

Evaluación de germinación y dormancia de semillas de tres especies forestales nativas andinas en Azuay-Ecuador

Evaluation of germination and dormancy of seeds of three Andean native forest species in Azuay-Ecuador

Paulina G Villena-Ochoa ^{**} , Alain Joseph ^a, Jhonny Delva ^a, Oswaldo Jadán ^{a,b} , Álvaro Monteros-Altamirano ^c , Denisse F Peña-Tapia ^a , Ximena Palomeque ^a 

* Autor de correspondencia: ^a Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cuenca, Ecuador, tel.: 59 30998699130, paulina.villena@ucuenca.edu.ec

^b Universidad Rey Juan Carlos, Departamento de Biología, Geología, Física y Química Inorgánica, Móstoles, Madrid, España.

^c Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos, Quito, Ecuador.

SUMMARY

Physiological processes such as seed germination and dormancy under controlled conditions of Andean Forest species are poorly known. For this reason, the objective of the present study was to evaluate in three forest Andean species: *Myrcianthes rhopaloides*, *Oreocallis grandiflora*, and *Weinmannia fagaroides*, the pre-germination, chemical and physical treatments in relation to germination and dormancy. Firstly, the seeds were disinfected and placed in Petri dishes, to evaluate germination with: a) cold stratification, b) hot humid stratification, c) immersion in GA₃ at 270 ppm and d) acid scarification (immersion in 10 % H₂SO₄). In a growth chamber under controlled environmental conditions, germination was monitored for a period of 30 days. The seeds' physical dormancy was evaluated by an imbibition test. Morphological dormancy was evaluated using 100 seeds and 20 embryos per species that were extracted and measured with an electron stereoscope. The results show that the seeds of the species under study increased the percentage and speed of germination when gibberellic acid was applied compared to the other treatments, while the effect of acid scarification was significantly lower in all species. Likewise, it was found that the seeds lack physical and morphological dormancy, however, when analyzing the behavior of the seeds in acid, the presence of a physiological type of dormancy is suggested. These results support the knowledge of these Andean Forest species for the purposes of conservation and plant production for reforestation.

Keywords: *Myrcianthes rhopaloides*, *Oreocallis grandiflora*, *Weinmannia fagaroides* pre-germination treatments.

RESUMEN

Procesos fisiológicos como la germinación y dormancia en semillas bajo condiciones controladas de especies forestales andinas son escasamente conocidos. El objetivo de la presente investigación fue evaluar en tres especies forestales andinas: *Myrcianthes rhopaloides*, *Oreocallis grandiflora* y *Weinmannia fagaroides*, tratamientos pre-germinativos, químicos y físicos en relación con la germinación y dormancia. En primer lugar, las semillas fueron desinfectadas y luego colocadas en cajas Petri, para evaluar la germinación con: a) estratificación fría, b) estratificación caliente húmeda, c) inmersión en AG₃ a 270 ppm y d) escarificación ácida (inmersión en H₂SO₄ al 10 %). En una cámara de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas se monitoreó la germinación durante 30 días. La dormancia física de las semillas fue evaluada mediante una prueba de imbibición. La dormancia morfológica se evaluó utilizando 100 semillas y 20 embriones por especie que fueron extraídos y medidos con un estereoscopio electrónico. Los resultados muestran que las semillas de las especies en estudio incrementaron el porcentaje y velocidad de la germinación cuando se aplicó el ácido giberélico en comparación con los demás tratamientos, mientras que el efecto de la escarificación ácida fue significativamente menor en todas las especies. Así mismo, se encontró que las semillas carecen de dormancia física y morfológica, sin embargo, al analizar el comportamiento de las semillas en ácido se sugiere la presencia de una dormancia fisiológica. Estos resultados apoyan al conocimiento de esas especies forestales andinas con fines de conservación y producción de plantas para la reforestación.

Palabras clave: *Myrcianthes rhopaloides*, *Oreocallis grandiflora*, *Weinmannia fagaroides* tratamientos pre-germinativos.

INTRODUCCIÓN

Los Andes Tropicales en Sudamérica constituyen uno de los centros biodiversos más importantes del planeta (Rahbek *et al.* 2019). En esa región se ha identificado aproximadamente 45.000 especies de plantas vasculares con flores (Myers *et al.* 2000) que incluyen especies de árboles nativos y endémicos (Myers *et al.* 2000, Jadán *et al.* 2017). La propagación efectiva de semillas en especies importantes, permitirá contribuir estratégicamente en programas de conservación y restauración. Sin embargo, la información sobre la biología, fisiología, ecología y reproducción de algunas especies nativas leñosas son escasamente conocidas; por lo que se requiere desarrollar protocolos de germinación (Palomeque *et al.* 2017, Cavieres *et al.* 2017).

