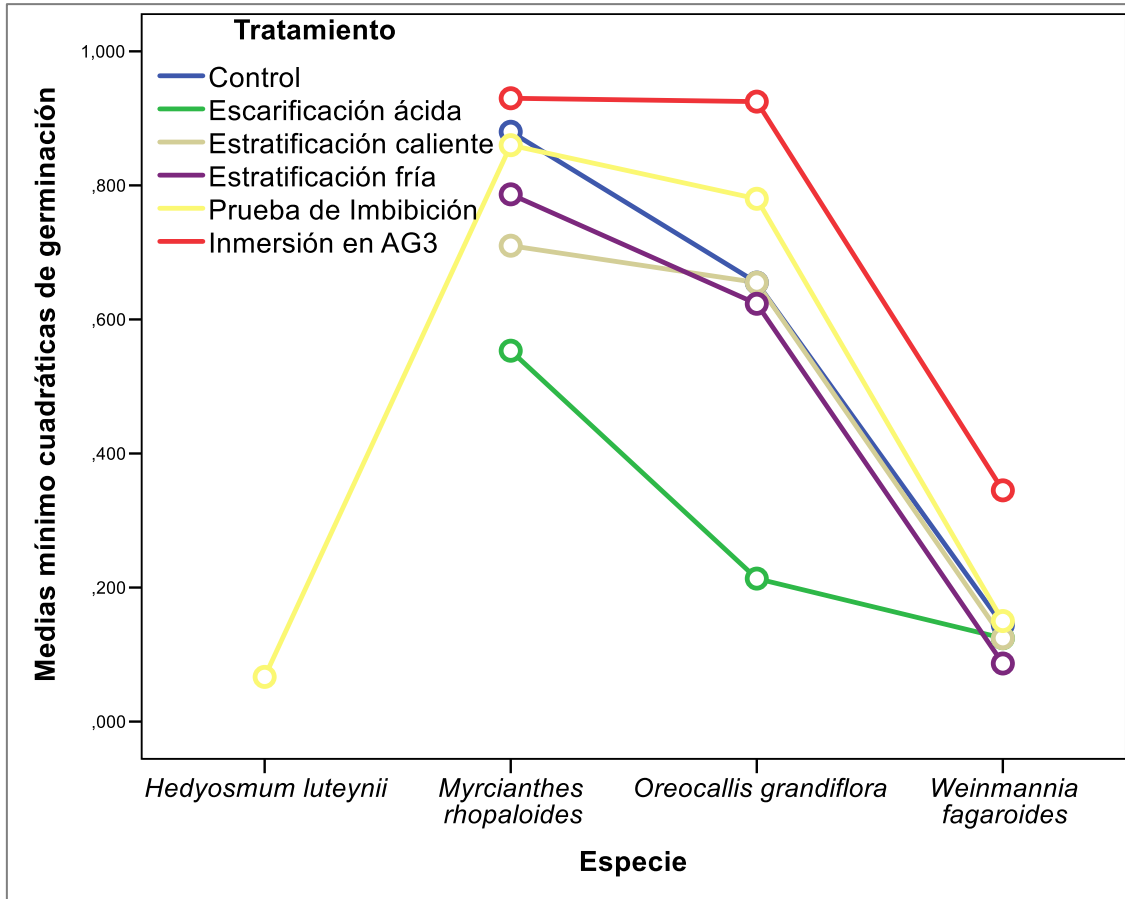
**Anexo 5:** Ilustración de la selección aleatoria de las 50 semillas para la prueba de correlación.



