



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**“Estudio de la germinación y desarrollo inicial de tres especies forestales nativas del
Bosque Protector Yanuncay - Irquis.”**

*Trabajo de titulación previa a la obtención
del título de Ingeniero Agrónomo*

AUTORES:

Piña Ramírez Elsa Gabriela
C.I: 0105504625
lala_gaby_123@live.com

Sarmiento Vanegas Denis Sebastián
C.I: 0105450134
denissebastian_@hotmail.com

DIRECTORA:

Ing. Paulina Germania Villena Ochoa, Msc.
C.I: 0102263860
paulina.villena@ucuenca.edu.ec

CUENCA, ECUADOR

24 de septiembre de 2020



RESUMEN

Para estudiar la germinación y desarrollo inicial de tres especies forestales nativas (*Clusia sp.*, *Podocarpus sprucei* y *Viburnum triphyllum*) del bosque Protector Yanuncay - Iruquis, se aplicaron pruebas de viabilidad e imbibición (caracterización física), también se cuantificó el tamaño de las semillas y de los embriones, a estos últimos se los clasificó por su tipo y posición (caracterización morfológica). Posteriormente, las semillas fueron sometidas a tratamientos pre germinativos físicos (estratificación fría, estratificación caliente) y químicos (remojo en solución hormonal, escarificación ácida) en diferentes tiempos de inmersión. Existió diferencia significativa (Kruskal Wallis) en el porcentaje de germinación de las tres especies. *P. sprucei* presentó resultados significativos en escarificación ácida por 3 minutos (62%) y en estratificación fría por 21 días (60%); *Clusia sp.*, obtuvo resultados significativos tanto en escarificación ácida durante 5 y 10 minutos de inmersión (83% y 84%), así como en estratificación caliente a 30°C (89%); *V. triphyllum* presentó resultados significativos en estratificación caliente a 30°C (80%) y 40°C (82%). Las plántulas obtenidas fueron monitoreadas durante dos meses bajo condiciones de invernadero (temperatura promedio = 17°C, humedad relativa = 79,86%, 12 horas luz y 12 horas de oscuridad). Se aplicaron pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis) y pruebas post hoc (Nemenyi) para identificar diferencias significativas en las variables: altura, número de hojas y supervivencia de las plántulas. *Clusia sp.*, obtuvo diferencias significativas tanto en altura, número de hojas y supervivencia. *V. triphyllum* obtuvo diferencias significativas en la supervivencia; *P. sprucei*, no mostró diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas.

PALABRAS CLAVES: *Podocarpus sprucei*, *Clusia sp.*, *Viburnum triphyllum*, germinación, tratamientos pre germinativos, desarrollo inicial, forestales nativos.

**ABSTRACT**

To study the germination and initial development of three native forest species (*Clusia sp.*, *Podocarpus sprucei* and *Viburnum triphyllum*) from the Protector Yanuncay - Irquis forest, viability and imbibition tests (physical characterization) were applied, also the size of the seeds and of the embryos were quantified, the latter were classified according to their type and position (morphological characterization). Subsequently, the seeds were subjected to physical pre-germination treatments (cold stratification, hot stratification) and chemical treatments (soaking in hormonal solution, acid scarification) at different immersion times. There was a significant difference (Kruskal Wallis) in the germination percentage of the three species; *P. sprucei* presented significant results in acid scarification for 3 minutes (62%) and cold stratification for 21 days (60%); *Clusia sp.*, Obtained significant results so much in acid scarification during 5 and 10 minute immersion (83% and 84%), as in hot stratification at 30 ° C (89%); *V. triphyllum* presented significant results in the hot stratification at 30°C (80%) and 40 ° C (82%). The seedlings obtained were monitored for two months (initial development) under greenhouse conditions (average temperature = 17°C, relative humidity = 79.86%, 12 hours light and 12 hours dark). Non-parametric tests (Kruskal Wallis) and post hoc tests (Nemenyi) were applied to identify significant differences in the variables: height, number of leaves, and seedling survival. *Clusia sp.*, Obtained significant differences in the seeds exposed to acid scarification for 5 minutes both in height (5,7cm), number of leaves (5) and survival (100%); *V. triphyllum* obtained significant differences in survival; *P. sprucei* did not show significant differences in any of the variables studied.

KEY WORDS: *Podocarpus sprucei*, *Clusia sp.*, *Viburnum triphyllum*, germination, pre-germination treatments, initial development, native forests.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
LISTA DE TABLAS	9
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	13
AGRADECIMIENTOS	18
DEDICATORIA	19
1. INTRODUCCIÓN	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo General	23
2.2. Objetivos Específicos.....	23
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	23
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	24
4.1. La semilla.....	24
4.2 Germinación.....	24
4.3. Factores que intervienen en la germinación.....	25
4.3.1. <i>Factores intrínsecos</i>	25
4.3.2. <i>Factores extrínsecos</i>	26
4.3.3. <i>Latencia</i>	27
4.4. Tratamientos pre germinativos.....	30



4.4.1 *Tratamientos pre germinativos químicos* 30

4.4.2 *Tratamientos pre germinativos físicos*..... 31

4.5. *Desarrollo inicial* 32

4.6. *Características generales de las especies en estudio* 33

5. MATERIALES Y MÉTODOS **34**

5.1. *Descripción y ubicación del lugar de estudio*..... 34

5.2. *Colecta de semillas en campo* 36

5.3 *Manejo de experimentos en el laboratorio de Ecología forestal y semillas* 37

 5.3.1 *Selección de semillas* 37

 5.3.2 *Protocolo de desinfección de semillas*..... 37

 5.3.3 *Cuarto de crecimiento* 37

5.4. *Metodología para cumplir el Objetivo 1* 38

 5.4.1 *Caracterización física de las semillas de las tres especies forestales nativas* 38

 5.4.2 *Caracterización morfológica de las semillas de las tres especies forestales nativas* .. 38

5.5 *Metodología para cumplir el objetivo 2* 39

 5.5.1 *Establecimiento del experimento* 39

 5.5.2 *Aplicación de tratamientos* 39

 5.5.2.1 *Tratamientos físicos*..... 39

 5.5.2.2 *Tratamientos químicos*. 39

 5.5.2.3 *Testigo*. 40



5.5.3 Monitoreo 41

5.5.4 Post desinfección 41

5.6 Metodología para cumplir el objetivo 3 42

5.6.1 Establecimiento del experimento 42

5.6.2 Material vegetativo 42

5.6.3 Preparación del sustrato 42

5.6.4 Monitoreo 42

6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO 44

7. RESULTADOS 45

7.1 Objetivo 1 45

7.1.1 Caracterización morfológica de las tres especies forestales nativas 45

7.1.1.1 Tamaño de la semilla y el embrión..... 45

7.1.1.2 Posición y tipo de embrión. 46

7.1.2. Caracterización física de las especies forestales nativas 47

7.1.2.1 Pruebas de Viabilidad..... 47

7.1.2.2 Prueba de imbibición y porcentaje de germinación..... 48

7.2 Objetivo 2..... 51

7.2.1 Comparación de resultados entre tratamientos por especie 51

7.2.2 Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos en las tres especies forestales53



7.2.3 *Influencia de los tratamientos pre germinativos químicos en la germinación de las tres especies forestales* 55

7.3 Objetivo 3..... 59

7.3.1 *Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en la altura de tres especies forestales nativas*..... 59

7.3.2 *Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en el número de hojas de tres especies forestales nativas* 62

7.3.3 *Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en la supervivencia de tres especies forestales nativas* 64

8. DISCUSIONES **69**

8.1 Características morfológicas y físicas de las tres especies nativas 69

8.1.1 *Caracterización morfológica*..... 69

8.1.2 *Caracterización física*..... 70

8.2 Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en el porcentaje de germinación de las tres especies forestales nativas 71

8.2.1 *Estratificación fría*..... 71

8.2.2 *Estatificación caliente* 72

8.2.3 *Remojo en solución hormonal* 74

8.2.4 *Escarificación ácida* 75

8.3 Influencia de los tratamientos pre germinativos en el desarrollo inicial (Altura, número de hojas y supervivencia) de las tres especies forestales nativas 76



9. CONCLUSIONES..... 79

9.1. Caracterización física y morfológica de las tres especies forestales nativas..... 79

9.2. Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en la de las tres especies forestales nativas 79

9.3. Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en el desarrollo inicial de las tres especies forestales nativas 80

10. RECOMENDACIONES..... 81

11. BIBLIOGRAFÍA..... 82

12. ANEXOS..... 93



LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Tipos de latencia 29

Tabla 2 Características de las especies, importancia socioeconómica y ecológica. 33

Tabla 3 Tratamientos y niveles empleados en el estudio de la germinación de tres especies forestales nativas. 40

Tabla 4 Tamaño promedio de semillas y embriones de las especies *P. sprucei*, *Clusia sp.* y *V. triphyllum*. 45

Tabla 5 Prueba de Kruskal Wallis de las medias del peso de las semillas de *P. sprucei*, *Clusia sp.* y *V. triphyllum*. 49

Tabla 6 Medias del peso de las semillas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*. 49

Tabla 7 Media de los porcentajes de germinación de semillas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*, sometidas a diferentes tratamientos pre germinativos..... 58

Tabla 8 Germinación de *Podocarpus sprucei*, *Clusia sp* y *Viburnum triphyllum* mediante el Test de Kruskal Wallis..... 58

Tabla 9 Promedio de altura (cm), número de hojas y supervivencia (%) tras 2 meses de monitoreo del desarrollo inicial de las especies *Podocarpus sprucei*, *Clusia sp.* y *Viburnum triphyllum* en condiciones de invernadero..... 67

Tabla 10 Análisis estadístico del factor: tratamiento, sobre la altura número de hojas y supervivencia de *Podocarpus sprucei* mediante la prueba de Kruskal Wallis. 68

Tabla 11 Análisis estadístico del factor: tratamiento, sobre la altura, número de hojas y supervivencia de *Clusia sp*, mediante la prueba de Kruskal Wallis. 68

Tabla 12 Análisis estadístico del factor: tratamiento, sobre la altura, número de hojas y supervivencia de *Viburnum triphyllum*, mediante la prueba de Kruskal Wallis..... 68



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación de la zona de estudio, laboratorio de semillas e invernadero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cantón Cuenca, Provincia del Azuay..... 34

Figura 2. Mapa de ubicación de los sitios de recolección de las especies estudiadas, dentro de la Comunidad Fárez, Parroquia Victoria del Portete, Provincia del Azuay 35

Figura 3. Distribución espacial de las especies muestreadas (*P. sprucei*, *Clusia sp.*, *V. triphyllum*), dentro de la Comunidad Fárez, Parroquia Victoria del Portete, Provincia del Azuay..... 35

Figura 4. Semillas de las especies en estudio 45

Figura 5. Embriones de las especies en estudio vistos a través del programa Infinity analyze... 46

Figura 6. Porcentaje de viabilidad, vacías, sin embrión de las semillas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum* 47

Figura 7. Incremento de peso de las semillas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*, a las 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas de imbibición..... 48

Figura 8. Porcentaje de germinación promedio acumulada de las especies en estudio, provenientes de un proceso de imbibición por 72 horas, en comparación con el testigo. 50

Figura 9. Media del porcentaje de germinación acumulada y velocidad de la germinación de los diferentes tratamientos aplicados en *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum* frente al testigo. 57

Figura 10. Media de la altura de plántulas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*, tras la aplicación de los diferentes tratamientos pre germinativos frente al testigo. 61

Figura 11. Media del número de hojas de las plántulas de *P. sprucei*, *Clusia sp.* y *V. triphyllum*, tras la aplicación de los diferentes tratamientos pre germinativos frente al testigo..... 63

Figura 12. Media de la supervivencia de las plántulas de *P. sprucei*, *Clusia sp.* y *V. triphyllum*, tras la aplicación de los diferentes tratamientos pre germinativos frente al testigo..... 66



LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Semillas maduras en campo (*P. sprucei*). 93

Anexo 2. Semillas maduras en campo (*Clusia sp.*) 93

Anexo 3. Semillas maduras en campo (*V. triphyllum*). 93

Anexo 4. Etiquetado en campo de árboles de *P. sprucei*. 93

Anexo 5. Etiquetado en campo de árboles de *Clusia sp.*. 93

Anexo 6. Etiquetado de árboles de *V. triphyllum*. 93

Anexo 7. Extracción de semillas de *P. sprucei*. 94

Anexo 8. Extracción de semillas de *Clusia sp.*. 94

Anexo 9. Extracción de semillas de *V. triphyllum*. 94

Anexo 10. Uso de calibrador para medir semillas. 94

Anexo 11. Vista de embriones a través del programa Infinity analyze. 94

Anexo 12. Establecimiento del ensayo en el laboratorio (Fase de germinación). 94

Anexo 13. Disposición de las semillas en las cajas petri (Fase de germinación). 95

Anexo 14. Germinación de *P. sprucei* (Fase de germinación en laboratorio). 95

Anexo 15. Germinación de *Clusia sp.* (Fase de germinación en laboratorio). 95

Anexo 16. Germinación de *V. triphyllum* (Fase de germinación en laboratorio). 95

Anexo 17. Caja Petri contaminada (Fase de germinación en laboratorio). 96

Anexo 18. Monitoreo (Fase de desarrollo inicial) de *P. sprucei*. 96

Anexo 19. Monitoreo (fase de desarrollo inicial) de *Clusia sp.* 96

Anexo 20. Monitoreo (fase de desarrollo inicial) de *V. triphyllum*. 96

Anexo 21. Vista superior de *P. sprucei* (Fase de desarrollo inicial en invernadero). 96

Anexo 22. Vista superior de *Clusia sp.* (Fase de desarrollo inicial en invernadero). 96



Anexo 23. Vista superior de *V. triphyllum* (Fase de desarrollo inicial en invernadero)..... 97

Anexo 24. Vista frontal del ensayo (Fase de desarrollo inicial en invernadero)..... 97

Anexo 25. Ubicación de las especies muestreadas. 97

Anexo 26. Prueba de post hoc de peso de *Clusia sp* y *Podocarpus sprucei* 98

Anexo 27. Media del porcentaje y semanas a la germinación de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*, del tratamiento con imbibición frente al testigo 98

Anexo 28. Fecha de inicio y fin de germinación de los tratamientos aplicados a *P. sprucei*..... 99

Anexo 29. Fecha de inicio y fin de germinación de los tratamientos aplicados a *Clusia sp.* 99

Anexo 30. Fecha de inicio y fin de germinación de los tratamientos aplicados a *V. triphyllum*100

Anexo 31. Tratamientos que no cumplieron con el número mínimo para desarrollar el 3er objetivo 100

Anexo 32. Medias de la germinación de acuerdo a cada tratamiento (Fase de germinación en laboratorio - *P. sprucei*) 101

Anexo 33. Medias de la germinación de acuerdo a cada tratamiento (Fase de germinación en laboratorio - *Clusia sp.*) 101

Anexo 34. Medias de la germinación de acuerdo a cada tratamiento (Fase de germinación en laboratorio - *V. triphyllum*). 101



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

AG3 = Ácido giberélico

AS = Ancho de semilla

AE = Ancho del embrión

DE = Desviación estándar

LS = Largo de semilla

LE = Largo del embrión

°C = Grados centígrados

ppm = partes por millón



Cláusula de Propiedad Intelectual

Elsa Gabriela Piña Ramírez autora del trabajo de titulación “Estudio de la germinación y desarrollo inicial de tres especies forestales nativas del Bosque Protector Yanuncay - Irquis”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 24 de septiembre del 2020

Gabriela Piña

Elsa Gabriela Piña Ramírez

C.I: 0105504625



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Elsa Gabriela Piña Ramírez en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Estudio de la germinación y desarrollo inicial de tres especies forestales nativas del Bosque Protector Yanuncay - Irquis”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 24 de septiembre del 2020

Elsa Gabriela Piña Ramírez

C.I: 0105504625



Cláusula de Propiedad Intelectual

Denis Sebastián Sarmiento Vanegas autor del trabajo de titulación “Estudio de la germinación y desarrollo inicial de tres especies forestales nativas del Bosque Protector Yanuncay - Irquis”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 24 de septiembre del 2020

Denis Sebastián Sarmiento Vanegas

C.I: 0105450134



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Denis Sebastián Sarmiento Vanegas en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Estudio de la germinación y desarrollo inicial de tres especies forestales nativas del Bosque Protector Yanuncay - Irquis”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 24 de septiembre del 2020

Denis Sebastián Sarmiento Vanegas

C.I: 0105450134



AGRADECIMIENTOS

A Dios y a nuestras familias, por el apoyo brindado en cada etapa de nuestras vidas.

A nuestra directora de tesis, Ing. Paulina Villena Ochoa, por la confianza depositada en nosotros y en nuestras capacidades.

A la Blga. Ximena Palomeque Ph.D. y en su persona al equipo de trabajo del Laboratorio de Ecología Forestal y Semillas de la Universidad Cuenca, por su apoyo incondicional en todas las fases de nuestro trabajo experimental, y por la amistad que nos han brindado.

Al Ing. Walter Larriva, Ing. Franklin Marín e Ing. Alberto Macancela, por su colaboración en la realización de esta tesis.

Al Ing. Santiago Malo, a su distinguida familia y trabajadores, por habernos abierto desinteresadamente las puertas de su hacienda.

A nuestros amigos y a todos quienes han contribuido de manera significativa en el logro de este proceso de titulación.

Gabriela Piña y Denis Sarmiento



DEDICATORIA

A mis padres Miguel y Elsa, todo cuanto soy se lo debo a ustedes, las palabras no me alcanzan para retribuir lo que han hecho por mí, gracias por su infinito amor y confianza.

A mis hermanos Miguel y Juan, por ser mis compañeros de vida, ya que junto a ustedes he pasado los mejores y peores días de mi vida.

A mis tíos/as Benito, Rosario, Gabriel, Luis, María, Sonia y a mis primos Patricio, John, Silvana y Pablo que siempre han creído en mis capacidades y me han apoyado incondicionalmente en cada paso.

A Marco, quien en estos últimos años se ha convertido en mi pilar, gracias por su paciencia y cariño.

A Fernando Bermúdez, por alentarme cada día a ser una mejor persona y profesional.

A Denis, mi amigo y compañero de tesis, por su amistad durante estos años de carrera.

Gabriela Piña



DEDICATORIA

A Dios y la Virgen por darme salud y vida para permitirme alcanzar este sueño.

A mis padres Manuel y Celia, por haberme forjado en base a valores y principios. Su apoyo y amor infinito se han convertido en mi principal motivación a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Valeria y Alex, por su apoyo incondicional, en ellos veo reflejado la humildad y sacrificio para afrontar la vida de la mejor manera.

A mis sobrinos Gael y Mateo, su inocencia y ternura son la paz que necesito y que fortalece mi alma.

A mis primos y demás familiares por su apoyo incondicional.

A Gabriela, mi amiga y compañera de tesis, por su confianza y amistad.

Denis Sarmiento



1.INTRODUCCIÓN

Ecuador cuenta con uno de los recursos forestales más importantes y megadiversos del mundo (Checa et al., 2012), dentro de los cuales se destaca los bosques altoandinos, caracterizados por su abundante diversidad y endemismo (Bokkestijn, 2017). Cuya importancia radica en los servicios ecosistémicos que brindan, tales como la conservación de los suelos, protección y regulación de las fuentes hídricas, almacenamiento de carbono, entre otros (CORPEI, 2007).

Su diversidad florística está representada por plantas con flores conocidas taxonómicamente como Angiospermas o Magnolipohytas, tanto monocotiledóneas y dicotiledóneas (Jadán et al., 2016). Estas especies se propagan sexualmente a través de semillas, las cuales se forman mediante una embriogénesis cigótica que comprende cambios morfológicos y estructurales que constituye la base para la germinación (Matilla, 2015).

La propagación de especies vegetales a partir de las semillas, garantiza la conservación de germoplasma y diversidad ecológica (Joseph y Delva, 2016). El uso de semillas nativas es una alternativa en programas de reforestación, ya que genera ventajas en la adaptación de plántulas propagadas al sitio definitivo, debido a que posee mayor resistencia a plagas, enfermedades y condiciones ambientales adversas (Torres, Medina y Martínez, 2018). Sin embargo, su germinación y desarrollo inicial es más lento que en las especies exóticas (Jiménez y Patiño, 2019), lo cual representa una limitante para la selección de estas especies en programas de conservación (Schmidt, 2000).

Para que la germinación sea efectiva, las semillas requieren de ciertos factores intrínsecos y extrínsecos específicos para cada especie (Navarro, Mesa y González, 2002). Existen especies que pese a poseer condiciones óptimas para su desarrollo, sus semillas son incapaces de germinar,



debido a la presencia de latencia innata o inducida (Baskin y Baskin, 1998). Los tratamientos pre germinativos representan una alternativa para romper esta barrera, además permiten sincronizar e incrementar su porcentaje de germinación (Araoz y Del Longo, 2006). Sin embargo, no todas las especies reaccionan de la misma manera, por lo que se debe investigar y definir el tratamiento más adecuado para cada caso (Viveros et al., 2015).

La germinación no siempre garantiza la supervivencia en campo en la etapa inicial de desarrollo de las plántulas (Jiménez y Patiño, 2019). Debido a que en algunas de ellas requieren mayor tiempo para desarrollar su sistema radicular y generar mayor área foliar (Viveros et al., 2015). La propagación de plántulas en viveros es una de las estrategias más efectivas para garantizar su adaptación a entornos naturales (Piñuela, Guerra, y Pérez, 2013).

Con base a lo descrito anteriormente, se realizó la presente investigación con la finalidad de determinar las características físicas y morfológicas de las semillas de *Podocarpus sprucei*, *Clusia sp.* y *Viburnum triphyllum*, así como identificar el efecto de los tratamientos pre germinativos para cada especie y observar su influencia en los primeros meses de desarrollo inicial. Debido a que, en la actualidad se dispone de escasa información en temas relacionados a la ecología de germinación, fenología, propagación, y su uso en programas de restauración (Ayma, 2005; Tapia y Toro, 2017). Los resultados obtenidos contribuirán al rescate de especies forestales nativas del sur del Ecuador, con miras a programas de restauración.



2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Estudiar la germinación y desarrollo inicial de tres especies forestales nativas del Bosque Protector Yanuncay – Irquis

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar física y morfológicamente las semillas de tres especies forestales nativas.
- Evaluar el porcentaje de germinación de las semillas frente a la aplicación de 4 tratamientos (físicos y químicos), a diferentes tiempos de exposición.
- Evaluar el desarrollo inicial y supervivencia de las plántulas durante los dos primeros meses de crecimiento, tras la aplicación de tratamientos pre germinativos.

3.PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuáles son las características morfológicas y fisiológicas presentes en las semillas de tres especies forestales nativas?
- ¿Hay diferencias en el porcentaje de germinación entre tratamientos pre germinativos en tres especies forestales nativas?
- ¿Hay diferencias en el crecimiento de las especies nativas en la fase de invernadero durante los dos primeros meses de desarrollo inicial?



4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. La semilla

La semilla es el principal órgano de reproducción sexual de las plantas superiores, es el producto de la fecundación del ovulo maduro con el polen (Doria, 2010). Su función es multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenece a través de diferentes mecanismos de dispersión, jugando un rol decisivo para garantizar su conservación en tiempo y espacio (Salinas et al., 2001).

4.2 Germinación

Se define la germinación como la capacidad de una semilla para generar una plántula nueva apta para valerse por sí misma, e involucra todos los procesos que inician con la absorción de agua y terminan con la elongación del eje embrionario (Suárez y Melgarejo, 2010). La señal más evidente de la finalización de este proceso es la emergencia de la radícula (Varela y Arana, 2010).

La germinación consta de las siguientes fases:

Fase I (Imbibición): La imbibición consiste en el ingreso de grandes cantidades de agua hacia la semilla, este proceso se da por la diferencia de potencial hídrico entre la semilla y la solución (Suárez y Melgarejo, 2010). Simultáneamente, las estructuras celulares se rehidratan y se da un incremento notorio de la tasa de respiración (Herrera et al., 2006). En algunos casos la entrada de agua se torna compleja por las cubiertas seminales que presentan ciertas especies, razón por la cual se debe buscar mecanismos que permitan debilitarlas (Pérez y Pita, 1998).

Fase II: Se caracteriza por la reducción tanto de la actividad respiratoria como de la absorción de agua (Herrera et al., 2006). En esta fase inicia la movilización de nutrientes, en donde, procesos de activación del metabolismo intervienen para el desdoblamiento de moléculas complejas como almidones y cuerpos proteicos en moléculas simples como azúcares y aminoácidos esenciales



(Suárez y Melgarejo, 2010). La elongación y división celular inician para dar paso en la siguiente fase a la aparición de la radícula (Herrera et al., 2006).

Fase III: Las enzimas degradan las reservas de las semillas, las proteínas son hidrolizadas a aminoácidos, así todos los productos de la degradación e hidrólisis alimentan al embrión para su normal crecimiento (Courtis, 2013). Con el brote de la radícula (crecimiento visible) se da por terminado la germinación e inicia la etapa de crecimiento de la plántula (Herrera et al., 2006).

4.3. Factores que intervienen en la germinación

En la germinación de semillas intervienen factores intrínsecos y extrínsecos, los primeros son propios de las semillas mientras que los extrínsecos dependen netamente de condiciones ambientales (Mota, Cueto y Merlo, 2003).

4.3.1. Factores intrínsecos

Madurez: Se habla de madurez morfológica cuando el embrión ha alcanzado su máximo desarrollo, esto va de la mano con la pérdida de ciertos tejidos de la semilla y la acumulación de sustancias de reserva (Saldívar et al., 2010). Por otro lado, la madurez fisiológica se refiere a los cambios metabólicos necesarios para que la semilla posea la capacidad de producir otra planta (Mota, Cueto y Merlo, 2003). Se debe tener en cuenta que en ocasiones la madurez fisiológica y morfológica se alcanza en diferentes periodos (Saldívar et al., 2010).

Viabilidad: La viabilidad se define como la capacidad de una semilla para germinar y generar plantas normales (Suárez y Malgarejo, 2010). La viabilidad indudablemente es propia de cada especie, y dependerá de su metabolismo, así como las condiciones de almacenamiento (Lewak y Khan, 1977). En ocasiones, se ve afectada por diferentes factores que incluyen daños físicos y el envejecimiento natural (Men, Yan, Liu, Qian, y Luo, 2017).



Para determinar la viabilidad de un lote de semillas se puede emplear diferentes técnicas, entre estas la prueba de tetrazolio es la más difundida (Ruiz, 2009), misma que refleja la actividad de las enzimas deshidrogenasas, dando como resultado una coloración roja a las semillas viables, y un color natural a las semillas que no son viables (Salazar y Gélvez, 2015).

4.3.2. Factores extrínsecos

Agua: es el factor extrínseco más importante en el proceso de germinación, debido a que, en forma líquida o gaseosa entra en contacto con las células vivas, a través de las testas seminales (Lewak y Khan, 1977); a pesar de ello, un exceso de la misma puede ser contraproducente para el embrión, por eso se debe considerar los diferentes grados de sensibilidad al agua de cada especie (Herrera et al., 2006).

Temperatura: la germinación es viable dentro de un rango de temperatura bastante reducido y es específica para cada especie, su intermedio óptimo es aquel que permite el mayor porcentaje de germinación (James, 1967). Además, influye en la actividad enzimática, ya que mientras más elevada sea la temperatura, el ingreso de agua será más rápido (Herrera et al., 2006). Sin embargo, al alcanzar su rango máximo, se puede obtener resultados negativos, ya que las proteínas y enzimas se coagulan dando como resultado la muerte (Saldívar et al., 2010).

Luz: su acción consiste en volver a la cubierta más permeable al oxígeno y al agua (James, 1967). Existen diferentes respuestas de las plantas a la luz, por lo cual, las semillas pueden clasificarse de tres maneras: semillas positivamente fotosensibles (la luz promueve la germinación), semillas negativamente fotosensibles (la germinación se inhibe con la luz) y semillas aparentemente no fotosensibles (no hay diferencias tras diferentes exposiciones a la luz y oscuridad) (Cardoso, 1988).



4.3.3. Latencia

La latencia, dormancia o letargo se presenta de manera natural en las semillas cuando el fruto ha alcanzado su madurez (James, 1967), con el fin de evitar la germinación dentro de la planta madre o antes de su dispersión en campo (De la cuadra, 1992). La latencia desaparece cuando las semillas encuentran los medios óptimos para su desarrollo, de esta manera se garantiza la supervivencia de las especies (Doria, 2010).

Este mecanismo también puede presentar obstáculos para la propagación masiva en viveros o en campo, debido al desconocimiento de la existencia de este factor (Saldívar et al., 2010), razón por la cual a pesar de cumplir con las condiciones ambientales requeridas por la especie, las semillas no germinan (Araya, Gómez, Hidalgo y Valverde, 2000).

Existen diferentes tipos de latencia (Ver Tabla 1), algunas de ellas pueden presentarse simultáneamente (Baskin y Baskin, 2004; Varela y Arana, 2010), sin embargo diferentes autores han demostrado que puede romperse empleando tratamientos pre germinativos, los cuales deben definirse para cada caso (Nikolaeva et al., 1999; James, 1967).

Latencia exógena: en algunas especies las cubiertas del embrión (testa, endospermo o perispermo) dificultan el intercambio gaseoso y la absorción de agua debido a su grosor, dureza y/o falta de porosidad (Varela y Arana, 2010; Cardoso, 1988). Se sugiere que los tratamientos basados en cambios de temperatura, así como el uso de escarificación ácida o mecánica podrían romper este tipo de latencia (Ochoa, 2019).

Latencia morfológica: se refiere a las características del embrión, el cual puede poseer escaso desarrollo o falta de diferenciación, lo que supone dificultades a la hora de absorber agua



(Magnitskiy y Ligarreto, 2011). No requiere tratamientos para promover la germinación, tan solo requiere tiempo para que el embrión crezca (Baskin y Baskin, 2004)

Latencia interna: se debe a las características innatas de la semilla, pues en ocasiones esta es incapaz de movilizar sustancias de reservas intraembrionarias (Mota, Cueto y Merlo, 2003), ya sea por bajas concentraciones de giberelinas, o debido a un déficit en su síntesis o la incapacidad de liberarlas (Baskin y Baskin, 1998), por diferentes razones estructurales o fisiológicas (Araya, Gómez, Hidalgo, y Valverde, 2000). El uso de temperatura así como de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento pueden romper este tipo de latencia (Baskin y Baskin, 2004).

Latencia combinada morfofisiológica: supone la presencia de latencia morfológica e interna simultáneamente, lo que se deriva en tiempos más prolongados para el desarrollo del embrión (Varela y Arana, 2010). Para romperla se requiere la combinación de tratamientos pre germinativos, basados en el uso de temperaturas frías y calientes o reguladores de crecimiento (Baskin y Baskin, 2004).

Latencia combinada exógena – endógena: esta condición aumenta la dificultad de la semilla para germinar; ya que además de presentar embriones poco desarrollados, la cubierta impide el ingreso de agua por su falta de permeabilidad (Varela y Arana, 2010). La estratificación fría por largos periodos de tiempo ha mostrado ser eficiente para estos casos (Baskin y Baskin, 2004).



Tabla 1
Tipos de latencia

1. Latencia exógena	
<i>Física</i>	Cubierta seminal o secciones endurecidas de otras cubiertas de las semillas son impermeables.
<i>Mecánica</i>	Cubierta de la semilla es demasiado dura y evita que se expanda el embrión
<i>Química</i>	Existe acumulación de sustancias químicas que inhiben la germinación.

2. Latencia morfológica o endógena	
<i>Embriones rudimentarios</i>	Embriones que poseen una estructura básica, las mismas que se encuentran precediendo la diferenciación completa del embrión.
<i>Embriones no desarrollados</i>	Embriones poco desarrollados y de tamaños inferiores a la mitad de las semillas.

3. Latencia interna	
<i>Fisiológica</i>	Germinación impedida por mecanismos fisiológicos inhibidores.
<i>Interno intermedio</i>	Inducida por la cubierta de las semillas y tejidos circundantes.
<i>Del embrión</i>	Incapacidad del embrión de germinar con normalidad.

4. Latencia combinada morfofisiológica	
Latencia del subdesarrollo del embrión combinada con los mecanismos fisiológico inhibidores fuertes.	

5. Latencia combinada exógena – endógena	
Latencia inducida por la cubierta combinada con la latencia producida por el embrión.	

Fuente: Baskin y Baskin, 2004; Varela y Arana, 2010

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.



4.4. Tratamientos pre germinativos

Se denomina tratamiento pre-germinativo a la aplicación de cualquier tratamiento mecánico, físico y/o químico que permita incrementar el porcentaje germinación o reducir el tiempo de espera para la obtención de plántulas (Román et al, 2012). Las mismas que debido a condiciones ambientales desfavorables o por su naturaleza tienen dificultades para reproducirse masivamente (Araoz y Del Longo, 2006).

Se debe considerar que cada especie posee necesidades específicas para su germinación (Varela y Arana, 2010), es por ello que es importante determinar el mejor tratamiento pre-germinativo de acuerdo a la especie con la cual se trabaje, pues esto determinara el éxito de los ensayos.

4.4.1 Tratamientos pre germinativos químicos

Ácido sulfúrico: ya sea en diferentes concentraciones o tiempos de inmersión ha mostrado ser uno de los tratamientos pre germinativos más eficientes (Viveros et al., 2015), ya que al entrar en contacto con las semillas el ácido debilita la testa, permitiendo el ingreso de agua, hidratando el embrión y dando paso a la germinación (Menezes, Etenaldo, Menezes, Marques y Oliveira, 2011).

Especies como *Enterolobium cyclocarpum* aumentan su porcentaje de germinación hasta el 12% tras sumergir sus semillas en ácido sulfúrico durante 35 minutos (Viveros et al., 2015). Lo mismo ocurre en especies como *Macroptilium* y *Neonotonia sp.*, las cuales han alcanzado hasta el 80% de germinación y hasta el 95% en *Centrosema*, *Leucaena* y *Stylosanthes sp.* (Seiffert, 1982).

Ácido giberélico: también se emplea en tratamientos pre germinativos, por su capacidad de promover la germinación al activar el crecimiento del embrión, promover la movilización de las sustancias de reserva y debilitar la capa de endospermo (Araya, Gómez, Hidalgo y Valverde, 2000; Ochoa, 2019). Además de sus aplicaciones dentro de las semillas y frutos, puede llegar a



reemplazar estímulos ambientales como la luz y la temperatura (Lewak y Khan, 1977; Bewley y Black, 1994; Baskin y Baskin, 1998).

Estudios realizados por Cardoso (1988) confirman que la inmersión de semillas de *Passiflora tripartita* (curuba) en ácido giberélico acelera la germinación, ya que, en ocasiones el nivel de giberelinas naturales no permite obtener estos resultados, efecto que puede replicarse en semillas con latencias prolongadas. Magnitskiy y Ligarreto (2011) reportan que la imbibición de semillas de *Vaccinium meridionale Swartz* (agraz) en ácido giberélico incrementa la germinación en semillas extraídas almacenadas en un 32%, y aquellas almacenadas en fruto hasta en un 38%.

4.4.2 Tratamientos pre germinativos físicos

Estratificación caliente: se ha obtenido resultados favorables al emplear diferentes rangos de temperatura, como el citado por González y Mendoza (2008) en *Leucaena leucocephala cv. Perú*, en donde se demostró que al exponer las semillas en agua a 80 °C durante 2 minutos se obtiene el 89,7% de germinación, cuyo resultado es el mejor entre sus tratamientos.

Otro ejemplo es el presentado por Gómez, Olivera y Botello (2009) en donde recomiendan la inmersión de semillas de *Samanea saman* (algarrobo) en agua a punto de ebullición durante 15 minutos, pues se alcanza hasta el 67% de germinación en esta especie, siendo superior al resto de tratamientos.

Estratificación fría: Las bajas temperaturas también surten un efecto positivo, debido a que simulan las condiciones ambientales que requieren ciertas especies para germinar (James, 1967). Rodríguez et al. (2017) señalan que la estratificación fría (5°C) por ocho semanas mejora la velocidad de germinación de especies como *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz reduciendo el tiempo de 43 (testigo) a 18 semanas.



4.5. Desarrollo inicial

La calidad de la semilla determina el éxito del desarrollo inicial de cualquier especie vegetativa (Vidaurre, 1991). Ciertos investigadores mencionan que el material de reserva (carbohidratos, grasa y proteínas) de los ejemplares es el eje principal a tomar en cuenta al momento de seleccionar la semilla, bajo el supuesto de que las semillas más pesadas deben tener mayor porcentaje de germinación y producir plántulas más vigorosas (Antón, 2013).

El uso de semillas nativas es una alternativa en programas de reforestación, ya que genera ventajas en la adaptación de plántulas propagadas al sitio definitivo (Torres, Medina y Martínez, 2018). En la mayoría de los casos, las especies nativas tienen la capacidad de formar comunidades autosuficientes que no requieren mucho mantenimiento, puesto que tienden a resistir al daño por sequía, enfermedades comunes y herbívoros (Dorner, 2002).

El desarrollo inicial se caracteriza por el crecimiento, diferenciación y morfogénesis de una planta, y aunque la forma física depende de las características fenotípicas propias de la especie, estas se ven influenciadas por el medio ambiente en el cual se desarrollan (Cayón, 1999). Entre los factores que intervienen en este proceso se destacan los edáficos (suelo, pH, flora microbiana, etc.) por su influencia en el crecimiento arbóreo seguido de los climáticos (temperatura, precipitación, humedad relativa, etc.) y la luz (Torres et al., 2018; Vidaurre, 1991).

Se considera que el crecimiento inicial de especies forestales en vivero es importante, ya que de esta forma se obtiene material vegetal óptimo para su posterior establecimiento en ecosistemas intervenidos (Antón, 2013). Esta fase de transición permite que las raíces se desarrollen de mejor manera y que la planta alcance un estado fisiológico adecuado que garantice la supervivencia de plántulas en campo (Torres et al., 2018).



4.6. Características generales de las especies en estudio

Tabla 2

Características de las especies, importancia socioeconómica y ecológica.

Especie	Características de la especie	Importancia	Fuente
<i>Podocarpus sprucei</i> Parl (Guavisay, romerillo, sisín o azuceno)	- Familia <i>Podocarpaceae</i> - Árbol de 15 a 20m de altura. Hojas compuestas. Su fruto es una drupa de color verde oliva, sostenida por un receptáculo carnoso. - Distribuida en las montañas andinas en el norte del Perú y el Sur del Ecuador - De 2000 a 3900 m s. n. m.	Socioeconómica: Se emplea con fines ornamentales, maderables (construcción de muebles, casa, etc.), alimenticios (fruto alimento de aves), medicinales (hojas empleadas para resfriados) y ancestrales (protector contra los espíritus). Ecológica: Especie considerada en peligro de extinción, además posee la capacidad de captura de carbono.	●Chirino et al., 2017. ●Hofstede, Lips y Jongsma, 1998. ●Minga y Verdugo, 2016. ●Thomas y Farjon, 2013. ●IUCN, 2003.
<i>Clusia sp.</i> (Duco)	- Familia <i>Clusiaceae</i> -Árbol o arbusto dioico o hermafrodita, terrestres o epifitos, látex transparente blanco, amarillo, o de otros colores intensos. Su fruto es una baya, drupa capsula septicida, con semillas ariladas o no. -Distribuida en América tropical, de México a Sudamérica y el Caribe. -De 2900 a 3680 m s. n. m.	Socioeconómica: Empleada con fines ornamentales, medicinales (el látex de la corteza se usa como cicatrizante purgante, para tratar resfriados, dolores de muela), ancestrales (frutos empleados en chamizas) y alimenticios (fruto alimento de aves). Ecológica: Refugio de insectos y aves.	●Martínez, Castillo y Nicolalde, 2015. ●Hochwaller et al., 2011.
<i>Viburnum triphyllum</i> Benth (Rañas, garrocho, dañas o Juanico)	- Familia <i>Viburnaceae</i> -Árbol o arbusto de 2 a 4m de altura. Tallo cilíndrico, corteza café. Hojas simples. Flores blancas, fragantes. Su fruto es una drupa de color negro cuando está maduro. - Distribuida en los Andes de Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú. - De 1700 a 3400 m s. n. m.	Socioeconómica: Empleada con fines medicinales (calmante), artesanales (frutos empleados como tinte) y alimenticios (fruto alimento de aves). Ecológica: Restauración ecológica, debido a follaje denso. Protector de yacimiento de agua. Empleado en cercas vivas y como refugio de insectos y aves.	●Minga y Verdugo, 2016. ●Romo, 2016.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Descripción y ubicación del lugar de estudio

El presente estudio se desarrolló en el laboratorio de Ecología Forestal y Semillas, así como en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, situada en la provincia del Azuay, cantón Cuenca (coordenadas UTMX=719434,90; UTM Y=9677015,30).

La recolección de semillas se llevó a cabo en la parroquia Victoria del Portete, en el sector de Iquis, Comunidad Fárez (coordenadas UTMX= 714638,88; UTM Y= 9655583,03). Sitio que posee variaciones altitudinales entre 2640 y 3800 m s.n.m. Aquí las temperaturas oscilan entre 0 °C y 10 °C, con una precipitación media anual de 639mm (Guzmán y Lema, 2009).