**Anexo 6:** Ilustración de medición de semillas mediante el programa **INFINITY ANALYZE 1**.



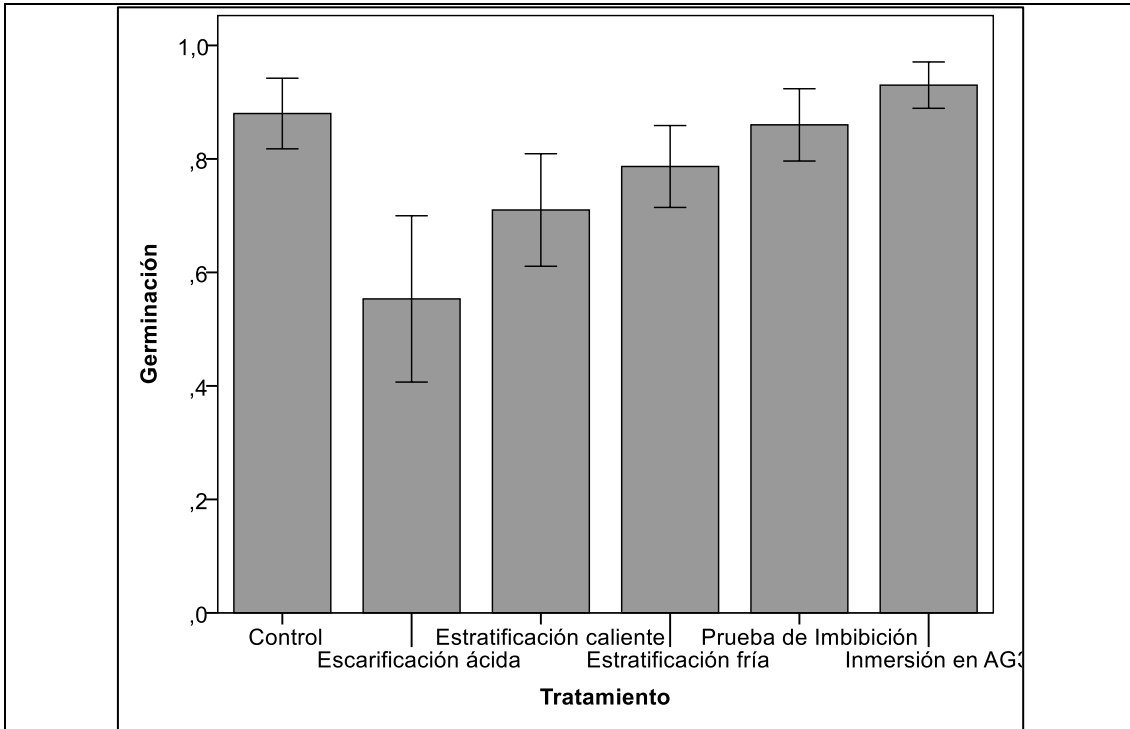
**Anexo 7:** Gráfico comparativo de las medias de la germinación de las cuatro especies nativas por tratamiento.