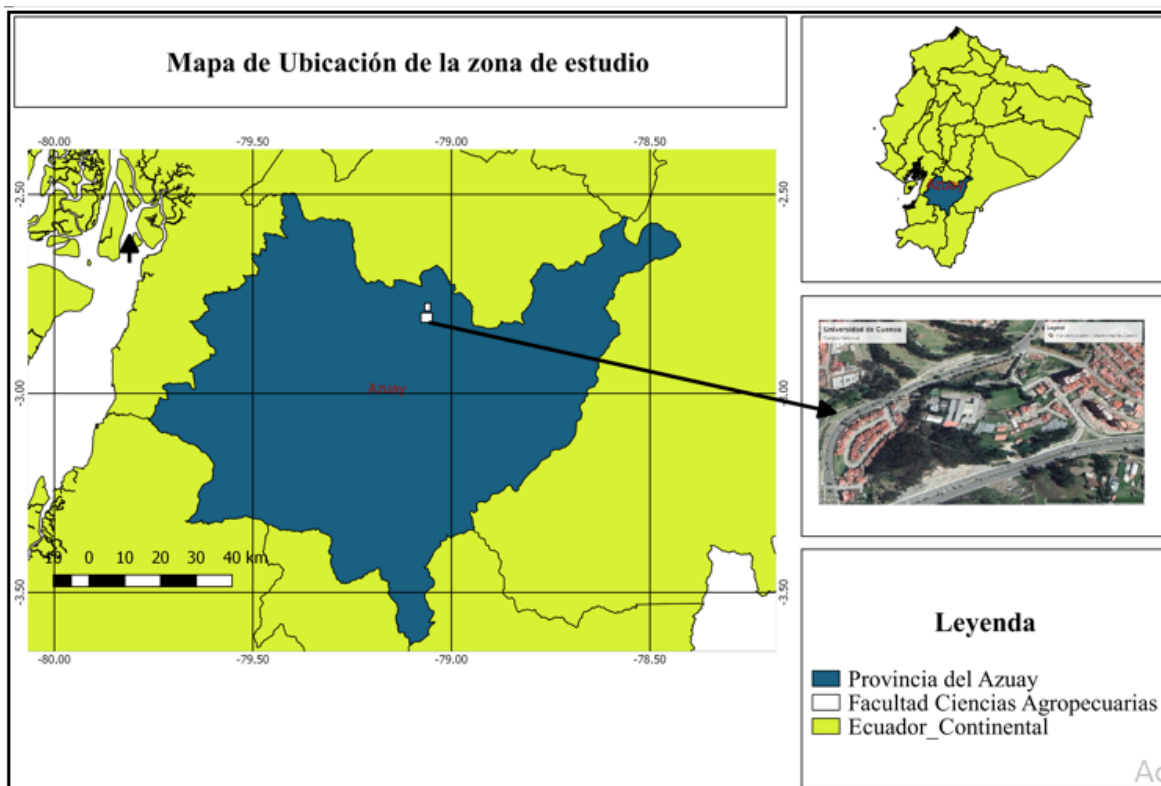


Figura 1. Mapa de ubicación de la zona de estudio, laboratorio de semillas e invernadero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cantón Cuenca, Provincia del Azuay.

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

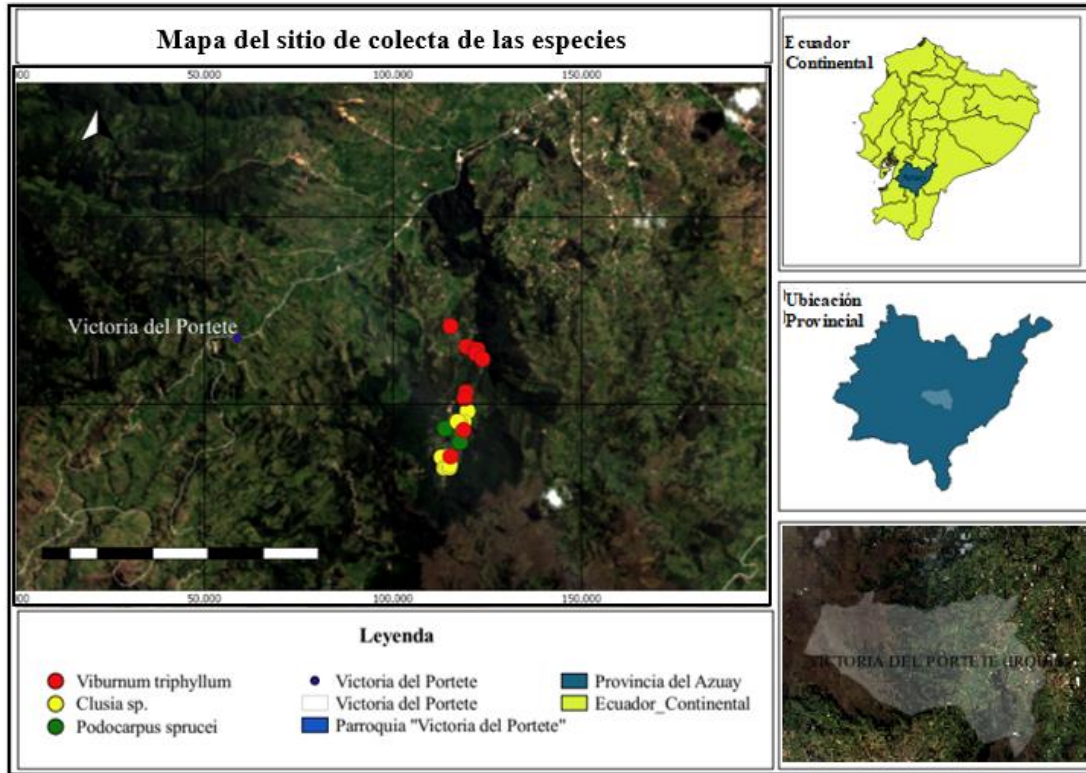


Figura 2. Mapa de ubicación de los sitios de recolección de las especies estudiadas, dentro de la Comunidad Fárez, Parroquia Victoria del Portete, Provincia del Azuay

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: ● *Viburnum triphyllum* ● *Clusia sp.*, ● *Podocarpus sprucei*



Figura 3. Distribución espacial de las especies muestreadas (*P. sprucei*, *Clusia sp.*, *V. triphyllum*), dentro de la Comunidad Fárez, Parroquia Victoria del Portete, Provincia del Azuay.

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: ● *Podocarpus sprucei*, ● *Clusia sp.*, ● *Viburnum triphyllum*



5.2. Colecta de semillas en campo

Los criterios de selección de las especies en estudio: *Podocarpus sprucei* Parl, *Clusia sp.* y *Viburnum triphyllum* Benth, se basaron en su importancia ecológica. Estas especies se emplean para la protección de recursos hídricos, mejoramiento de suelos y recuperación de áreas degradadas (Aguirre y Fassbender, 2013).

Para la elección de los ejemplares de cada especie se consideró: características fenotípicas, estado fitosanitario bueno, periodo de fructificación, disponibilidad de material reproductivo, estado de madurez de los frutos y abundancia de las semillas. Posteriormente, se identificó, codificó, marcó con placas de aluminio y georreferenció espacialmente 10 ejemplares por especie, las cuales poseían una distancia mínima de 100 metros entre planta y planta (Ver Anexos 1-6, 26 y Figura 3).

La recolección de semillas de la especie *P. sprucei* se realizó entre los meses de septiembre y diciembre del 2018 de acuerdo a su disponibilidad. Se seleccionó las semillas que poseían el epimacio de tonalidad cercana al vino tinto (Ver Anexo 7), este se ubica en la base de la semilla y se empleó como indicador de madurez. La colecta se llevó a cabo antes de su plena maduración, ya que se podría perder la semilla por dispersión natural, insectos y otros (Ayma, 2005).

Las semillas de *Clusia sp.* se colectaron en los meses de septiembre y octubre del 2018, sus frutos se caracterizan por ser climatéricos, por ello se seleccionó aquellos frutos maduros (abiertos) y semi-maduros (semi-abiertos) de coloración amarilla. La extracción de semillas se realizó cuando los frutos se encontraban abiertos en forma de estrella que mostraban de 1 a 4 semillas envueltas en un arilo anaranjado (Ver Anexo 8).



Las semillas de *V. triphyllum* se colectaron en los meses de enero y febrero del 2019 de acuerdo a su disponibilidad, se seleccionó los frutos maduros caracterizados por poseer una tonalidad negra–amoratada brillante (Ver Anexo 9).

5.3 Manejo de experimentos en el laboratorio de Ecología forestal y semillas

5.3.1 Selección de semillas

Tras la recolección en campo se trasladó las semillas al laboratorio. Aquí, se seleccionaron mediante observación directa aquellas que no presentaron laceraciones en la cubierta o problemas fitosanitarios como hongos y/o plagas.

5.3.2 Protocolo de desinfección de semillas

Se aplicó el mismo protocolo de desinfección a todas las semillas empleadas en las diferentes pruebas y tratamientos, con el fin de evitar la incidencia de microorganismos como hongos y bacterias. Este protocolo consistió en enjuagar durante 3 y 10 minutos con agua corriente; después se aplicó 3 gotas de jabón líquido y se revolvió hasta que se homogenice; finalmente se enjuagó con agua destilada.

5.3.3 Cuarto de crecimiento

El monitoreo del porcentaje de germinación de las diferentes pruebas y tratamientos aplicados en las semillas de las tres especies forestales se llevó a cabo en el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Ecología Forestal y Semillas, el cual contó con las siguientes condiciones ambientales: temperatura máxima= 25°C, temperatura mínima= 16°C, temperatura promedio= 19°C, humedad relativa= 64%, 12 horas luz y 12 horas oscuridad.



5.4. Metodología para cumplir el Objetivo 1

Caracterizar física y morfológicamente las semillas de tres especies forestales nativas.

5.4.1 Caracterización física de las semillas de las tres especies forestales nativas

En este punto se aplicaron pruebas de viabilidad y pruebas de imbibición a las semillas de las tres especies.

Prueba de viabilidad: para determinar la viabilidad de las semillas, se extrajo 100 embriones de cada especie y se las distribuyó en 4 cajas Petri (25 cada una), posteriormente fueron sumergidas en cloruro de tetrazolio al 1% durante 24 horas, después de este tiempo se contabilizó aquellos embriones que se tiñeron. Los resultados se expresaron en porcentaje.

Prueba de imbibición: Se tomó 100 semillas distribuidas en cuatro repeticiones (25 cada una) y se sumergieron en agua destilada. Después de 4, 8, 12, 24, 36 y 72 horas se registró su peso usando una balanza analítica del cual se tomó tres dígitos. Al cabo de este tiempo se trasladó las repeticiones al cuarto de crecimiento, en donde se monitorearon cada tres días. Se consideró como “semilla germinada” cuando la nueva plántula presentaba radícula y el brote de sus primeras hojas falsas. Se detuvo el monitoreo a los 30 días a partir de la aparición de la última semilla germinada en todas las unidades experimentales.

5.4.2 Caracterización morfológica de las semillas de las tres especies forestales nativas

Se empleó un calibrador digital para medir el largo y ancho de 100 semillas de cada especie (Ver Anexo 10), de las que posteriormente se seleccionaron 25 de estas y se extrajeron los embriones para medir las mismas variables. Para ello se utilizó el programa *Infinity Analyze* con el fin de obtener datos más precisos (Ver Anexo 11). Para la determinación de tipo y posición del embrión se empleó la clasificación de Baskin y Baskin (2004) basada en Martin (1946).



5.5 Metodología para cumplir el objetivo 2

Evaluar el porcentaje de germinación de las semillas frente a la aplicación de 4 tratamientos (físicos y químicos) a diferentes tiempos de exposición.

5.5.1 Establecimiento del experimento

Esta fase se llevó a cabo en el laboratorio de Ecología Forestal y Semillas. Posterior a la desinfección de las semillas, se aplicó los diferentes tratamientos en las semillas de las tres especies en estudio. Por cada tratamiento se tomó lotes de 100 semillas distribuidas en cuatro repeticiones (25 cada una), las mismas que fueron sembradas en cajas Petri y llevadas al cuarto de crecimiento (Ver Tabla 2 y Anexo 12).

5.5.2 Aplicación de tratamientos

5.5.2.1 Tratamientos físicos.

Estratificación fría: Tras aplicar el protocolo de desinfección, se sometió las semillas a refrigeración durante 7, 14 y 21 días a 4°C. Para verificar la temperatura de la refrigeradora, se empleó un termómetro. Luego, se colocaron en cajas Petri con papel absorbente previamente humedecido con agua destilada y se trasladó los experimentos al cuarto de crecimiento.

Estratificación caliente: Tras aplicar el protocolo de desinfección, las semillas fueron sumergidas en agua caliente a temperaturas de 30, 40 y 70°C durante 12 horas. Para verificar la temperatura del agua se empleó un termómetro. Luego, se colocaron en cajas Petri con papel absorbente humedecido con agua destilada y se trasladó los experimentos al cuarto de crecimiento.

5.5.2.2 Tratamientos químicos.

Remojo en solución hormonal: Tras aplicar el protocolo de desinfección, se remojó las semillas en ácido giberélico a 300 ppm durante 12, 24, 36 y 48 horas. Luego, se colocaron en cajas



Petri con papel absorbente previamente humedecido con agua destilada y se trasladó los experimentos al cuarto de crecimiento.

Escarificación ácida: Tras aplicar el protocolo de desinfección, se sumergieron las semillas en ácido sulfúrico al 10% durante 3, 5 y 10 minutos. Después de este tiempo se enjuagó las semillas con agua destilada. Luego, se colocaron en cajas Petri con papel absorbente previamente humedecido con agua destilada y se trasladó los experimentos al cuarto de crecimiento.

5.5.2.3 Testigo.

Se empleó un testigo único por especie, con el cual se compararon todos los tratamientos. Tras desinfectar las semillas, se colocaron en cajas Petri que contenían papel absorbente humedecido previamente con agua destilada, posterior a ello fueron trasladados al cuarto de crecimiento.

Tabla 3

Tratamientos y niveles empleados en el estudio de la germinación de tres especies forestales nativas.

	Tratamientos	Niveles	Unidad
<i>Físico</i>	<i>Estratificación fría (refrigeración a 4°C)</i>	7	Días
		14	
		21	
	<i>Estratificación caliente (agua caliente por 12 horas)</i>	30	°C
		40	
<i>Químico</i>	<i>Escarificación ácida (Ácido sulfúrico al 10%)</i>	70	Minutos
		3	
		5	
	<i>Remojo en solución hormonal (Ácido giberélico a 300 ppm)</i>	10	Horas
		12	
<i>Control</i>		24	
		36	
		48	
		Testigo	

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.



5.5.3 Monitoreo

Tras aplicar los tratamientos pre germinativos, se cuantificó los días y el porcentaje de germinación. Se consideró que una semilla había germinado cuando esta presentaba radícula y el brote de las primeras hojas falsas (Ver Anexo 14-16). Se detuvo la toma de datos cuando se verificó la ausencia de germinación en los tratamientos en un lapso máximo de 30 días a partir de la aparición de la última semilla germinada en las unidades experimentales. Para calcular el porcentaje de germinación se empleó la siguiente fórmula (Islam, Mia, Hossaint, Ahmed y Khan, 2012):

$$G(\%) = \frac{\# \text{ Semillas germinadas}}{\# \text{ Semillas sembradas}} * 100$$

5.5.4 Post desinfección

En el transcurso de la fase de germinación en el laboratorio se observó contaminación en las semillas de algunos tratamientos, razón por la cual se procedió a desinfectarlas conforme la situación lo ameritaba (Ver Anexo 20); para ello se sumergió las semillas contaminadas en una solución de Clorhexidina + Cetrimide (Germinal) al 10% por 2 minutos, seguidamente se sembró todas las semillas correspondientes a cada repetición en una nueva caja Petri.



5.6 Metodología para cumplir el objetivo 3

Evaluar el desarrollo inicial y supervivencia de las plántulas durante los dos primeros meses de crecimiento, tras la aplicación de tratamientos pre germinativos.

5.6.1 Establecimiento del experimento

Esta fase se llevó a cabo en el invernadero de propagación de especies nativas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, cuyas condiciones ambientales fueron las siguientes: temperatura promedio= 17°C, humedad relativa promedio= 79,86%, 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

5.6.2 Material vegetativo

Para evaluar el desarrollo inicial se emplearon las plántulas obtenidas tras la aplicación de los tratamientos pre germinativos (fase de laboratorio, objetivo 2).

5.6.3 Preparación del sustrato

El sustrato se conformó de la siguiente manera: tierra negra (50%), arena (25%), cascarilla de arroz (25%). Mismo que fue esterilizado al vapor con un esterilizador. Posteriormente se colocó en fundas plásticas de 157cm³.

5.6.4 Monitoreo

Se monitoreó 10 plántulas por repetición (4 repeticiones). El registro de datos se realizó cada 15 días durante 2 meses. En las repeticiones cuyo número de plántulas no alcanzaron la cantidad mínima para ser evaluadas en esta fase se consideró el número total de plántulas obtenidas. Se registró información de las siguientes variables:

- Altura:** Se registró en cm la altura de cada planta desde el suelo hasta el ápice o yema terminal, para ello se empleó una regla.



•**Numero de hojas:** Se contabilizó tan solo las hojas maduras o aquellas que se encontraban totalmente abiertas.

•**Supervivencia:** Se contabilizó el número de plantas muertas en cada toma de datos. Esta variable se calculó aplicando la siguiente formula (Tomas, 2008):

$$S = \frac{\# \text{ Plantas vivas}}{\# \text{ Plantas sembradas}} * 100$$



6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la distribución de los tratamientos se aplicó un diseño experimental completamente al azar (Ver tabla 3). Los análisis estadísticos se realizaron para cada especie, los cuales se desarrollaron en el programa estadístico R versión 3.5.1 (R Development Core team, 2018).

Objetivo 1: Al no cumplir con los supuestos de independencia, normalidad y homocedasticidad en las pruebas de imbibición de las semillas de *P. sprucei*, *Clusia sp.*, y *V. triphyllum*, se realizaron pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis), en el caso de existir significancia se aplicaron pruebas post hoc (Test de Nemenyi), con el fin de identificar diferencias entre los grupos en relación al peso de las semillas y poder determinar si las especies presentaron latencia exógena.

Objetivo 2 y 3: Al no cumplir con los supuestos antes mencionados, en los datos del porcentaje de germinación, altura (cm), número de hojas y supervivencia (%), de las tres especies en estudio, se aplicaron pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis), en el caso de hallar diferencia significativa se realizaron pruebas post hoc (Test de Nemenyi), para determinar diferencias entre los tratamientos empleados.

7. RESULTADOS

7.1 Objetivo 1

7.1.1 Caracterización morfológica de las tres especies forestales nativas

7.1.1.1 Tamaño de la semilla y el embrión.

Existió diferencia en el tamaño de las semillas, determinando que las de mayor tamaño corresponden a *V. triphyllum* y las de menor tamaño pertenecen a *P. sprucei*. En lo relacionado al tamaño de los embriones, los más pequeño correspondieron a *V. triphyllum* y los de mayor tamaño pertenecieron a *Clusia sp.* (Ver Tabla 4 y Figura 4).

Tabla 4

Tamaño promedio de semillas y embriones de las especies *P. sprucei*, *Clusia sp.* y *V. triphyllum*.

Especie	Variable	Semilla (n=100)		Embrión (n=25)	
		Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)
<i>Podocarpus sprucei</i>	Media	6,4	5,5	3,4	1,0
	DE	0,3	0,3	0,3	0,1
<i>Clusia sp.</i>	Media	8,4	3,8	8,2	3,1
	DE	0,5	0,3	0,9	0,3
<i>Viburnum triphyllum</i>	Media	8,9	6,8	2,2	1,0
	DE	0,8	0,7	0,2	0,1

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: DE= Desviación estándar



Figura 4. Semillas de las especies en estudio

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: a) *Podocarpus sprucei*, b) *Clusia sp.*, c) *Viburnum triphyllum*

7.1.1.2 Posición y tipo de embrión.

Con base a los estudios realizados por Martin (1946) y Baskin y Baskin (2004) se determinó que los embriones tanto de *P. sprucei* como de *Clusia sp.* correspondieron a la división axilar puesto que se ubicaban en el centro de la semilla. En cuanto a su tipo se clasificaron como lineales, ya que de acuerdo a los datos obtenidos en relación a su tamaño, estos fueron más largos que anchos (Ver Figura 5a, b).

El embrión de la especie *V. triphyllum* correspondió a la división basal, pues se lo ubicó en el extremo inferior de la semilla. En lo que concierne al tipo, se clasificó como rudimentario, debido a su tamaño tan pequeño, el cual representó la cuarta parte de la semilla (Ver Figura 5c).

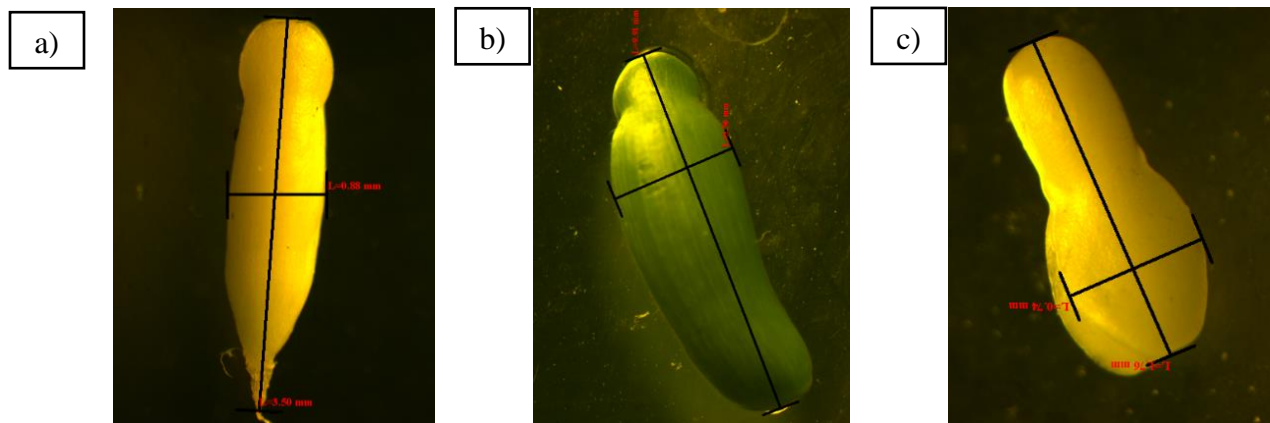


Figura 5. Embriones de las especies en estudio vistos a través del programa Infinity analyze

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: a) *Podocarpus sprucei*, b) *Clusia sp.*, c) *Viburnum triphyllum*

7.1.2. Caracterización física de las especies forestales nativas

7.1.2.1 Pruebas de Viabilidad.

Los resultados de las pruebas de tetrazolio mostraron que el porcentaje de viabilidad en *P. sprucei* fue del 50%, en *Clusia sp.* fue del 88% y en *V. triphyllum* fue del 79%, en la primera especie se reportaron semillas vacías (7%) y sin embrión (5%) durante la extracción (Ver Figura 6).

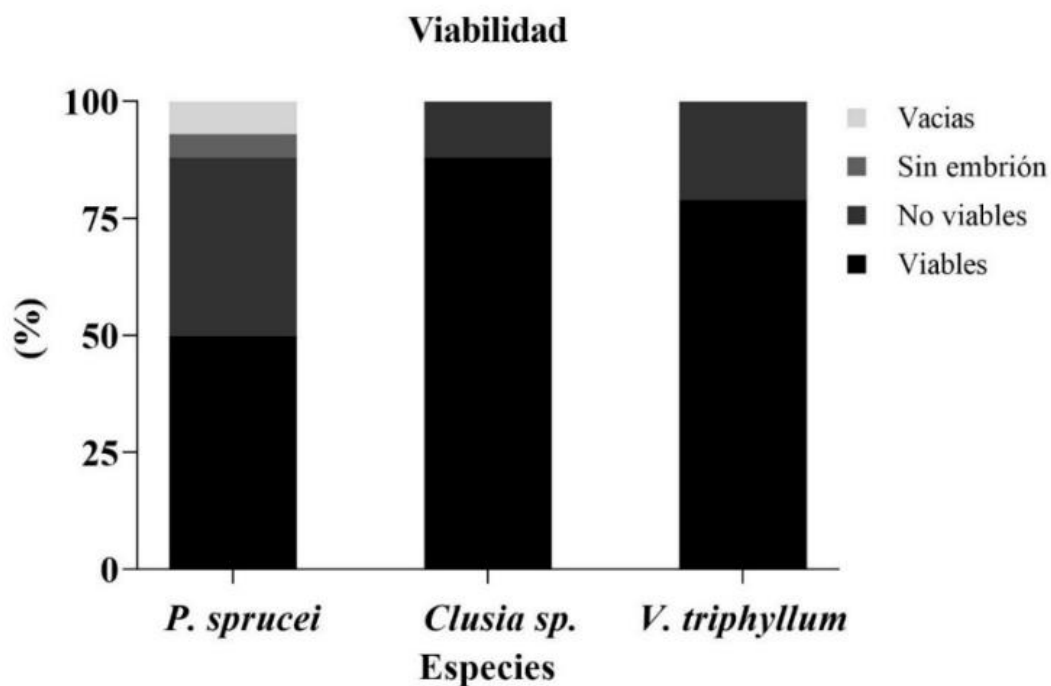


Figura 6. Porcentaje de viabilidad, vacías, sin embrión de las semillas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

7.1.2.2 Prueba de imbibición y porcentaje de germinación.

La prueba de Kruskal Wallis mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en el peso promedio de las especies *P. sprucei* y *Clusia sp* en relación al tiempo (Ver Tabla 5), lo que confirmó el ingreso de agua a la semilla, por ende, la permeabilidad de la cubierta. Posteriormente, se aplicaron pruebas post hoc (Nemenyi), donde se encontró diferencias significativas tanto entre las 0 y 72 horas, así como entre las 4 y 72 horas (Ver Anexo 26-27 y Figura 7).

V. triphyllum no mostró diferencia significativa ($p > 0,05$) para esta variable, lo cual sustenta la teoría de que esta especie posee latencia exógena.

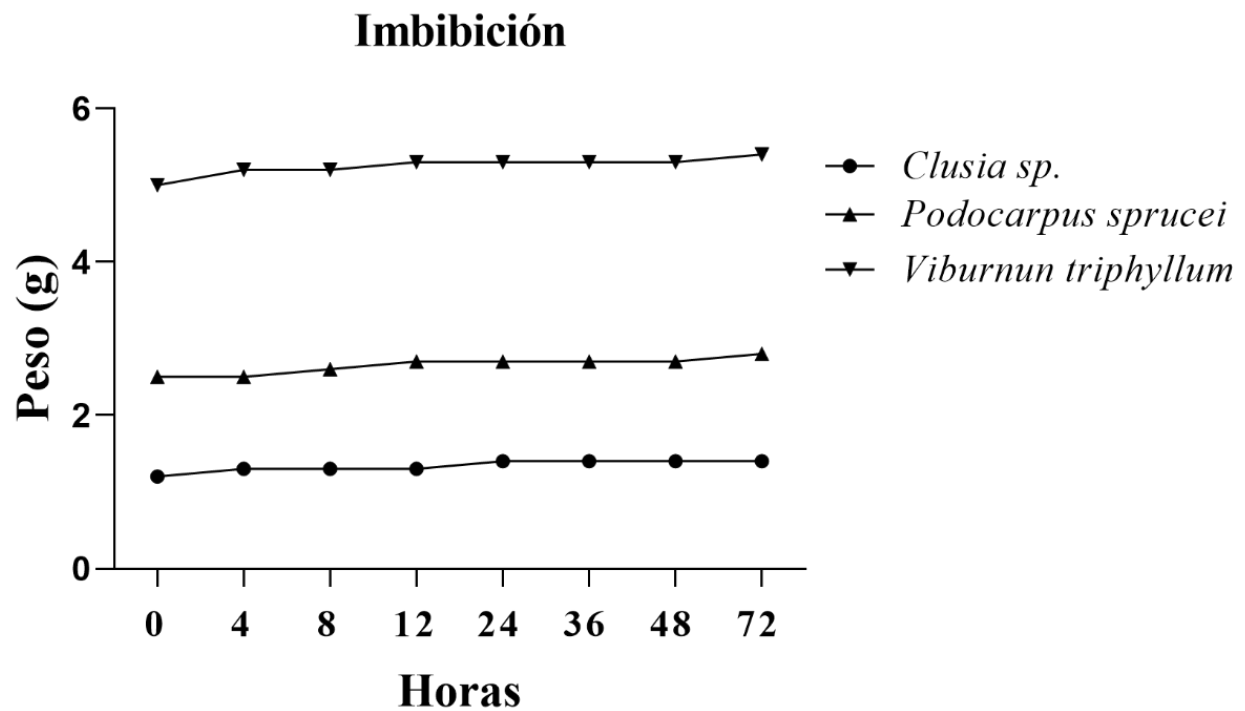


Figura 7. Incremento de peso de las semillas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*, a las 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas de imbibición.

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

**Tabla 5**

Prueba de Kruskal Wallis de las medias del peso de las semillas de *P. sprucei*, *Clusia sp.* y *V. triphyllum*.

Especies	<i>p value</i>	Df
<i>Podocarpus sprucei</i>	0,0005***	7
<i>Clusia sp</i>	0,0034**	7
<i>Viburnum triphyllum</i>	0,1547	7

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: Los valores significativos se encuentran resaltados ($p < 0,05$) (**, ***). Indican los niveles de significancia de los valores *p*.

Tabla 6

Medias del peso de las semillas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*.

	<i>Podocarpus sprucei</i> Peso (g)	<i>Clusia sp.</i> Peso (g)	<i>Viburnum triphyllum</i> Peso (g)
0	2,5	1,2	5,1
4	2,5	1,2	5,2
8	2,6	1,3	5,3
Imbibición (horas) 12	2,6	1,3	5,3
24	2,6	1,4	5,3
36	2,7	1,4	5,4
48	2,7	1,4	5,3
72	2,8	1,4	5,4

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: Los valores resaltados indican diferencias significativas a través de la prueba de Nemenyi ($p < 0,05$), entre las 0 y 72 horas y 4 y 72 horas.

Posteriormente, se procedió a cotejar la información relacionada al porcentaje y días a la germinación obtenida tras la imbibición de las semillas durante 72 horas con los resultados derivados por el testigo.

P. sprucei adquirió el 76% de germinación tras la imbibición, llegando a ser superior al testigo, el cual obtuvo el 54%. Los días a la germinación disminuyeron en las semillas embebidas, las cuales empezaron a germinar en la semana 10 mientras que, el testigo empezó a germinar en la semana 15. En los dos casos la germinación se detuvo en la semana 37 (Ver Figura 8)

Clusia sp. alcanzó el 92% de germinación en el testigo, mientras que las semillas que se sometieron a imbibición obtuvieron el 63%. En los dos casos las semillas empezaron a germinar en la semana 3 y se detuvo la germinación en la semana 16 (Ver Figura 8).

V. triphyllum mostró el 72% de germinación tras la imbibición, mientras que el testigo logró el 58%. Se evidenció que la imbibición recortó 6 semanas el inicio de la germinación. A pesar de ello, se detuvo a las 37 semanas en los dos casos (Ver Figura 8 y Tabla 6).

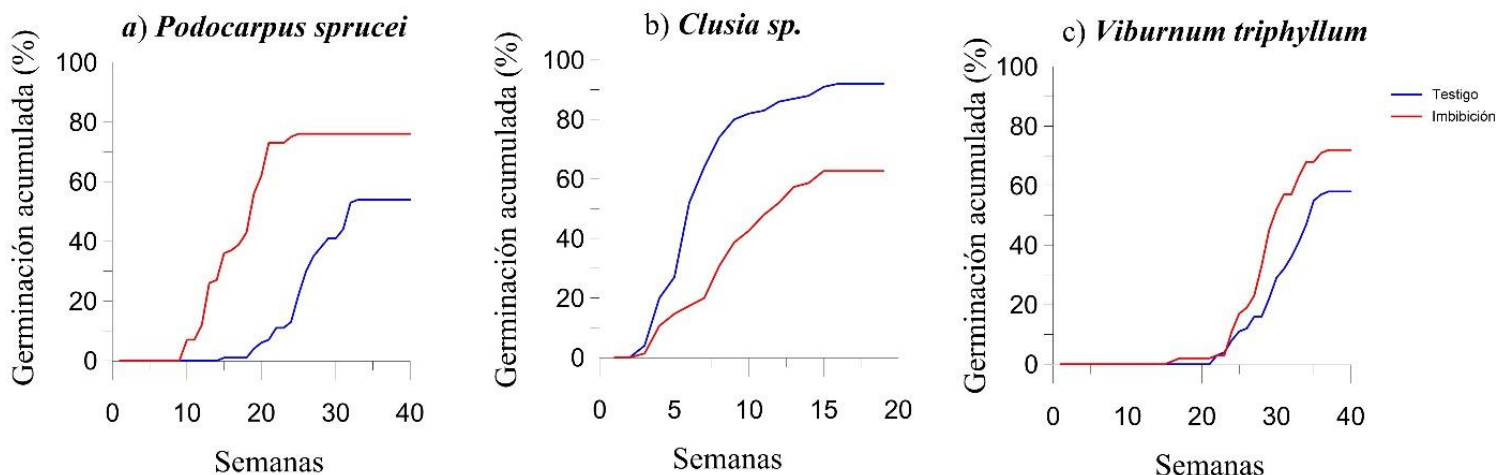


Figura 8. Porcentaje de germinación promedio acumulada de las especies en estudio, provenientes de un proceso de imbibición por 72 horas, en comparación con el testigo.

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: a) *Podocarpus sprucei*, b) *Clusia sp* y c) *Viburnum triphyllum*



7.2 Objetivo 2

7.2.1 Comparación de resultados entre tratamientos por especie

7.2.1.1 *Podocarpus sprucei*.

La Prueba de Kruskal Wallis indicó que el porcentaje de germinación para la especie *P. sprucei*, frente a la aplicación de tratamientos pre germinativos (físicos y químicos) fue estadísticamente significativa ($p < 0,05 = 0,00499$).

El porcentaje de germinación fue mayor en los tratamientos: escarificación ácida por 3 minutos (62%) y estratificación fría por 21 días (60%). Los tratamientos con germinación más baja fueron: estratificación fría por 14 días (25%) y estratificación caliente a 70°C (0%) (Ver Figura 9 y Tabla 7).

En cuanto a los días a la germinación, los tratamientos: remojo en solución hormonal por 12 horas, escarificación ácida por 3 y 5 minutos, estratificación fría por 7 días y el testigo iniciaron la germinación al mismo tiempo (15 semanas). Mientras que en los tratamientos: remojo en solución hormonal por 36 horas y estratificación fría por 14 días, la germinación se retrasó (21 semanas).

Adicionalmente, en el testigo se detuvo la germinación antes que en resto de tratamientos (33 semanas), en los que en algunos casos llegó a prolongarse hasta la semana 28 (remojo en solución hormonal por 24 horas) (Ver Anexo 27).

7.2.1.2 *Clusia sp.*

La Prueba de Kruskal Wallis indicó que el porcentaje de germinación para la especie *Clusia sp.*, frente a la aplicación de tratamientos pre germinativos (físicos y químicos) fue estadísticamente significativa ($p < 0,05 = 0,000036$).



El porcentaje de germinación fue en el testigo (92%), seguido del tratamiento de estratificación caliente a 30°C (89%). El tratamiento que presentó la germinación más baja fue estratificación fría por 7 días (17%). Estratificación caliente a 40 y 70°C, no mostraron germinación (0%) (Ver Figura 9 y Tabla 7).

Los tratamientos iniciaron su germinación alrededor de la semana 3 y 4 después de la siembra. La germinación de los mejores tratamientos: testigo y estratificación caliente a 30°C se detuvieron a las 16 y 18 semanas respectivamente (Ver Anexo 28).

7.2.1.3 *Viburnum triphyllum*.

La Prueba de Kruskal Wallis indicó que el porcentaje de germinación para la especie *Viburnum triphyllum*, frente a la aplicación de tratamientos pre germinativos (físicos y químicos) fue estadísticamente significativa ($p < 0,05 = 0,000047$).

Se obtuvo mayor porcentaje de germinación en los tratamientos de estratificación caliente a 30° y 40°C con valores de 80 y 82% respectivamente, frente al testigo el cual presentó 58% de una germinación. El porcentaje de germinación más bajo se registró en el tratamiento de remojo en solución hormonal por 36 horas (40%) (Ver Figura 9 y Tabla 7).

Los tratamientos con escarificación ácida por 3 minutos y estratificación fría por 21 días, presentaron menos días a la germinación (15 y 16 semanas) en comparación con el resto de tratamientos. Por otro lado, en los tratamientos de Estratificación fría (7 y días) la germinación se detuvo precozmente (32 y 33 semanas) (Anexo 30).



7.2.2 Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos en las tres especies forestales

7.2.2.1 Estratificación fría.

Podocarpus sprucei presentó mejores resultados al exponer sus semillas a estratificación fría a 4°C por 21 días alcanzando el 60% de germinación. Mientras que a 7 y 14 días los resultados fueron similares ya que se obtiene 48% y 25% respectivamente. A pesar que a los 21 días se obtiene buenos resultados en la variable anterior, el tiempo a la germinación se vio retrasado en comparación con el testigo. La estratificación fría influyó en el retraso tanto del inicio como del fin de la germinación de esta especie, en relación al testigo.

En *Clusia sp.* el porcentaje de germinación estadísticamente fue similar en los tratamientos tanto a 7 como a 21 días de estratificación fría, con un porcentaje de germinación de 82% y 45% respectivamente, mostrando los resultados más bajo 14 días con el 17% de germinación. El testigo y los tratamientos de estratificación fría iniciaron su germinación al mismo tiempo, sin embargo, los tratamientos concluyeron con la germinación antes que el testigo.

Viburnum triphyllum no presentó diferencia en el porcentaje de germinación tras inducir las semillas a diferentes tiempos de exposición a bajas temperaturas. Tanto el tiempo de inicio como de fin de la germinación de esta especie son inferiores a los mostrados por el testigo, lo cual demostró que este tratamiento pese a no tener diferencia significativa en el porcentaje de germinación influyó positivamente en el tiempo a la germinación.

7.2.2.2 Estratificación caliente.

Las semillas de *Podocarpus sprucei* se comportaron de la misma manera a temperaturas de 30°C y 40°C, mientras que a 70°C no se obtuvo resultados (0%) en relación al porcentaje de germinación. La estratificación caliente tuvo un efecto negativo en el tiempo de germinación, ya



que este se vio retrasado en comparación con el testigo, el cual germinó en la semana 15 y finalizó en la semana 33. Mientras que a 30 y 40°C inició a las 18 y 19 semanas y finalizó a las 37 y 35 semanas respectivamente (Ver Anexo 28).

Clusia sp. Obtuvo resultados significativos a 30°C alcanzando el 89% de germinación. Mientras que a 40°C y 70°C no existió germinación (0%). En cuanto a los días a la germinación, se observó un retraso en relación al testigo ya que a 30°C la germinación inició en la semana 4 y finalizó en la semana 18 (Ver Anexo 29).

Viburnum triphyllum presentó los mejores resultados entre los tratamientos aplicados a 30°C y 40°C con porcentajes de germinación de 80% y 82% respectivamente. A 70°C no existió germinación (0%). En cuanto al tiempo esta inició a las 22 semanas a 30°C, y se retrasó 1 semana a 40°C (23 semanas), para los dos tratamientos esta especie finalizó su germinación a las 35 semanas, de tal manera que se redujo los días a la germinación en relación al testigo (37 semanas) (Ver Anexo 30).



7.2.3 Influencia de los tratamientos pre germinativos químicos en la germinación de las tres especies forestales

7.2.3.1 Escarificación ácida.

Podocarpus sprucei mostró diferencias significativas tras sumergir sus semillas en ácido sulfúrico al 1% durante 3 minutos alcanzando 62% en la germinación, seguido de los tratamientos con inmersiones a 5 y 10 minutos con porcentajes de 56% y 44 % respectivamente. Por ello, se infiere que en esta especie el porcentaje de germinación disminuyó a medida que se aumentó el tiempo de inmersión. Esta especie inició su germinación a las 15 semanas en los tratamientos a 3 y 5 minutos como en el testigo; sin embargo, se observó un retraso en la germinación en el tratamiento a 10 minutos (19 semanas). La germinación finalizó después de 37 semanas en los tres tratamientos, siendo superiores al testigo, el cual concluyó a las 33 semanas.

Clusia sp. por su parte alcanzó resultados superiores en inmersiones de ácido sulfúrico a 5 y 10 minutos consiguiendo porcentajes de germinación de 83% y 84% respectivamente, mientras que a 3 minutos de inmersión se obtuvo el menor porcentaje (79%). Con base a lo mencionado anteriormente, se infiere que en esta especie aumentó el porcentaje de germinación conforme se incrementó el tiempo de inmersión. El tiempo de germinación tras la aplicación de los 3 tratamientos se retrasó 1 semana en relación al testigo, iniciando a las 4 semanas. Tanto el testigo como los tratamientos a 3 y 5 minutos finalizaron su germinación a las 16 semanas, mientras que a los 10 minutos de inmersión finalizó una semana más tarde (17 semanas).

En *Viburnum triphyllum* el testigo y el tratamiento a 5 minutos de inmersión empezaron a germinar a las 22 semanas, mientras que los otros tratamientos a 3 y 10 minutos de exposición, se aceleró la germinación a la semana 15 y 20 respectivamente. Además de lo citado anteriormente,



en los tratamientos a 3 y 5 minutos de inmersión la germinación finalizó 1 semana antes (36 semanas), en comparación a los resultados obtenidos en el testigo y en el tratamiento a 10 minutos de inmersión (37 semanas). En esta especie no existió diferencia significativa en el porcentaje de germinación, mostrando que reaccionaron de la misma manera a los tres tiempos de inmersión, alcanzado porcentajes de germinación de 75%, 72% y 69% a 3, 5 y 10 minutos respectivamente.