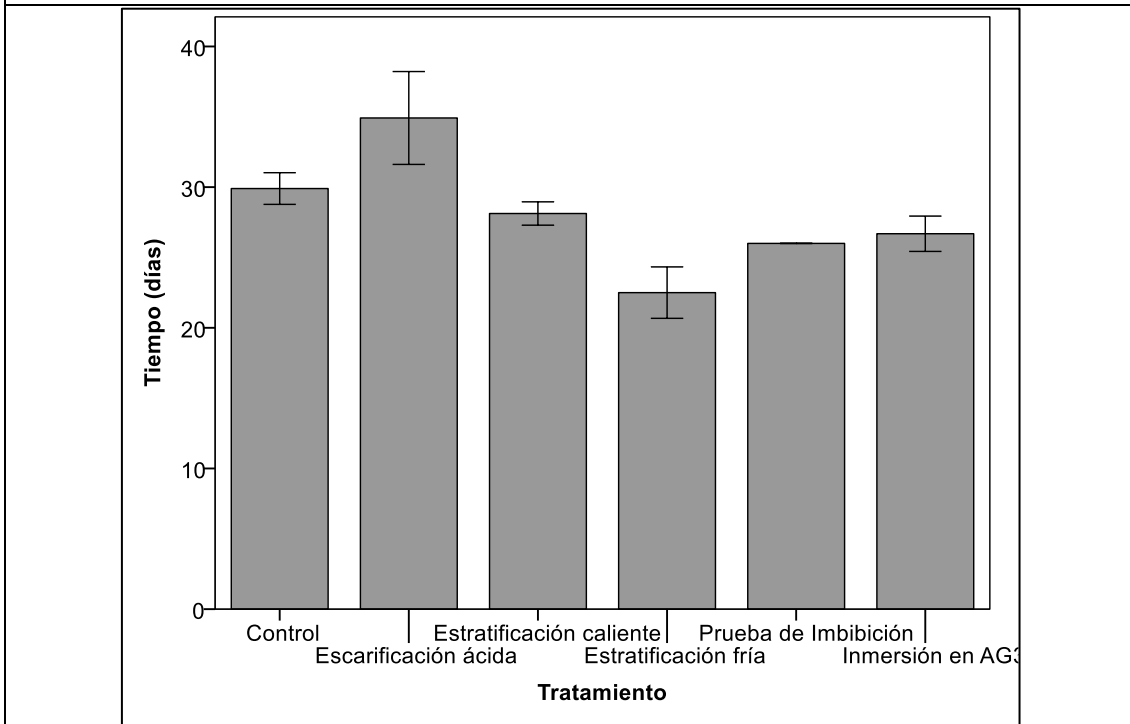


**Anexo 8:** Gráficos comparativos de las medias de la germinación y tiempo hasta la germinación por tratamiento para las especies *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*.