7.2.3.2 Inmersión en solución hormonal.

Estadísticamente las tres especies en estudio, *Podocarpus sprucei*, *Clusia sp.* y *Viburnum triphyllum*, reaccionaron de la misma manera frente a la aplicación de ácido giberélico a 300 ppm en diferentes tiempos de exposición. Sin embargo existió diferencia en el tiempo de germinación de cada especie en relación con el testigo.

Podocarpus sprucei y *Clusia sp.*, necesitaron más tiempo para iniciar y finalizar la germinación en los diferentes niveles de este tratamiento, en relación al testigo. En *Viburnum triphyllum* se observó que en los tratamientos a 12 y 48 horas de inmersión en solución hormonal existió una reducción en los días a la germinación y en la finalización de la misma, en comparación con el testigo.

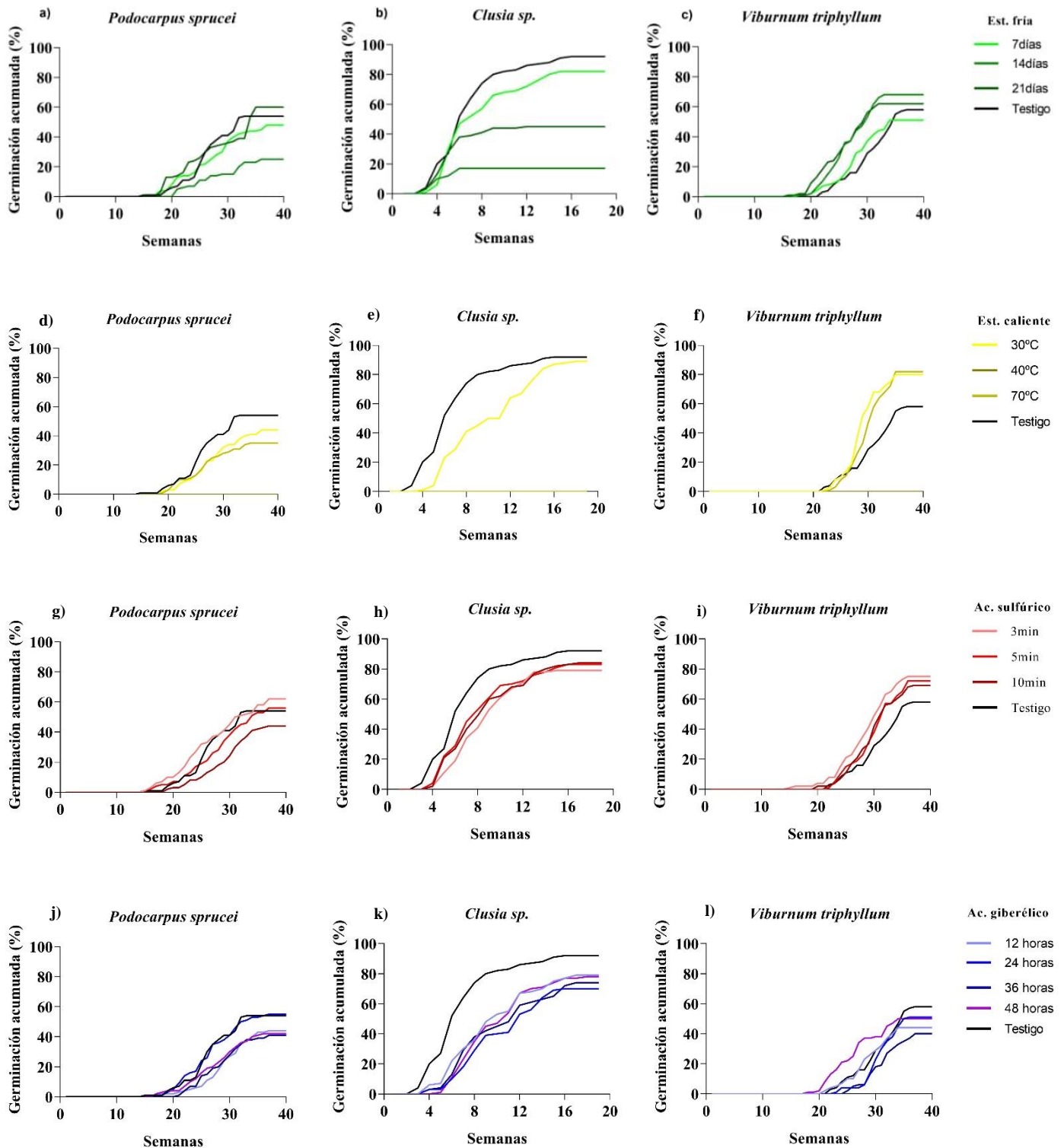


Figura 9: Media del porcentaje de germinación acumulada y velocidad de la germinación de los diferentes tratamientos aplicados en *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum* frente al testigo.

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: a, b, c) estratificación fría a 4°C (7, 14 y 21 días); d, e, f) estratificación caliente por 12 horas (30, 40 y 70°C); g, h, i) escarificación ácida (ácido sulfúrico al 10%) por 3, 5 y 10 minutos y j, k, l) Remojo en solución hormonal (ácido giberélico a 300 ppm) durante 12, 24, 36 y 48 horas.



Tabla 7

Media de los porcentajes de germinación de semillas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*, sometidas a diferentes tratamientos pre germinativos.

Tratamientos pre germinativos	Nivel	<i>Podocarpus sprucei</i>		<i>Clusia sp.</i>		<i>Viburnum triphyllum</i>	
		Germinación (%)		Germinación (%)		Germinación (%)	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE
Estratificación fría (días)	7	48ab	13,47	82ab	2,31	51ab	12,81
	14	25ab	2,00	17b	6,83	68ab	3,27
	21	60a	11,31	45ab	5,03	62ab	9,52
Estratificación caliente (° C)	30	44ab	15,66	89a	5,03	80a	8,64
	40	35ab	11,94	0b	0,00	82a	7,66
	70	0b	0,00	0b	0,00	0b	0,00
Escarificación ácida (minutos)	3	62a	10,58	79ab	8,87	75ab	10,52
	5	56ab	19,87	83a	10,00	72ab	12,65
	10	44ab	23,55	84a	8,64	69ab	2,00
Remojo en solución hormonal (horas)	12	44ab	19,87	79ab	7,57	44ab	11,78
	24	55ab	6,83	70ab	4,00	51ab	14,38
	36	41ab	10,00	74ab	13,66	40ab	8,64
	48	42ab	4,00	78ab	17,44	50ab	5,16
Testigo	T	54ab	10,58	92a	3,27	58ab	12,00

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: DE= desviación estándar, las diferentes letras significan diferencias significativas entre grupos de acuerdo al test de Nemenyi ($p < 0,05$). N=4 (25 semillas por repetición).

Tabla 8

Germinación de *Podocarpus sprucei*, *Clusia sp* y *Viburnum triphyllum* mediante el Test de Kruskal Wallis.

Especie	χ^2	Df	Germinación (%) <i>p-value</i>
<i>Podocarpus sprucei</i>	29,824	13	0,00499
<i>Clusia sp</i>	43,567	13	0,000036
<i>Viburnum triphyllum</i>	42,837	13	0,000047

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: Los valores significativos se encuentran resaltados ($p < 0,05$). Indican los niveles de significancia de los valores.



7.3 Objetivo 3

Para las repeticiones que no alcanzaron el número de plántulas indicado en la metodología para la fase de desarrollo inicial en invernadero se consideró el número total de plántulas obtenidas en el objetivo 2 (Ver Anexo 31).

7.3.1 Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en la altura de tres especies forestales nativas

7.3.1.1 Podocarpus sprucei.

Estadísticamente no existió diferencia significativa en la altura de las plantas de esta especie ($p > 0,05 = 0,2935$) (Ver Tabla 10). Sin embargo, numéricamente los tratamientos: estratificación caliente a 30°C y escarificación ácida por 5 minutos, presentaron mayor altura inicial promedio con 4,33 y 4,42cm y alturas promedio final de 6,02 y 5,83cm respectivamente, en comparación con el testigo, el cual alcanzó una altura promedio inicial de 3,69cm y una altura promedio final de 5,25cm. Contrariamente, las plantas que presentaron menor tamaño fueron aquellas provenientes del tratamiento remojo en solución hormonal por 12 y 36 horas, con alturas promedio iniciales de 2,97 y 2,64cm y alturas promedio finales de 5,05 y 4,45cm respectivamente (Ver Figura 10 y Tabla 9).

7.3.1.2 Clusia sp.

Estadísticamente existió diferencia significativa en la altura de esta especie ($p < 0,05 = 8,21E-05$) (Ver Tabla 11). Las plántulas provenientes de escarificación ácida por 5 y 10 minutos presentaron alturas mayores tras los dos meses de monitoreo, con alturas promedio iniciales de 3,67 y 3,86cm y alturas promedio finales de 5,70 y 5,52cm respectivamente, frente al testigo que presentó una altura promedio inicial de 2,99cm y una altura promedio final de 4,67cm. Contrariamente, los



tratamientos que presentaron alturas menores fueron: estratificación caliente por 30°C y remojo en solución hormonal por 24 horas, con alturas promedio iniciales de 1,58 y 1,78cm y alturas promedio finales de 2,29 y 2,67cm respectivamente (Ver Figura 10 y Tabla 9).

7.3.1.3 *Viburnum triphyllum*.

Estadísticamente no existió diferencia significativa ($p > 0,05 = 0,756$) en la altura promedio de esta especie (Ver Tabla 12). Sin embargo, numéricamente se registró mayor altura promedio de planta en los tratamientos de estratificación caliente a 30 y 40 °C, cuya altura promedio es de 6,60 y 5,97cm respectivamente, así como en el tratamiento de 7 días de estratificación fría (6,13cm). Los valores promedios de altura más bajos se registraron en escarificación ácida por 5 minutos de exposición (4,92cm) (Ver Figura 10 y Tabla 9).

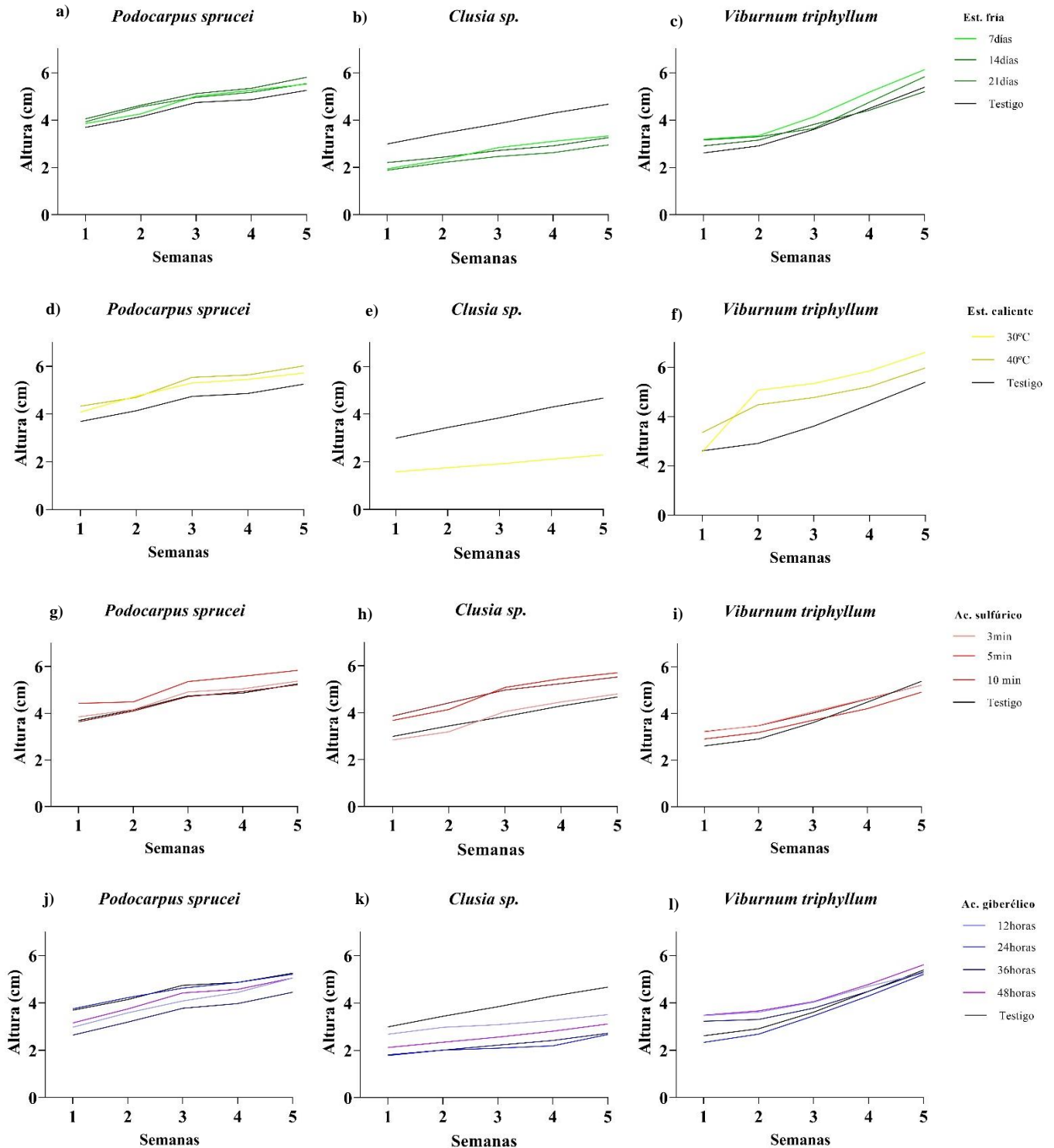


Figura 10. Media de la altura de plántulas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*, tras la aplicación de los diferentes tratamientos pre germinativos frente al testigo.

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: a, b, c) estratificación fría a 4°C (7, 14 y 21 días); d, e, f) estratificación caliente por 12 horas (30, 40 y 70°C); g, h, i) escarificación ácida (ácido sulfúrico al 10%) por 3, 5 y 10 minutos y j, k, l) remojo en solución hormonal (ácido giberélico a 300 ppm) durante 12, 24, 36 y 48 horas.



7.3.2 Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en el número de hojas de tres especies forestales nativas

7.3.2.1 *Podocarpus sprucei* P.

Estadísticamente no existió diferencia significativa en el número de hojas de esta especie ($p > 0,05 = 0,201$) (Ver Anexo 10). Sin embargo, las plántulas provenientes de los tratamientos: escarificación ácida por 5 minutos y estratificación fría por 21 días presentaron mayor número de hojas, con un promedio de 35 y 33 hojas al final del monitoreo respectivamente. Opuestamente, los tratamientos que mostraron menor número de hojas fueron: escarificación ácida por 10 minutos, remojo en solución hormonal por 48 horas, estratificación caliente a 30°C y el testigo, todos con un promedio de 28 hojas al final del monitoreo (Ver Figura 11 y Tabla 9).

7.3.2.2 *Clusia* sp.

Estadísticamente existió diferencia significativa en el número de hojas de esta especie ($p < 0,05 = 9,27E-05$) (Ver Tabla 11). Las plántulas provenientes del tratamiento: escarificación ácida por 5 y 10 minutos presentaron mayor número de hojas al final del monitoreo, con un promedio de 5 hojas, frente al testigo que tuvo un promedio 3 hojas. Contrariamente los tratamientos que mostraron menor número de hojas al final del monitoreo fueron: remojo en solución hormonal por 48 horas, estratificación fría por 14 días y estratificación caliente por 30°C que mantuvieron el mismo número de hojas durante el estudio (Ver Figura 11 y Tabla 9).

7.3.2.3 *Viburnum triphyllum*.

Se obtuvo un número promedio de hojas homogéneo en esta especie. Estadísticamente no existió diferencia significativa ($p > 0,05 = 0,842$) (Ver Tabla 12). Se registró entre 7 y 8 hojas promedio en los tratamientos aplicados (Ver Figura 11 y Tabla 9).

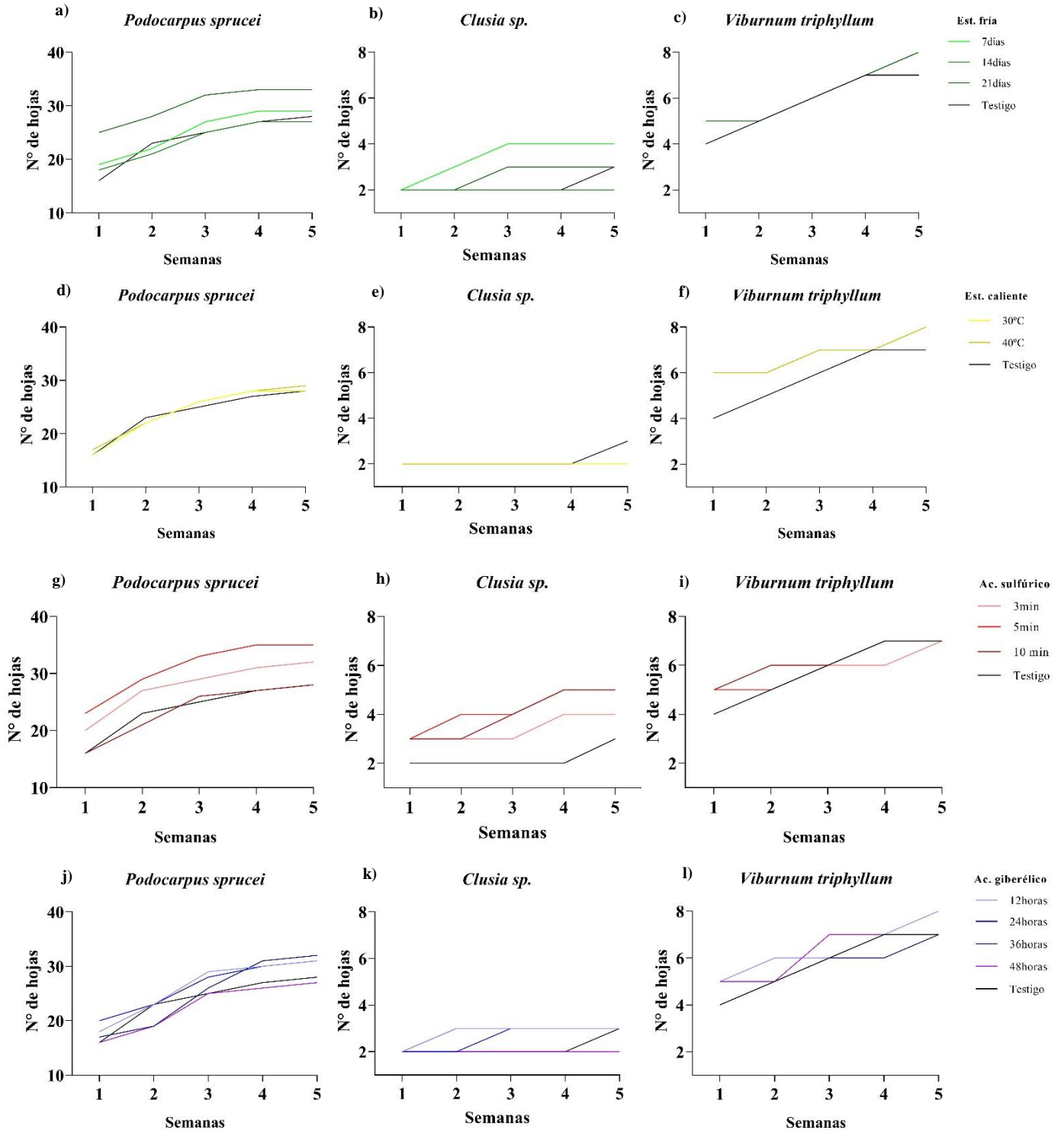


Figura 11. Media del número de hojas de las plántulas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*, tras la aplicación de los diferentes tratamientos pre germinativos frente al testigo.

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: a, b, c) estratificación fría a 4°C (7, 14 y 21 días); d, e, f) estratificación caliente por 12 horas (30, 40 y 70°C); g, h, i) ácido sulfúrico al 10% por 3, 5 y 10 minutos y j, k, l) ácido giberélico a 300 ppm (12, 24, 36 y 48 horas).



7.3.3 Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en la supervivencia de tres especies forestales nativas

7.3.3.1 *Podocarpus sprucei* P.

No existió diferencia significativa ($p > 0,05 = 0,232$) en la supervivencia de esta especie (Ver Tabla 10). Las plántulas provenientes de los tratamientos: escarificación ácida por 3 minutos mantuvieron el 100% de supervivencia al final del monitoreo, seguido de los tratamientos: escarificación ácida por 5 minutos y remojo en solución hormonal por 48 horas (97%). Los tratamientos con porcentajes de supervivencia más bajos fueron: testigo y estratificación caliente por 40°C con el 78 y 79% respectivamente (Ver Figura 12 y Tabla 9).

7.3.3.2 *Clusia sp.*

Estadísticamente existió diferencia significativa ($p < 0,05 = 0,00302$) en la supervivencia de esta especie (Ver Tabla 11). El mayor porcentaje de supervivencia se registró en los tratamientos: escarificación ácida por 3 y 5 minutos y remojo en solución hormonal por 24 horas (100%), seguido del tratamiento de escarificación ácida por 10 minutos (98%). Los tratamientos con porcentajes de supervivencia más bajos fueron: estratificación fría por 14 días y estratificación caliente por 30°C con 69 y 70 % respectivamente (Ver Figura 12 y Tabla 9).

7.3.3.3 *Viburnum triphyllum.*

Estadísticamente existió diferencia significativa ($p < 0,05 = 1,534E-08$) en la supervivencia de esta especie (Ver Tabla 12). Las plántulas provenientes de los tratamientos: estratificación fría a 21 días y escarificación ácida por 10 minutos obtuvieron los valores más altos de supervivencia (100%). Los valores más bajos de supervivencia se registraron en los tratamientos: estratificación



fría a 14 días y remojo en solución hormonal durante 36 horas con 53 y 50% respectivamente (Ver Figura 12 y Tabla 9).

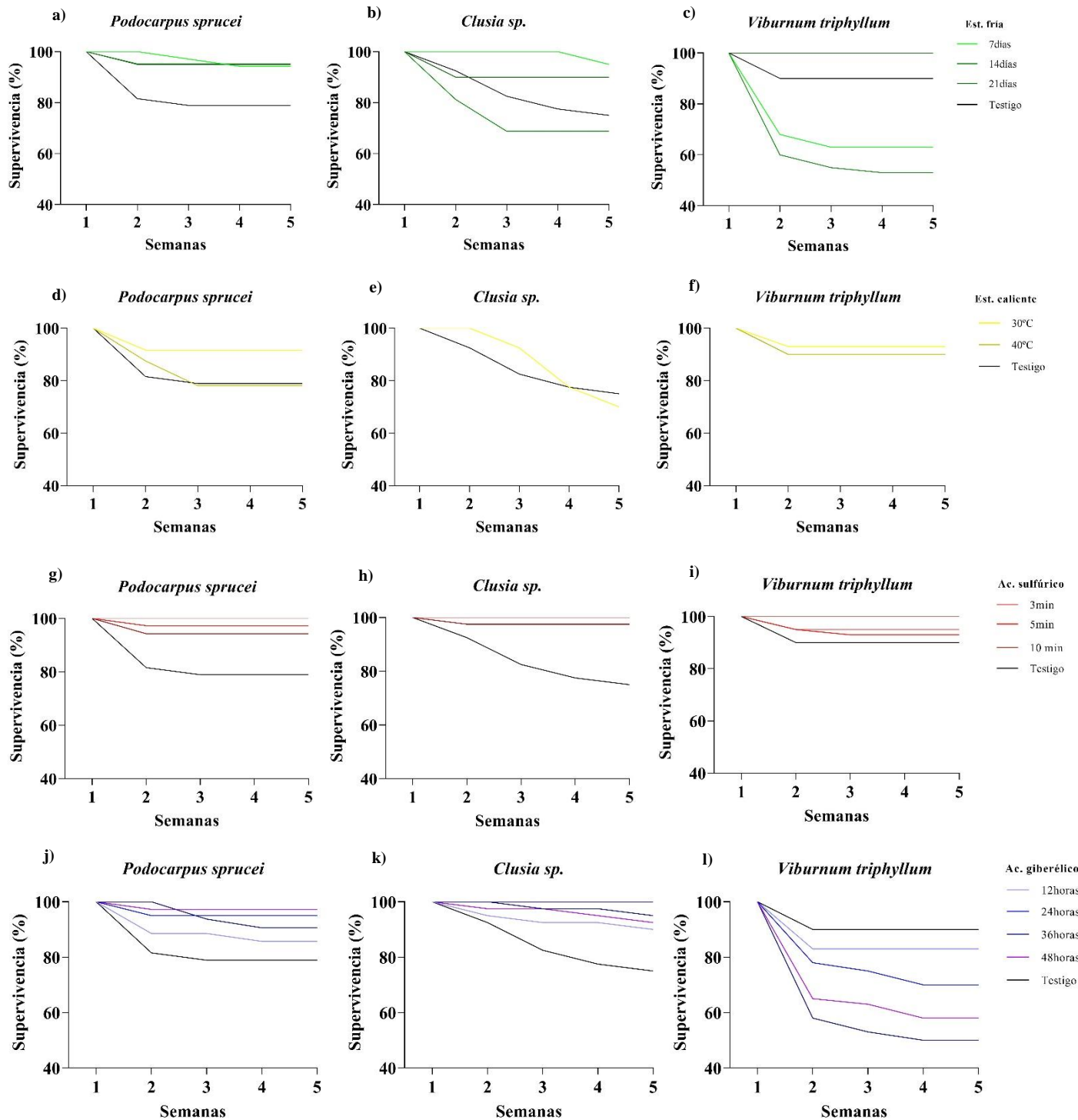


Figura 12. Media de la supervivencia de las plántulas de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*, tras la aplicación de los diferentes tratamientos pre germinativos frente al testigo.

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: a, b, c) estratificación fría a 4°C (7, 14 y 21 días); d, e, f) estratificación caliente por 12 horas (30, 40 y 70°C); g, h, i) ácido sulfúrico al 10% por 3, 5 y 10 minutos y j, k, l) ácido giberélico a 300 ppm (12, 24, 36 y 48 horas).



Tabla 9

Promedio de altura (cm), número de hojas y supervivencia (%) tras 2 meses de monitoreo del desarrollo inicial de las especies *Podocarpus sprucei*, *Clusia sp.* y *Viburnum triphyllum* en condiciones de invernadero.

Tratamiento Pre-germinativo	Nivel	<i>Podocarpus sprucei</i>					<i>Clusia sp.</i>					<i>Viburnum triphyllum</i>				
		Altura (cm)		N.º hojas		Supervivencia (%)	Altura (cm)		N.º hojas		Supervivencia (%)	Altura (cm)		N.º hojas		Supervivencia (%)
		Inicial	Final	Inicial	Final	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Final
Estratificación fría (días)	7	3,85	5,52a	19	29a	94a	2,20	3,26ab	2	4a	95ab	3,19	6,13	4	8	63bc
	14	3,93	5,54a	18	27a	95a	1,94	3,33ab	2	2b	69c	3,16	5,83	5	8	53c
	21	4,05	5,81a	25	33a	95a	1,88	2,95ab	2	3ab	90ab	2,91	5,20	5	8	100a
Estratificación caliente (°C)	30	4,08	5,72a	16	28a	92a	1,58	2,29b	2	2b	70bc	2,57	6,60	6	8	93ab
	40	4,33	6,02a	17	29a	78a	-	-	-	-	-	3,35	5,97	6	8	90ab
	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Escarificación ácida (minutos)	3	3,84	5,37a	20	32a	100a	2,84	4,80ab	3	4a	100a	3,21	5,22	5	7	95ab
	5	4,42	5,83a	23	35a	97a	3,67	5,70a	3	5a	100a	2,91	4,92	5	7	93ab
	10	3,63	5,22a	16	28a	94a	3,86	5,52a	3	5a	98ab	3,23	5,22	5	7	100a
Remojo en solución hormonal (horas)	12	2,97	5,05a	18	31a	86a	2,68	3,51ab	2	3ab	90ab	3,46	5,26	5	8	83bc
	24	3,75	5,21a	20	31a	95a	1,78	2,67b	2	3ab	100a	2,33	5,20	4	7	70bc
	36	2,64	4,45a	17	32a	91a	1,81	2,72ab	2	3ab	95ab	3,22	5,31	4	7	50c
	48	3,15	5,05a	16	27a	97a	2,12	3,11ab	2	2b	93ab	3,48	5,61	5	7	58bc
Testigo	T	3,69	5,25a	16	28a	79a	2,99	4,67ab	2	3ab	75bc	2,61	5,39	4	7	90ab

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: (-) representa ausencia de plántulas. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos para las variables: altura, número de hojas y supervivencia de acuerdo al test de Nemenyi. (p <0,05).

**Tabla 10**

Análisis estadístico del factor: tratamiento, sobre la altura número de hojas y supervivencia de Podocarpus sprucei mediante la prueba de Kruskal Wallis.

Factor (Tratamiento) Variable	χ^2	Df	p-value
Altura	14,113	12	0,2935
Número de hojas	32,86	12	0,201
Supervivencia	193,2	12	0,232

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: Los valores significativos se encuentran resaltados ($p < 0,05$). (*, **, ***) Indican los niveles de significancia de los valores p.

Tabla 11

Análisis estadístico del factor: tratamiento, sobre la altura, número de hojas y supervivencia de Clusia sp, mediante la prueba de Kruskal Wallis.

Factor (Tratamiento) Variable	χ^2	Df	p-value
Altura	37,875	11	8,21E-05***
Número de hojas	37,562	11	9,27E-05***
Supervivencia	28,195	11	0,00302*

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: Los valores significativos se encuentran resaltados ($p < 0,05$). (*, ***) Indican los niveles de significancia de los valores p.

Tabla 12

Análisis estadístico del factor: tratamiento, sobre la altura, número de hojas y supervivencia de Viburnum triphyllum, mediante la prueba de Kruskal Wallis.

Factor (Tratamiento) Variable	χ^2	Df	p-value
Altura	8,35	12	0,756
Número de hojas	7,22	12	0,842
Supervivencia	60,91	12	1,534E-08***

Elaboración: Piña, G. y Sarmiento, D.

Nota: Los valores significativos se encuentran resaltados ($p < 0,05$). (***) Indican los niveles de significancia de los valores p.



8. DISCUSIONES

8.1 Características morfológicas y físicas de las tres especies nativas

8.1.1 Caracterización morfológica

Las especies *Podocarpus sprucei*, *Clusia sp.* y *Viburnum triphyllum* presentaron diferencias en el tamaño de la semilla, tamaño del embrión, posición y tipo de embrión. En lo relacionado al tamaño de las semillas, sobresale *V. triphyllum* que posee mayor tamaño de semillas (LS= 8,94mm, AS=6,78mm) pero su embrión es el más pequeño (LE=2,16mm, AE=0,98mm), lo cual coincide con el trabajo de Ochoa (2019). Aquí, se encontró que el tamaño del embrión representa $\frac{1}{4}$ del tamaño de la semilla. La caracterización morfológica realizada en *Podocarpus sprucei* (LS= 6,43mm, AS=5,54mm) concuerda con los resultados reportados por Minga y Verdugo (2016), quienes mencionan que esta especie posee LS de 5 a 7mm y de AS de 4 a 6mm. En *Clusia sp.*, se obtuvo datos similares (LS= 8,44mm, AS=3,75mm) a los reportados por Martínez, Castillo y Nicolalde (2015) en *Clusia flava*. Aquí, se menciona que el largo de la semilla oscila entre 6-10 mm y el ancho en aproximadamente de 2mm.

Podocarpus sprucei y *Clusia sp.*, presentaron la misma posición y tipo de embrión (axilar-lineal). Mientras que, *V. triphyllum* de acuerdo a su ubicación se clasificó como basal y de acuerdo a su tipo se clasificó como rudimentario, lo que difiere con los resultados obtenidos por Ochoa (2019), quien lo clasifica como tipo lineal. Sin embargo, al observarlo con detalle en el microscopio y empleando el programa *Infinity analyze* se estableció que no correspondía a ese grupo, ubicándolo en el más cercano debido a las características observadas.

El tamaño y tipo de embrión de *P. sprucei* y *V. triphyllum* confirmó que estas especies poseen latencia morfológica, debido a que los embriones observados eran poco desarrollados,



lo cual ha sido reportado en otros estudios en estas especies (Ochoa, 2019). Las especies que poseen latencia morfológica se caracterizan por poseer embriones pequeños (menos de la mitad del tamaño de la semilla), los cuales requieren tiempo para crecer y dar paso a la germinación (Pérez, Rodríguez, Vargas, & Melgarejo, 2018). Esta condición justificaría el largo periodo de tiempo requerido por *Podocarpus sprucei* y *Viburnum triphyllum* para emitir estructuras primarias visibles (15 y 22 semanas en el testigo).

8.1.2 Caracterización física

Las pruebas de imbibición no mostraron diferencias significativas en el incremento de peso de las semillas de *Viburnum triphyllum* ($p > 0,05 = 0,1547$), lo que confirma la poca permeabilidad del endocarpo y la existencia de latencia exógena (Mérola & Díaz, 2012). Afirmación que concuerda con lo demostrado por Ochoa (2019), quien al someter las semillas de *V. triphyllum* con endocarpo a un proceso de imbibición por 72 horas aumentaron un 8% de su peso, mientras que las semillas expuestas sin endocarpo aumentaron hasta un 19% de su peso, existiendo diferencia significativa en el aumento de peso de semillas con endocarpo y semillas sin endocarpo ($p < 0,05 = 0,001$). Demostrando que el endocarpo limita el paso del agua al interior de la semilla, sugiriendo un tipo de latencia física.

Viburnum triphyllum pese a no mostrar diferencias significativas en las pruebas de imbibición, el porcentaje de germinación obtenido en las semillas embebidas (72%) fue similar al obtenido en las pruebas de viabilidad (79%), lo que sugeriría la nula influencia de la imbibición en el porcentaje de germinación, pero la obtención de estos resultados podrían deberse al escaso desarrollo del embrión (latencia morfológica) al momento de aplicar las pruebas de imbibición (Cardoso, 1988), ya que el embrión de esta especie requiere tiempo para desarrollarse por completo (Baskin y Baskin, 2004).



Por otro lado, las pruebas de imbibición mostraron que, existió diferencia significativa en peso de las semillas de *Podocarpus sprucei* y *Clusia sp.* ($p < 0,05 = 0,0005$ y $0,0034$ respectivamente), a medida que se incrementó el tiempo de inmersión en agua destilada, lo que corrobora la existencia de permeabilidad en la cubierta de las semillas de estas especies (Orozco et al., 2007) y descarta la existencia de latencia exógena. Debido a que al sumergir semillas en agua o en otras soluciones se rehidratan las estructuras celulares, lo que se deriva en el incremento de la tasa respiratoria de la semilla (Artola et al., 2003; Sánchez et al., 2007). Esta serie de eventos estimula la aparición de la radícula, es por ello que algunas especies mejora la germinación (Sánchez, Ortay Muñoz, 2001), tal es el caso de *Podocarpus sprucei*, cuyos valores germinativos fueron superiores (76%) en comparación con el testigo en donde no se empleó imbibición (54%) e incluso con los valores obtenidos en las pruebas de viabilidad (50%).

En *Clusia.sp.*, los tiempos prolongados de imbibición, afectaron el desarrollo germinativo de las semillas, debido a que la permeabilidad y el tiempo de imbibición óptimo varía de especie en especie (Amusa, 2011) y al exceder el nivel de hidratación requerido por esta especie, se promovió la aparición de mecanismos de deterioración celular (Bewley y Black, 1994), los cuales causaron el bajo porcentaje de germinación (63%) e inclusive inferiores al testigo (92%) y a los obtenidos en las pruebas de viabilidad (88%).

8.2 Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en el porcentaje de germinación de las tres especies forestales nativas

8.2.1. Estratificación fría

El factor ambiental juega un rol importante, ya que la temperatura en el que se originan las especies condicionan la germinación de las mismas (Manjkhola, Dhar, y Rawal, 2003) es



por ello que cada especie posee su propio rango de temperatura óptimo para su desarrollo (Caroca, Zapata y Vargas, 2016).

En *Podocarpus sprucei* se observó que el aumento de periodos de tiempo (21 días) mejoró significativamente el porcentaje de germinación de esta especie (60%), alcanzando valores de germinación similares a los obtenidos en la escarificación ácida (62%), demostrando que pese a que esta especie no posee latencia exógena, estos tratamientos favorecieron la actividad enzimática, ablandaron la testa y formaron grietas, mejorando el ingreso el agua e intercambio gaseoso (Melgarejo, 2012). Con ello se aumentó el porcentaje de germinación de las semillas, ya que el embrión tuvo más posibilidades de desarrollarse, pues la capa que lo recubre ya no representaba un obstáculo (Espindola, Romero, Ruiz y Luna, 2018). Efectos similares se han observado en *Prunus avium* que tras incrementar lapsos de tiempo (60 días) a bajas temperaturas (4°C) aumentaron el porcentaje de germinación del 4 al 9% (Alarcón, Manzano, Mateos, Pérez y López, 2009).

La estratificación fría no surtió el efecto deseado en el porcentaje de germinación de *Clusia sp.* y *Viburnum triphyllum*, a pesar de que este último posee latencia exógena, pudiendo deberse a que las bajas temperaturas también pueden el congelar los tejidos embrionarios y disminuir la actividad enzimática, factores que limitan la capacidad germinativa (Santiago, Herranz, Copete, Herranz y Ferrandis 2017; James, 1967).

8.2.2. Estratificación caliente

La estratificación caliente ha mostrado diferencias significativas a 30°C en *Clusia sp.* y *V. triphyllum*, este último también mostró resultados a 40°C. Esto concuerda con estudios realizados en *Carica papaya* que tras haber remojado las semillas a 32°C se obtuvo mayor



porcentaje de germinación después de 20 días. Aquí mediante correlación lineal se determinó que mientras más tiempo se mantenga en remojo las semillas, se reducirá el número de días a la emergencia (Figueroa, Adriano y Becerra, 2005).

Autores como Smith, Wang y Msanga (2003) manifiestan que al mantener semillas de *Celtis africana*, *Cordia sinensis* (almacenadas) y *Melia volkensin* en estratificación caliente a 40°C se acelera la germinación, puesto que las altas temperaturas disminuyen la latencia, ya que se estimula la actividad bioquímica encargada de romper el letargo en las semillas, llegando a mejorar su germinación sin que su viabilidad se vea afectada (Martins y Da Silva, 2001). Adicionalmente, autores como James (1967), argumentan que las altas temperaturas estimulan el crecimiento del embrión, promoviendo la germinación. Con base a lo descrito anteriormente, se justificaría lo ocurrido en *Viburnum triphyllum*, especie que posee latencia morfológica y explicaría por qué los tratamientos de estratificación caliente a 30 y 40°C presentaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación en 80 y 82% respectivamente.

Sánchez (2002) demostró que los tratamientos que aplican temperaturas más altas (80 – 100°C) y tiempos de remojo más prolongada (48 horas), permite que los días a la germinación se reduzcan de manera importante en *Leucaena leucocephala*. También, se ha reportado efectos positivos al verter agua caliente a 80°C y al remojar por 24 horas las semillas de *Acacia nilotica* y *Tamarindus indica* (Smith, Wang y Msanga, 2003). En otros estudios, se evidencia que la exposición de semillas a temperaturas elevadas (70°C por 15 horas) disminuye la latencia en *Bracharia brizantha* cv. Marandú, llegando a mejorar su germinación (Martins y Da Silva, 2001).



A pesar de los resultados obtenidos en otros estudios tras someter semillas a altas temperaturas se debe considerar que existe un rango de temperatura óptimo para la germinación de cada especie. Por tal razón, en el presente estudio los tratamientos de agua caliente a 70°C aplicados en las semillas de *Podocarpus sprucei*, *Clusia sp.* y *Viburnum triphyllum* no presentaron germinación. Debido a que las altas temperaturas pueden inhibir la germinación y causar la muerte del embrión (James, 1967). Hecho que coincide con estudios realizados en *Zea mays L.* en donde se indica que el agua caliente durante largos periodos de tiempo, puede causar daños irreversibles en el embrión ocasionando la muerte del mismo (Méndez et al., 2007; Ramírez, Caraballo, Urdaneta y García, 2013).

8.2.3. Remojo en solución hormonal

El uso de soluciones hormonales contribuye con el incremento del porcentaje de germinación de algunas especies, mismas que poseen dificultades para germinar debido a un desequilibrio hormonal interno (Baskin y Baskin, 2004; Varela y Arana, 2010). Tal es el caso de especies como *Cordia alliodora*, *Bursera bipinnata* y *Terminalia amazonia*, en las que tras aplicar diferentes dosis de ácido giberélico incrementaron el porcentaje de germinación en un 37, 30 y 43% respectivamente en relación al testigo (Orantes, Pérez, Rioja y Garrido, 2013).

Opuestamente, en esta investigación en los tratamientos donde se empleó ácido giberélico se observó que el tiempo de inmersión no influyó en el porcentaje de germinación, ya que en las 3 especies no se registró diferencia significativa. Sin lugar a duda, estas especies podrían no reaccionar a este tratamiento tal como otras especies, un ejemplo de ello es *Rubus glaucus* que al exponer sus semillas a diferentes concentraciones de AG3 (500, 1000 y 1500 ppm) no se obtiene diferencia significativa en la germinación (Vásquez et al., 2019).