**1. *M. rhopaloides*:**

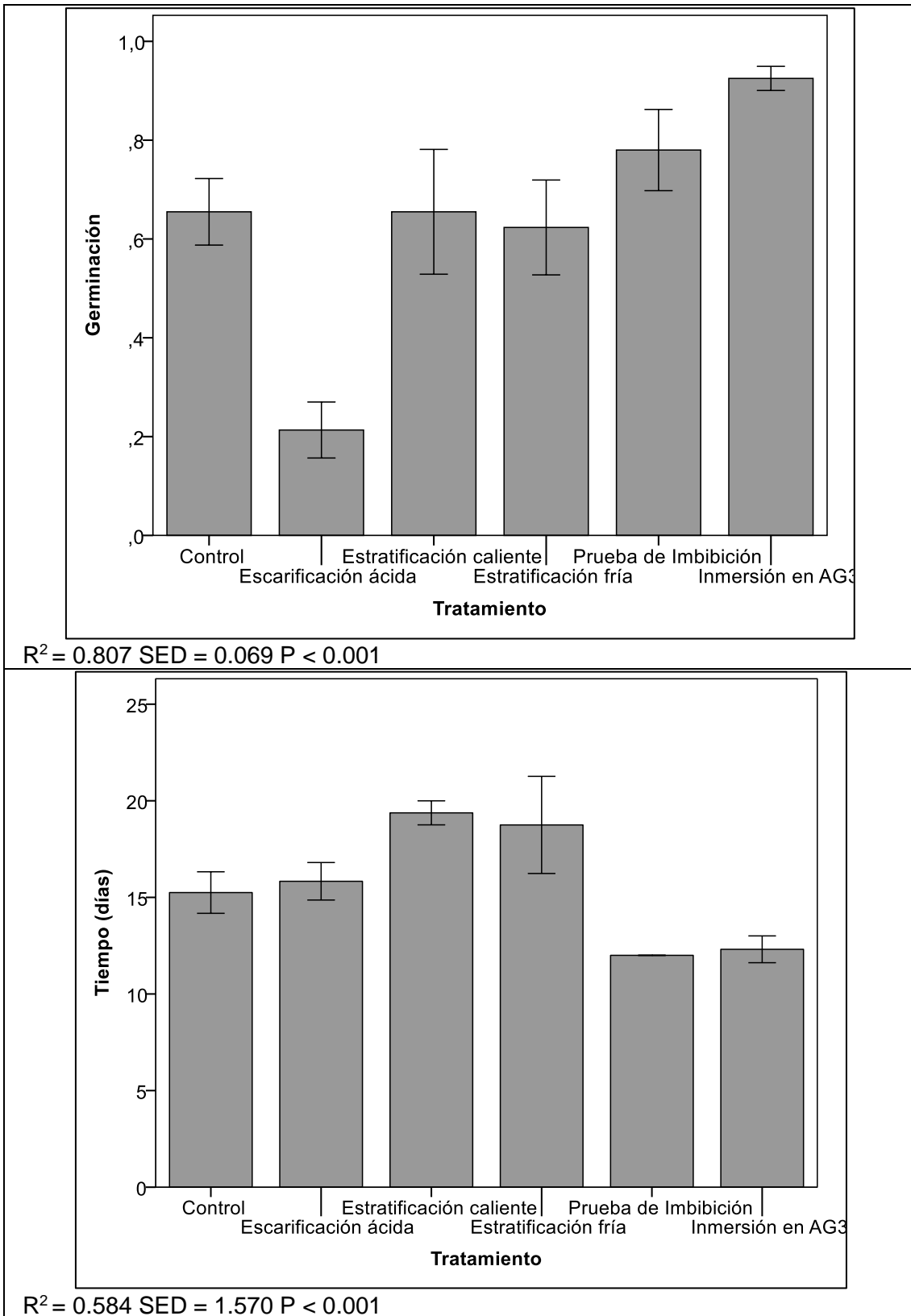


$R^2 = 0.452$  SED = 0.084 P < 0.001

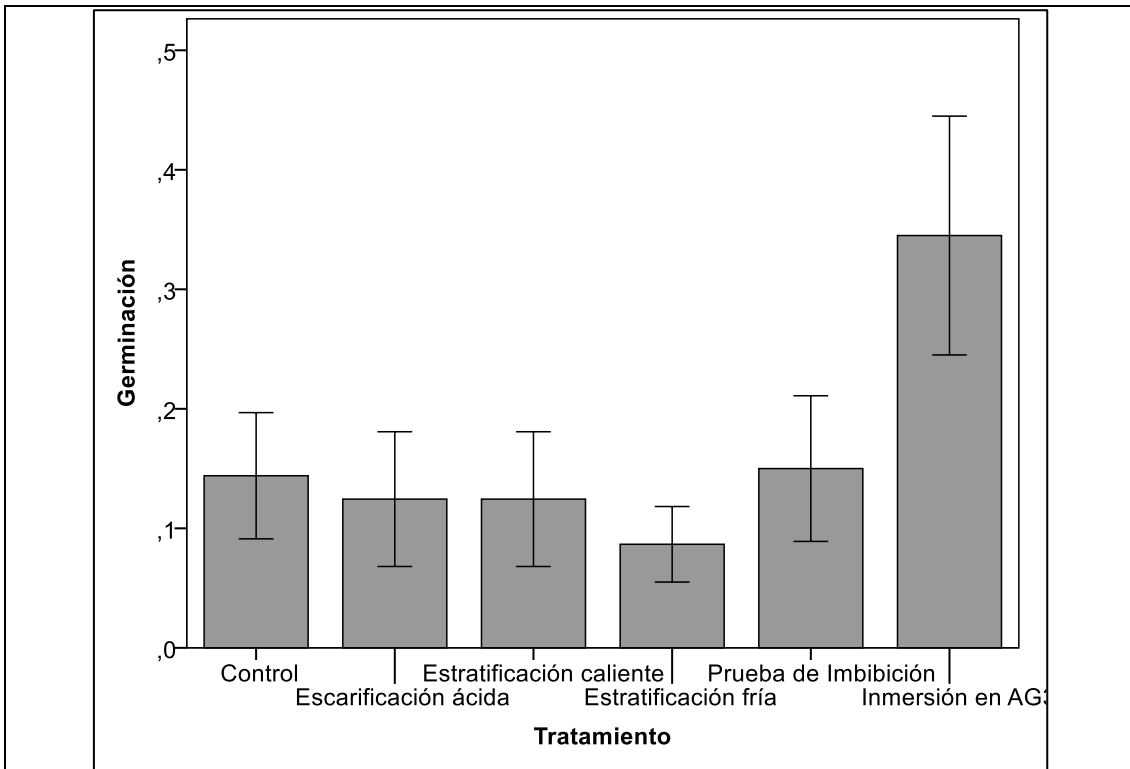


$R^2 = 0.612$  SED = 1.828 P < 0.001