Otra de las razones podría basarse en que la concentración empleada no es la mejor para estas especies, tal como lo afirman otros autores, quienes al someter semillas de *Jaltomata procumbens* a diferentes tiempos (12 y 24 horas) de inmersión de ácido giberélico no obtuvieron diferencias significativas, pero, al emplear diferentes concentraciones obtuvieron resultados significativos en el porcentaje de germinación (Saldivar et al., 2010).

Adicionalmente, la poca efectividad de este tratamiento en especies como *Viburnum triphyllum*, se suma la escasa permeabilidad de la cubierta, la cual limita el contacto del ácido con las diferentes estructuras de la semilla, ya que el uso de AG3 a 500 ppm en esta misma especie pero sin endocarpo ha mostrado resultados significativos en el porcentaje (65%) y días a la germinación (13 semanas) (Ochoa, 2019).

8.2.4. Escarificación ácida

Viburnum triphyllum no presentó diferencias significativas frente a la aplicación de este tratamiento. En *P. sprucei* se obtuvo diferencias significativas en el porcentaje de germinación tras embeber sus semillas en ácido sulfúrico durante 3 minutos (62%), lo mismo ocurrió en *Clusia sp.* a concentraciones de 5 y 10 minutos (83 y 84%). Lo que prueba que la primera especie requiere menos tiempo de exposición mientras que contrariamente *Clusia sp.*, presenta mejores resultados a medida que se aumenta el tiempo de inmersión. Esto es coincidente, con los estudios expuestos por Raz y Clavero (1996) quienes trataron semillas de *Leucaena leucocephala* con ácido sulfúrico, y registraron el incremento en la germinación de 8 a 22% (en relación al testigo) a medida de que se aumenta la concentración de ácido sulfúrico.



Sin embargo, Insuasty, Ballesteros, Chávez y Quintero (2012) al emplear diferentes concentraciones de ácido sulfúrico a diferentes tiempos de exposición en semillas de la misma especie se pudo determinar que lo importante no es la concentración sino más bien el tiempo de permanencia en el ácido; lo cual podría explicar porque en *Clusia sp.*, mejora la germinación a medida de que aumenta el tiempo de permanencia.

A pesar de ello, se debe considerar que la concentración de ácido sulfúrico y los tiempos de inmersión deben ser medidos para cada especie, puesto que podría causar toxicidad o muerte de los embriones en tiempos y/o concentraciones inadecuadas (Joseph y Delva, 2016).

8.3 Influencia de los tratamientos pre germinativos en el desarrollo inicial (Altura, número de hojas y supervivencia) de las tres especies forestales nativas

Los rasgos morfológicos de números hojas, tallos y raíces varían entre especies, y de estos rasgos depende tanto su crecimiento como supervivencia (Roa y Moreno, 2017). Las especies nativas poseen tasas de crecimiento lento (Ayma y Padilla, 2009), en este caso esa condición dificultó evaluar la funcionalidad de tratamientos pre germinativos en *Podocarpus sprucei* pues se obtuvo un desarrollo inicial homogéneo en la fase de invernadero (Guillen, Ayma y Terceros, 2009). Es por ello que no se puede afirmar con certeza si los tratamientos pre germinativos tienen o no influencia sobre esta especie en esta etapa. Pero en base a los resultados obtenidos en las pruebas Kruskal Wallis *Podocarpus sprucei* estadísticamente no presentó diferencias significativas en ninguna de las variables en estudio durante sus dos primeros meses de crecimiento.

Viburnum triphyllum, por su parte es una especie de crecimiento rápido y follaje tupido (Hernández, Roa y Cortés, 2015). Pese a ello, mostró diferencia significativa tan solo en la



supervivencia. Mostrando el 100% de supervivencia en los tratamientos de estratificación fría a 21 días y escarificación ácida por 10 minutos. Sin embargo, estos resultados no distan mucho de los obtenidos en el testigo. En consecuencia, se sostiene que aunque existió una diferencia significativa en el porcentaje de germinación y en el porcentaje de supervivencia, el resto de parámetros no se ve influenciado por los tratamientos pre germinativos aplicados. Lo que podría deberse a que esta especie se adapta muy bien a cualquier tipo de entorno (Ruano y Benavides, 2018).

Clusia sp., se caracteriza por ser una especie de crecimiento rápido (Minga y Verdugo, 2016), es por ello que se observó diferencias significativas en las variables estudiadas. Los tratamientos pre germinativos además de garantizar la germinación de semillas, también influyeron en el desarrollo en la fase de invernadero, ya que en este mecanismo promovió el elongamiento de sus células, favoreciendo el crecimiento de las mismas (Abril, Ruiz, Alonso y Cabrera, 2017). Tal es el caso de ácido sulfúrico que presentó resultados significativos, especialmente a 5 minutos de inmersión tanto en altura (5,7mm), número de hojas (5) y supervivencia (100%) siendo superior en comparación los resultados obtenidos en los otros tratamientos. Los datos obtenidos en los tratamientos de ácido sulfúrico concuerdan con lo expuesto por Garcés (2003) quien tras aplicar este tratamiento a una concentración del 95% por 10 minutos en semillas de *Erioseya aurata* obtuvo mayores valores en la variable altura sin cambiar su morfología, determinando que la escarificación química promueve el crecimiento de las plántulas.

En esta especie se evidenció que los tratamientos de ácido giberélico no surtieron efecto en el desarrollo inicial. Con respecto a ello Vásquez et al. (2019) afirma que la inmersión en 3 concentraciones de AG3 (500, 1000 y 1500 ppm) no tiene un efecto significativo en la



velocidad de germinación tras la aplicación de diferentes concentraciones de este ácido y tampoco se mostró diferencias en la altura, número de hojas y profundidad de la raíz a los 30 y 60 días al trasplante.

La estratificación caliente por su parte presentó resultados significativos en cuanto al número de hojas tras la exposición a 4 °C durante 7 días. En los tratamientos relacionados con estratificación caliente, a pesar de que tuvieron diferencias significativas en el porcentaje de germinación (objetivo 2), el desarrollo inicial muestra los resultados más bajos entre sus iguales, lo que podría deberse al estrés sufrido tras la aplicación de los tratamientos.



9. CONCLUSIONES

9.1. Caracterización física y morfológica de las tres especies forestales nativas

Las semillas de *Podocarpus sprucei*, presentaron testas permeables (pruebas de imbibición), embriones subdesarrollados en términos de tamaño (1/3 de la semilla), porcentajes de germinación en el testigo del 54 % y tiempos prolongados para germinar (15 semanas, testigo), lo que permite sustentar que esta especie posee latencia endógena.

Las semillas de *Clusia sp.*, presentaron testas permeables (pruebas de imbibición), cortos periodos de tiempo para iniciar su germinación (3 semanas, testigo), porcentajes de germinación en el testigo del 92%, lo que indica la ausencia de latencia en esta especie.

Las semillas de *Viburnum triphyllum* presentaron testas impermeables (pruebas de imbibición), embriones subdesarrollados en términos de tamaño (1/4 de la semilla), porcentajes de germinación en el testigo del 58% y tiempos prolongados para iniciar su germinación (22 semanas, testigo), lo que argumentan la existencia de latencia endógena - exógena en esta especie.

Podocarpus sprucei y *Clusia sp.*, presentaron embriones axilares lineales, mientras que *Viburnum triphyllum* presentó embriones basales rudimentarios poco desarrollados.

9.2. Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en la de las tres especies forestales nativas

Los tratamientos pre germinativos físicos mostraron diferencias significativas al evaluar el porcentaje de germinación de las especies en estudio.

La estratificación caliente a 30°C, mostró diferencias significativas en el porcentaje de germinación de *Clusia sp.* (89%) y *Viburnum triphyllum* (80%), este último también presento



diferencias significativas a 40°C (82%). Mientras que *Podocarpus sprucei* mostró diferencias significativas en la estratificación fría a 4°C durante 21 días (60%).

Los tratamientos pre germinativos químicos relacionados a escarificación ácida mostraron diferencias significativas a 5 y 10 minutos de inmersión en *Clusia sp.* (83 y 84%) y a 3 minutos de inmersión en *Podocarpus sprucei* (62%). El remojo en solución hormonal no mostró diferencias significativas en ninguna de las especies.

9.3. Influencia de los tratamientos pre germinativos físicos y químicos en el desarrollo inicial de las tres especies forestales nativas

Los tratamientos pre germinativos no influyeron en el desarrollo inicial de *Podocarpus sprucei* ya que no se encontró diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas.

En *Clusia sp.*, los tratamientos pre germinativos químicos (escarificación ácida) influyeron en el desarrollo inicial de esta especie, ya que las variables altura, número de hojas y supervivencia mostraron valores más altos que el resto de tratamientos, incluyendo al testigo.

En *Viburnum triphyllum*, estratificación fría por 21 días y escarificación ácida por 10 minutos mostraron diferencias significativas en la supervivencia de esta especie (100%).



10. RECOMENDACIONES

- Actualizar las clasificaciones de los tipos de embriones para forestales de la zona sur del Ecuador, ya que en el caso de *Viburnum triphyllum* y *Clusia sp.* no coincidió con los reportados por otros autores y los resultados reportados se ajustaron a la clasificación más parecida.
- Evaluar otras concentraciones de ácido giberélico en las especies estudiadas, ya que a 300 ppm se obtuvo resultados no significativos a diferencia de los hallazgos difundidos por otros autores.
- Probar otros protocolos de desinfección de semillas en las diferentes especies, ya que se evidenció contaminación en el experimento en la fase de laboratorio.
- Evaluar la germinación en los diferentes tiempos de imbibición ya que en el caso de *Clusia sp.*, al presentar una germinación más temprana, pudo haber necesitado menos horas de imbibición por lo cual se infiere que la imbibición pudo inhibir su germinación.
- Replicar el experimento retirando la testa de las semillas con la finalidad de evaluar si se puede reducir el número de días hasta la germinación.
- Considerar el desarrollo radicular en la fase de germinación y en la fase de invernadero, pues se observó que los tratamientos tienen efectos secundarios en la longitud de las raíces, que pudieron influir en su desarrollo inicial.



11. BIBLIOGRAFÍA

- Abril, R., Ruiz, T., Alonso, J. y Cabrera, G. (2017). Germinación, diámetro de semilla y tratamientos pre germinativos en especies con diferentes finalidades de uso. *Agronomía Mesoamericana*, vol. 28, núm. 3.
- Aguirre, C., y Fassbender, D. (2013). Selección de árboles plus de siete especies forestales nativas de importancia ecológica y económica en la selva central del Perú.
- Alarcón, M., Manzano, M., Mateos, J., Pérez, F. y López, M. (2009). Influencia del almacenamiento en frío en la germinación de semillas estratificadas de cruzamientos de cerezo del Valle del Jerte. *Actas de Horticultura* 54, 99-102
- Amusa, T. (2011). Effects of three pre-treatment techniques on dormancy and germination of seeds of *Azadirachta indica* (Sm. Ex pers). *Journal of Horticulture and Forestry*. 3(4):96-103.
- Antón, A. (2013). "Evaluación De Crecimiento Inicial En Tres Especies Del Género *Inga* En Sistema Agroforestal."
- Araya, E; Gómez, L; Hidalgo, N; y Valverde, R. (2000). Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación in vitro de *Jaul* (*Alnus acuminata*). *Agronomía Costarricense* 24(1):75-80.
- Araoz, S. y Del Longo, O. (2006). Tratamientos pre germinativos para romper la dormición física impuesta por el endocarpo en *Ziziphus mistol* Grisebach. *Revista de Ciencias Forestales: Quebracho* No 13 (56-65)
- Artola, A.; Carrillo, C. y García, S. (2003). Hydropriming: a strategy to increase *Lotus corniculatus* L. seed vigor. *Seed Sci. Tech.* 31:455-463.
- Ayma, A. (2005). Estudio de propagación sexual de pino de monte (*Podocarpus glomeratus* D. Don) en la comunidad de Sailapata - Independencia Tesis. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4873.0005>



- Ayma, A. y Padilla, E. (2009). Efecto de la tala de *Podocarpus glomeratus* (Podocarpaceae) sobre la estructura de un bosque de neblina en los Andes (Cochabamba, Bolivia). *Revista peruana de biología*, 16(1), 73-79.
- Baskin CC y Baskin JM. (1998). *Seeds- Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, USA.
- Bakin, J.M. y Baskin, C.C.(2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. 14. Pag 1-16.
- Bewley, J. y Black, M. (1994). *Seeds physiology of development and germination*. 2nd (Ed.). Plenum Press, New York. 445 p.
- Bokkestijn, A. (2017). *Libro_Bosques_Andinos_Interactivo.pdf*.
- Cardoso, G. (1988). Efectos de la escarificación y la dosis del ácido giberélico (AG3) en la germinación de semillas de curuba (*Passiflora mollissima*)
- Caroca, R., Zapata, N. y Vargas, M. (2016). Efecto de la temperatura sobre la germinación de cuatro genotipos de maní (*Arachis hypogaea* L.). *Chilean journal of agricultural y animal sciences*, 32(2), 94-101.
- Cayón, A. (1999). Fisiología de crecimiento de y desarrollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Ed. Palmas. Vol. 20. No 3. Pág. 43-45.
- Checa, X., Grijalva, J., Galindo, G., Añazco, M., Avilés, M., Ramos, R., y Oviedo, R. (2012). Situación de los Recursos Genéticos Forestales.
- Chirino, E., Ruiz, S., Alberto, V., Espinoza, M., Lozano, P., y Mera, X. (2017). Morpho-functional traits and plant response to drought conditions in seedlings of six native species of Ecuadorian Ecosystems. *Flora*, 233, 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.05.012>
- CORPEI. (2007). *Planificación Estratégica - Bosques Nativos en el Ecuador*.



- Courtis, A. (2013). Germinación de semillas. Cátedra de Fisiología Vegetal, 1–22. Retrieved from <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Guiadeestudio-Germinacion.pdf>
- De la Cuadra, C. (1992). Germinación, latencia y dormición de las semillas. Boletín divulgativo N 3/92. Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. Madrid, España.
- Dorner, J. (2002). An introduction to using native plants in restoration projects, 1–66.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 00. Recuperado en 20 de agosto de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000100011&lng=es&tylng=es
- Espindola, Y., Romero, L., Ruiz, R. y Luna, C. (2018). Influencia de las condiciones de incubación sobre la germinación de semillas de diferentes individuos de *Pterogyne nitens*. *Revista de Ciencias Forestales. Quebracho Vol.26 (1,2):5-17*
- Figuroa, S., Adriano, M. y Becerra, C. (2005). Efecto del remojo en agua sobre la germinación de semillas de papaya var. Maradol. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(1), 27-30.
- Garcés, L. (2003). Tesis: Desarrollo de las primeras etapas de un protocolo de micropropagación para *Erioseyca aurata* (Pfeiffer) Backeberg (Cactaceae), una especie en estado de conservación vulnerable endémica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Universidad Pontificia Católica de Chile. Santiago, Chile.
- Gómez, I., Olivera, Y. y Botello, A. (2009). Efecto de diferentes métodos de escarificación en la emergencia de semillas frescas de *Samanea saman* (algarrobo). *Pastos y Forrajes*, vol. 32, núm. 4, pp. 1-8 Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" Matanzas, Cuba



- González, Y. y Mendoza, F. (2008). Efecto del agua caliente en la germinación de las semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. *Pastos y Forrajes*, vol. 31, núm. 1, 47-52. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" Matanzas, Cuba.
- Guillen, F., Ayma, A. y Terceros, E. (2009). Supervivencia y crecimiento de plántulas Pino de monte (*Podocarpus glomeratus*) probando bioestimulantes o fertilizantes en vivero, Cochabamba, Bolivia.
- Guzmán, S. y Lema, D. (2009). Problemas ambientales en la parroquia Victoria del Portete. Recuperado de <http://cdjbv.ucuenca.edu.ec/ebooks/thg378.pdf>
- Hernández, L., Roa, O. y Cortés, F. (2015). Crecimiento de *Baccharis macrantha* y *Viburnum triphyllum*, dos especies nativas útiles en restauración ecológica, plantadas en un pastizal andino (Boyacá, Colombia). *Biota Colombiana*, 15.
- Herrera, J., Alizaga, R., Guevara, E. y Jiménez, V. (2006). Germinación y crecimiento de la planta. Editorial Universidad de Costa Rica. 1er Ed. San José, Costa Rica. Pág. 19-25.
- Hochwaller, H., Vogel, S., Huber, W., Hammel, E. y Weber, A. (2011). Aspect of reproductive ecology of *Clusia valeori* Standl. And *Clusia peninsulae* Hammel (sp. nov), two Central American species of Clusaceae with resin flower. *Plant Biology* ISSN 1435-8603
- Hofstede, R. G. M., Lips, J. M., y Jongsma, W. (1998). Geografía, ecología y forestación de la Sierra Alta del Ecuador: Revisión de literatura.
- Insuasty, E., Ballesteros, W., Chavez, G. y Quintero A. (2012). Efecto de tratamientos pre germinativos con ácido sulfúrico (H₂SO₄) en semillas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Revista investigación pecuaria* vol. 1. Páginas 35-44



- Islam, S., Mia, A., Hossaint, T., Ahmed, J. y Khan, H. (2012). Priming on embryo emergence and seedling (*Momordica charantia* L.) under suboptimal temperature. *Bangabandhu, Gazipur: International Journal of Agricultural Science*.
- Jadán, O., Cedillo, H., Zea, P., Peralta, Á., Tepán, B., Toledo, C., y Vaca, C. (2016). *Revista Científica*, (December).
- James, O. W. (1967). *Introducción a la fisiología vegetal*. Ediciones Omega S.A. Casanova, 220. Barcelona. 271-280.
- Jiménez, J. y Patiño, C. (2019). Tesis “Germinación, desarrollo inicial y supervivencia de plántulas bajo diferentes condiciones de almacenamiento de semillas de tres especies nativas de bosques del Parque Nacional Cajas”. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Joseph, A. y Delva, J. (2016). Tesis “Respuesta germinativa de cuatro especies forestales nativas del Macizo del Cajas”. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Lewak, S. y Khan, A. (1977). Mode of action of gibberellic acid and light on lettuce seed. *Plant Physiology* 60:575-577.
- Magnitskiy, S., y Ligarreto, G. (2011). El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y del ácido indolacético sobre la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 1(2), 137-141.
- Matilla, Á. (2015). *Desarrollo y germinación de las semillas*, (October 2008).
- Manjkhola, S., Dhar, U., y Rawal, R. (2003). Treatments to improve seed germination of *Arnebia benthamii*: an endangered medicinal herb of high altitude Himalaya. *Seed Science and Technology*. (Suiza). 31:571-577.
- Martínez, J., Castillo, G. y Nicolalde, F. (2015). *Flora de Veracruz, Clusiaceae*. Instituto de Ecología pag 1-2. Xalapa, Veracruz, México.



- Martin, A. (1946). The comparative internal morphology of seeds. *Amer.Midl.Nat.* 36: 513-660.
- Martins, L. y Da Silva, W. (2001). Comportamento da dormência em sementes de braquiária submetidas a tratamentos térmicos e químicos. *Pesq.Agrop. Bra.* 36. Pag. 997-1003.
- Melgarejo, L. (2012). Ecofisiología del cultivo de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, Colombia. Pag. 81-87.
- Mérola, R., & Díaz, S. (2012). Métodos , técnicas y tratamientos para inhibir dormancia en semillas de plantas forrajeras.
- Men, S., Yan, L., Liu, J., Qian, H., y Luo, Q. (2017). A Classification Method for Seed Viability Assessment with Infrared Thermography. *Sensors*, 17(4), 845. <https://doi.org/10.3390/s17040845>
- Menezes, P., Etenaldo, F., Menezes, D., Marques, E, y Oliveira, J. (2011). Quebra de dormência em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. *Idesia (Arica)*, 29(2), 39-45.
- Méndez, J.; Ysavit, L. y Merazo, J. (2007), Efecto de la inmersión de semillas (*Zea mays* L.) en agua a 100 °C sobre la germinación y crecimiento de plántulas bajo condiciones de laboratorio. *Tip: Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas.*, vol 10, num 2. Páginas: 56-64. México.
- Minga, D., y Verdugo, A. (2016). Árboles y arbustos de los ríos de Cuenca. Serie textos Apoyo a la Docencia Universidad del Azuay. Imprenta Don Bosco, Cuenca. Páginas 68, 69, 100, 101. Ecuador.
- Mota, J., Cueto, M. y Merlo, M. (2003). Flora amenazada de la Provincia de Almería. Universidad de Almería, vol 1, no 3, p.118 – 125. Almería, España.



- Navarro, M., Mesa, A., y González, Y. (2002). Capacidad germinativa de las semillas de *Albizia albizia lebbeck* (L.) Benth. II. ruptura de dormancia y emergencia de plántulas.
- Nikolaeva, M., Lyanguzova, I., y Pozdova, L. (1999). *Biology of seeds*. Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences.
- Ochoa, E. (2019). Tesis: Experimentos de germinación con semillas de Rañas, *Viburnum triphyllum* (Benth) y sus implicaciones para la propagación y restauración. Universidad del Azuay. Cuenca, Ecuador.
- Orantes, C., Pérez, M., Rioja, T., y Garrido, E. (2013). Viabilidad y germinación de semillas de tres especies arbóreas nativas de la selva tropical, Chiapas, México. *Polibotánica*, (36), 117-127. Recuperado en 10 de enero de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttextpid=S1405-27682013000200008&lng=es&lng=es.
- Orozco, A., Márquez, J., Sánchez, M., Gamboa, A., Baskin, J., y Baskin, C. (2007). Seed Anatomy and Water Uptake in Relation to Seed Dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Annals of Botany*. 99(4):581–592.
- Pérez, F., y Pita, J. M. (1998). Germinación de semillas. Hojas Divulgadoras. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España., (2090 HD), 1–20.
- Pérez, L. V., Rodríguez, N. A., Vargas, O., & Melgarejo, L. M. (2018). Germinación y dormancia de semillas. *Semillas de Plantas de Páramo: Ecología y Métodos de Germinación Aplicados a La Restauración Ecológica*, (July), 64–113. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/324808113_Germinacion_y_dormancia_de_semillas
- Piñuela, A., Guerra, Á., y Pérez, E. (2013). Guía para el establecimiento y manejo de viveros



agroforestales. Fundacion Danac, (July 2013), 40. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/278679789_GUIA_PARA_EL_ESTABLECIMIENTO_Y_MANEJO_DE_VIVEROS_AGROFORESTALES

Ramírez, M., Caraballo, B., Urdaneta, A., y García, D., (2013). Emergencia y desarrollo inicial de cuatro leguminosas forrajeras arbóreas presentes en la altiplanicie de Maracaibo, Venezuela. *Pastos y Forrajes*. Vol. 36(3). Páginas 303-312. Maracaibo, Venezuela. Recuperado en 19 de enero de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0864-039420130003000003&lng=es&lng=es.

Raz, R. y Clavero, T. (1996). Métodos de escarificación, en semillas de *Humboldtella ferruginea* y *Leucaena leucocephala*. *Rev. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia (Venezuela)*, 13:73-77

Roa, D. y Moreno, N. (2017). Tesis; Curvas de crecimiento y análisis de rasgos funcionales de especies arbóreas y arbustivas del área de propagación y vivero “La Florida” Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutes. Universidad Distrital Francisco José Caldas. Bogotá, Colombia.

Rodríguez, M., Tampe, J., Hormazábal, N., Araneda, X., Tighe, R. y Cárcamo, P. (2017). Efecto de la escarificación y estratificación sobre la germinación in vitro de *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz. *Gayana Bot.* 74(2), 282 – 287.

Román, F., Liones, R., Sautu, A., Deago, J. y Hall, J. (2012). Guía para la propagación de 120 especies de árboles nativos de Panamá y el Neotrópico. *Studies*. Pág. 83.

Romo, J. (2016). Evaluación del carbono en la biomasa de 3 especies forestales nativas (*Shiripe* – *Myrsine dependens*, *Rañás* – *Viburnum triphyllum*, *Yugyug* – *Miconia*



teaezans) en el bosque Aguarongo. Recuperado de:
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/11653>

Ruano, M. y Benavides, E. (2018). Evaluación de tasas de germinación, supervivencia y desarrollo de cuatro especies nativas altoandinas en vivero y en un área degradada en la provincia Carchi (Bachelor's thesis).

Ruiz, M. (2009). El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. *Publicación Técnica*, 77, 20.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2015.2160>

Salazar, S., y Gélvez, J. (2015). Determining the Viability of Orchid seeds using the Tetrazolio and Carmín Índigo. Tesis Determinación de la viabilidad de semillas de orquídeas utilizando la prueba de Tetrazolio e Índigo Carmín. *Rev. Ciencias Uvalle*, 19(2), 59–69.

Saldívar, P., Laguna, A., Gutiérrez, F., y Domínguez, M. (2010). Ácido giberélico en la Germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry. *Agronomía Mesoamericana*, 21(2), 327-331. Retrieved January 06, 2020, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212010000200012&lng=en&lng=es.

Salinas, A. R., Yoldjian, A. M., Craviotto, R. M., y Bisaro, V. (2001). ¿Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja? *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 36(2), 371–379.
<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001000200022>

Sánchez, A. (2002). Efecto del tratamiento con agua caliente e imbibición sobre la germinación de semillas de *L. leucocephala*. *Revista Científica*, 12.



- Sánchez, J.; Mejía, A. J. A; Hernández, A.; Peña, A. y Carballo, C. (2007). Acondicionamiento osmótico de semillas de tomate de cáscara. *Agric. Téc. Méx.* 33:115-123.
- Sánchez, J. A., Orta, R., y Muñoz, B. C. (2001). Tratamientos pre germinativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. *Agronomía Costarricense*, 25(1), 67-91.
- Santiago, A., Herranz, J., Copete, M., Herranz, R.I, y Ferrandis, P. (2017). Influencia de las condiciones de temperatura e iluminación en la rotura de latencia y germinación de los endemismos mediterráneos *Scilla paui* y *Scilla ramburei* (Liliaceae). *Bosque (Valdivia)*, 38(2), 271-283
- Schmidt, L. (2000). Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. Danida Forest Seed Centre.
- Seiffert, N.F (1982). Metodos de escarificacao de sementes de leguminosas forrageiras tropicais. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC). Campo Grande, BR. 1982. 6 p.
- Suárez, D., y Melgarejo, L. (2010). Biología y germinación de semillas. En L. M. Malgarejo (Ed). Universidad de Colombia. Bogotá, Colombia. Pág. 13-25.
- Smith, M., Wang. B. y Msanga, H. (2003). Dormancy and germination, In: Tropical tree seed manual. Reforestation, Nurseries y Genetics Resources, RNGR. Páginas 149 – 176.
- Tapia, A., y Toro, S. (2017). Evaluación de la germinación de pelotillo (*Viburnum triphyllum* Benth.), en el municipio de Pasto, Nariño.
- Torres, J., Medina, H. y Martínez, M. (2018). Germinación de semillas silvestres de *Apeiba glabra* Aubl. (Malvaceae) y crecimiento inicial de plántulas. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 19 (2), Pág. 323 - 335.



- Torres, J., Medina, H., y Guardia, M. (2018). Germinación y crecimiento inicial de *Hymenaea oblongifolia* and initial growth of *Hymenaea Oblongifolia* Huber in the municipality of Istmina, Germinação e crescimento inicial de *Hymenaea oblongifolia* Huber no município de Istmina , Chocó , 14(2), 230–242.
- Tomas, D. (2008). Estimación de poblaciones ecológica. Valencia, España: IES Abastos.
- Thomas, P. y Farjon, A. (2013). *Podocarpus sprucei*. The IUCN red list of threatened species.
- Varela, S. y Arana, V. (2010). Latencia y germinación de Semillas. Tratamientos pre germinativos. INTA. Cuadernillo No 3. Pág. 3-5.
- Vásquez, W., Pupiales, P., Viteri, P., Sotomayor, A., Feican, C., Campaña, D. y Viera, W. (2019). Chemical scarification and use of gibberelic acid for seed germination of balcberry cultivars (*Rubus glaucus* BENTH). INTERCIENCIA, vol. 44, num. 3. Pag. 159-164. Ecuador.
- Vidaurre, H. (1991). Efectos del Suelo, Topografía, Ancho de Faja y Tipo de Planton en el Crecimiento Inicial en Altura de Algunas Especies Forestales de la Amazonía Peruana. Pucalpa, Perú: INIAA.
- Viveros, H., Hernández, J., Velasco, M., Robles, R., Ruiz, C., Rentería, A., Martínez, M., Hernández, J. y Hernández, M. (2015) Análisis de semilla, tratamientos pre germinativos de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. y su crecimiento inicial. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. Vol. 6, pag 54 - 65. Veracruz, México.

12. ANEXOS

Anexo 1. Semillas maduras en campo (*P. sprucei*). **Anexo 2.** Semillas maduras en campo (*Clusia sp.*)



Anexo 3. Semillas maduras en campo (*V. triphyllum*).



Anexo 4. Etiquetado en campo de árboles de *P. sprucei*.



Anexo 5. Etiquetado en campo de árboles de *Clusia sp.*



Anexo 6. Etiquetado de árboles de *V. triphyllum*.



Anexo 7. Extracción de semillas de *P. sprucei*.



Anexo 8. Extracción de semillas de *Clusia sp.*



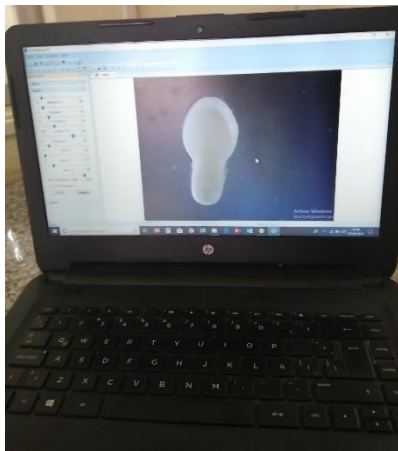
Anexo 9. Extracción de semillas de *V. triphyllum*.



Anexo 10. Uso de calibrador para medir semillas.



Anexo 11. Vista de embriones a través del programa Infinity analyze.



Anexo 12. Establecimiento del ensayo en el laboratorio (Fase de germinación).



Anexo 13. Disposición de las semillas en las cajas petri (Fase de germinación).



Anexo 14. Germinación de *P. sprucei* (Fase de germinación en laboratorio).



Anexo 15. Germinación de *Clusia sp.* (Fase de germinación en laboratorio).



Anexo 16. Germinación de *V. triphyllum* (Fase de germinación en laboratorio).



Anexo 17. Caja Petri contaminada (Fase de germinación en laboratorio).



Anexo 18. Monitoreo (Fase de desarrollo inicial) de *P. sprucei*.



Anexo 19. Monitoreo (fase de desarrollo inicial) de *Clusia sp.*



Anexo 20. Monitoreo (fase de desarrollo inicial) de *V. triphyllum*.



Anexo 21. Vista superior de *P. sprucei* (Fase de desarrollo inicial en invernadero).



Anexo 22. Vista superior de *Clusia sp.* (Fase de desarrollo inicial en invernadero).



Anexo 23. Vista superior de *V. triphyllum* (Fase de desarrollo inicial en invernadero).



Anexo 24. Vista frontal del ensayo (Fase de desarrollo inicial en invernadero).



Anexo 25. Ubicación de las especies muestreadas.

No de árbol	Especie	Código	Elevación	Coordenada X	Coordenada Y
1	<i>Podocarpus sprucei</i>	R-001	2760	714649.206	9655575.93
2	<i>Podocarpus sprucei</i>	R-002	2955	714661.775	9655276.08
3	<i>Podocarpus sprucei</i>	R-003	3008	714550.690	9654840.20
4	<i>Podocarpus sprucei</i>	R-004	3010	714532.041	9654673.68
5	<i>Podocarpus sprucei</i>	R-005	2658	714260.783	9654920.58
6	<i>Podocarpus sprucei</i>	R-006	3029	714349.089	9654393.32
7	<i>Podocarpus sprucei</i>	R-007	3034	714340.905	9654356.17
8	<i>Podocarpus sprucei</i>	R-008	3044	714306.966	9654278.71
9	<i>Podocarpus sprucei</i>	R-009	3052	714292.332	9654240.36
10	<i>Podocarpus sprucei</i>	R-010	3054	714314.675	9654238.66
1	<i>Clusia sp.</i>	D-001	2958	714668.484	9655236.47
2	<i>Clusia sp.</i>	D-002	2968	714600.418	9655040.07
3	<i>Clusia sp.</i>	D-003	2983	714535.110	9655013.42
4	<i>Clusia sp.</i>	D-004	2982	714486.146	9655048.24
5	<i>Clusia sp.</i>	D-005	3031	714295.873	9654413.10
6	<i>Clusia sp.</i>	D-006	3029	714193.794	9654401.46
7	<i>Clusia sp.</i>	D-007	3051	714241.905	9654205.17
8	<i>Clusia sp.</i>	D-008	3051	714277.628	9654224.79
9	<i>Clusia sp.</i>	D-009	3055	714339.974	9654212.40
10	<i>Clusia sp.</i>	D-010	3047	714348.736	9654261.60
1	<i>Viburnum triphyllum</i>	V-001	2937	714638.880	9655583.03
2	<i>Viburnum triphyllum</i>	V-002	2670	714362.243	9656782.29
3	<i>Viburnum triphyllum</i>	V-003	2815	714653.737	9656411.48
4	<i>Viburnum triphyllum</i>	V-004	2808	714813.298	9656363.52



5	<i>Viburnum triphyllum</i>	V-005	2814	714851.745	9656352.72
6	<i>Viburnum triphyllum</i>	V-006	2824	714827.266	9656280.88
7	<i>Viburnum triphyllum</i>	V-007	2860	714940.931	9656182.79
8	<i>Viburnum triphyllum</i>	V-008	2940	714615.430	9655466.17
9	<i>Viburnum triphyllum</i>	V-009	3001	714596.485	9654895.64
10	<i>Viburnum triphyllum</i>	V-010	3025	714358.577	9654414.09

	0	4	8	12	24	36	48		0	4	8	12	24	36	48
4	1.000	-	-	-	-	-	-	4	0.9997	-	-	-	-	-	-
8	0.958	0.997	-	-	-	-	-	8	0.9689	0.9994	-	-	-	-	-
12	0.807	0.958	1.000	-	-	-	-	12	0.4706	0.7934	0.9773	-	-	-	-
24	0.429	0.704	0.977	0.999	-	-	-	24	0.2175	0.5094	0.8515	0.9999	-	-	-
36	0.156	0.355	0.807	0.958	1.000	-	-	36	0.0232	0.0977	0.3262	0.9125	0.9915	-	-
48	0.075	0.203	0.627	0.864	0.993	1.000	-	48	0.0469	0.1697	0.4706	0.9689	0.9989	1.0000	-
72	0.010	0.039	0.229	0.468	0.837	0.984	0.998	72	0.0063	0.0333	0.1488	0.7262	0.9304	0.9999	0.9989
	<i>Clusia sp</i>								<i>Podocarpus sprucei</i>						

Anexo 26. Prueba de post hoc de peso de *Clusia sp* y *Podocarpus sprucei*

Anexo 27. Media del porcentaje y semanas a la germinación de *P. sprucei*, *Clusia sp* y *V. triphyllum*, del tratamiento con imbibición frente al testigo

Especies	Tratamiento	Porcentaje de germinación (%)		Tiempo a la germinación (semana)	
		Media	DE	Inicio	Final
<i>Podocarpus sprucei</i>	Imbibición	76	4,62	10	27
	Testigo	54	10,58	15	33
<i>Clusia sp.</i>	Imbibición	63	14,05	3	15
	Testigo	92	3,27	3	16
<i>Viburnum triphyllum</i>	Imbibición	72	14,61	16	37
	Testigo	58	12,00	22	37

Nota: Imbibición a las 72 horas; DE= Desviación estándar; n=4 (25 semillas por cada repetición)

**Anexo 28.** Fecha de inicio y fin de germinación de los tratamientos aplicados a *P. sprucei*

<i>Podocarpus sprucei</i>			
Tratamiento	Nivel	Inicio germinación (semana)	Final germinación (semana)
Ácido sulfúrico (minutos)	3	15	37
	5	15	37
	10	19	37
	12	15	37
Ácido giberélico (horas)	24	17	38
	36	21	37
	48	17	36
	7	15	37
Estratificación fría (días)	14	21	36
	21	18	35
	30	18	37
Estratificación caliente (°C)	40	19	35
	70	0	0
	Testigo	T	15

Anexo 29. Fecha de inicio y fin de germinación de los tratamientos aplicados a *Clusia sp.*

<i>Clusia sp</i>			
Tratamiento	Nivel	Inicio germinación (semana)	Final germinación (semana)
Ácido sulfúrico (minutos)	3	4	16
	5	4	16
	10	4	17
	12	4	17
Ácido giberélico (horas)	24	4	16
	36	4	17
	48	5	28
	7	3	15
Estratificación fría (días)	14	3	7
	21	3	12
	30	4	18
Estratificación caliente (°C)	40	0	0
	70	0	0
	Testigo	T	3



Anexo 30. Fecha de inicio y fin de germinación de los tratamientos aplicados a *V. triphyllum*

<i>Viburnum triphyllum</i>			
Tratamiento	Nivel	Inicio germinación (semana)	Final germinación (semana)
Ácido sulfúrico (minutos)	3	15	36
	5	22	36
	10	20	37
Ácido giberélico (horas)	12	21	34
	24	23	36
	36	25	37
Estratificación fría (días)	48	18	34
	7	18	34
	14	17	33
Estratificación caliente (°C)	21	16	32
	30	22	35
	40	23	35
Testigo	70	0	0
	T	22	37

Anexo 31. Tratamientos que no cumplieron con el número mínimo para desarrollar el 3er objetivo

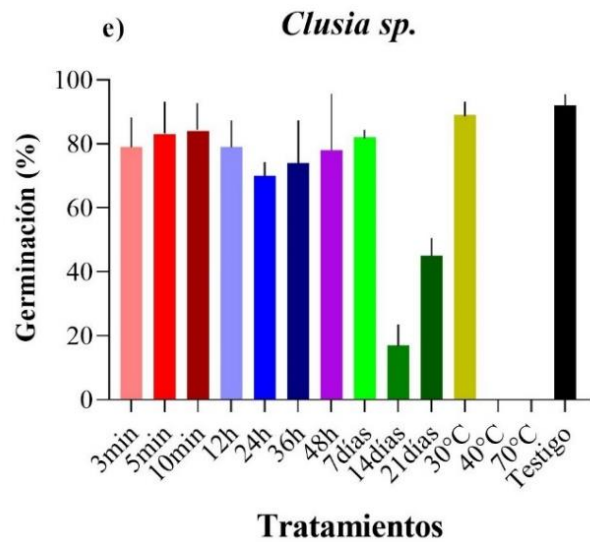
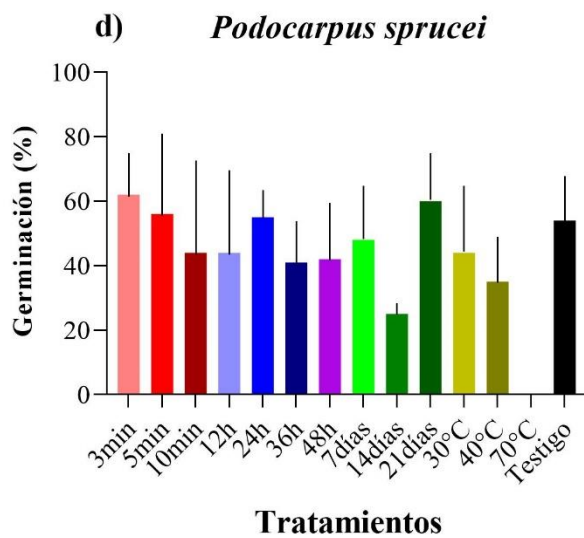
Especie	Tratamiento	Nivel	Repetición	Individuos Empleados	
<i>Clusia sp</i>	Estratificación fría (4 °C)	14 días	1	3	
			2	6	
			3	2	
			4	5	
<i>Podocarpus sprucei</i>	Inmersión en solución hormonal (Ácido giberélico 300 ppm)	12 horas	2	5	
			36 horas	1	2
			48 horas	2	7
	Escarificación ácida (Ácido sulfúrico al 10%)	5 minutos	4	8	
			10 minutos	2	7
			4	5	
Estratificación caliente (durante 12 horas)	30°C	7 días	3	6	
			4	4	
			2	5	
			1	6	
Estratificación fría (4 °C)	14 días	14 días	2	5	
			3	5	
			4	5	
			4	5	



Testigo		3	8
<i>Viburnum triphyllum</i>	12 horas	3	7
		4	8
	24 horas	1	7
		2	5
	36 horas	2	3
		4	4
	48 horas	1	3
		2	5
		4	8
	Estratificación caliente (durante 12 horas)	30°C	4
		2	4
Estratificación fría (4 °C)	7 días	3	8
		4	9
	14 días	1	8
		2	5
	3	5	
	4	4	
Testigo	4	9	

Anexo 32. Medias de la germinación de acuerdo a cada tratamiento (Fase de germinación en laboratorio - *P. sprucei*)

Anexo 33. Medias de la germinación de acuerdo a cada tratamiento (Fase de germinación en laboratorio. *Clusia sp.*)



Anexo 34. Medias de la germinación de acuerdo a cada tratamiento (Fase de germinación en laboratorio *V. triphyllum*).