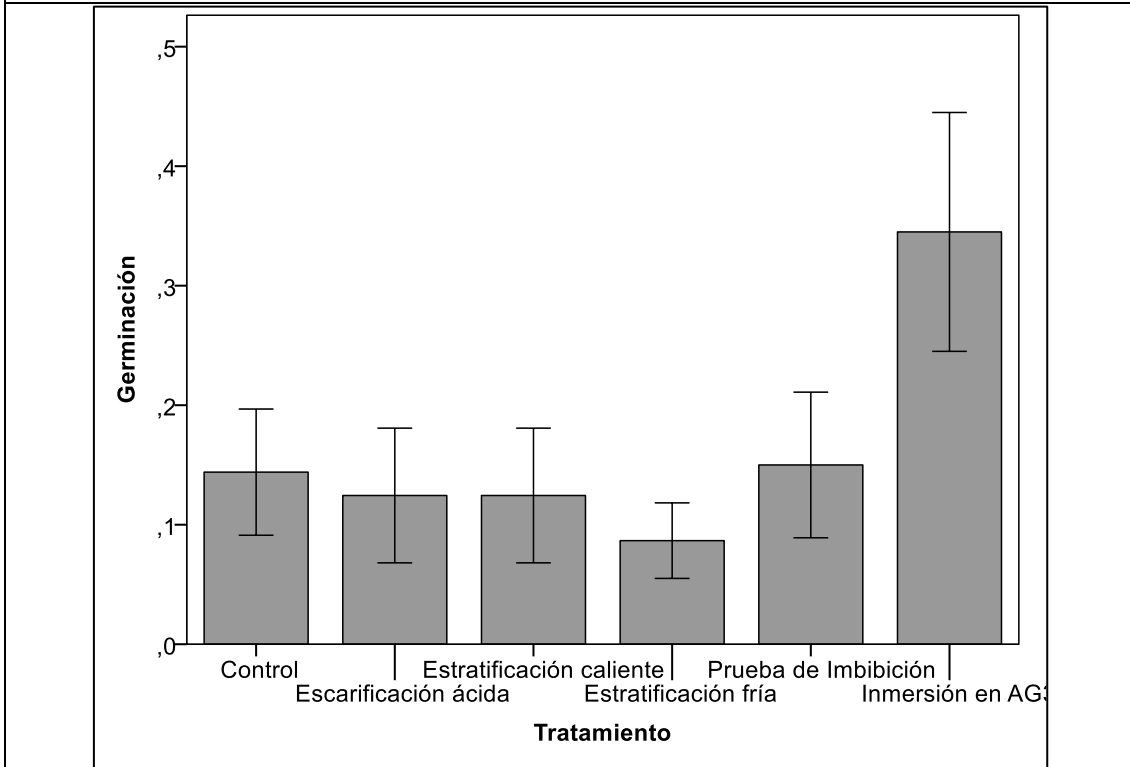
## 2. *O. grandiflora*:



3. *W. fagaroides*:



$R^2 = 0.375$  SED = 0.077 P < 0.001



$R^2 = 0.644$  SED = 2.211 P < 0.001