No se dispone de protocolos metodológicos para germinación de especies nativas andinas como: *Myrcianthes rhopaloides*, *Oreocallis grandiflora* o *Weinmannia fagaroides*. Estas especies tienen importancia social, ecológica y económica. *Myrcianthes rhopaloides* es conocido como huahual, arrayán, almanegra, chiso, chisa o riso; es una especie indicadora de características ambientales del hábitat y exclusiva de los Andes; esciófita, nativa de la región andina entre 1.500 y 3.800 m s.n.m. y alimento humano, avifauna, control erosión, protección riveras ríos y quebradas (Jadán *et al.* 2021); tiene uso maderable, medicinal y ornamental (Minga 2016, Jadán 2017). Por otro lado, *Oreocallis grandiflora* conocido como Gañal, Cucharillo, Galuay o boldo, es una especie de características ambientales del hábitat y exclusiva de los Andes, heliófita efímera, nativa de Perú y Ecuador entre 1.500 a 4.000 m s.n.m.; se usa para cercas vivas y es especie clave para biodiversidad de vertebrados (Jadán *et al.* 2021); además de su uso como maderable, medicinal, ornamental y artesanal (Minga 2016, Jadán *et al.* 2017). Finalmente, *Weinmannia fagaroides* conocida como Sarar, Cashco, Encino, Matache o Sara fino, es una especie indicadora de características ambientales del hábitat; exclusiva de los Andes, esciófita y se distribuye entre 2.200 y 3.300 m s.n.m.; se la usa para restauración ecológica y además tiene uso maderable y medicinal (Morales 2010, Minga 2016).

La germinación y dormancia son procesos fisiológicos que están determinados por varios factores endógenos y ambientales (Di Cecco *et al.* 2019) y son las fases iniciales y determinantes en la producción de plántulas Penfield (2017). Una semilla dormante tiene incapacidad de germinar en un periodo de tiempo bajo cualquier combinación de factores ambientales físicos normales tales como la temperatura, luz / oscuridad y disponibilidad de oxígeno (Baskin y Baskin 2007). Se han descrito cinco tipos de dormancia, la primera es la dormancia física, el segundo tipo se clasifica como morfológica, el tercero fisiológica, el cuarto corresponde a la dormancia morfo-fisiológica y finalmente, el quinto tipo es la combinada (física y fisiológica) (Baskin y Baskin 2004, Baskin y Baskin 2007, Baskin y Baskin 2014).

Métodos efectivos para eliminar la dormancia del primer tipo incluye como ejemplo, los ensayos de estratificación con calor de Al-Namazi *et al.* (2020) en *D. Viscosa* y Wang *et al.* (2017) en semillas de *Cistanche deserticola*. Para el segundo tipo de dormancia no se requiere un tratamiento *per se*, sin embargo, Cho *et al.* (2018) realizó estratificación húmeda en frío a 4 °C en *Cicuta virosa*. Para el tercer tipo de dormancia, según Baskin y Baskin (2007) y Baskin y Baskin (2014) se requiere tratamientos que promuevan la germinación, por ejemplo, la aplicación de ácido giberélico como en *Phoebe bournei* (Tiehua y Xiaohang 2020). Para el cuarto tipo de dormancia Wang *et al.* (2017) reportaron la ruptura de la dormancia en *C. deserticola* con estratificación en frío e inducción con Fluridone.

Para llenar vacíos de conocimiento y contribuir en programas de restauración, manejo y conservación *in situ* y *ex situ* se desarrolla la presente investigación, cuyos objetivos son: 1) evaluar la germinación y tiempo hasta la germinación aplicando cuatro tratamientos pre-germinativos: estratificación fría, estratificación caliente húmeda, inmersión en ácido giberélico y escarificación ácida, y; 2) evaluar la dormancia física mediante prueba de imbibición y dormancia morfológica; además, de caracterizar la ubicación y tipo de endospermo en el embrión.

METODOLOGÍA

Área de estudio. El área donde se colectaron las semillas de las tres especies incluye dos bosques montanos Mazán (BMz) y Llaviucu (BLL), ambos ubicados en el Parque Nacional El Cajas en la provincia del Azuay-Ecuador (figura 1).

Ecológicamente esos bosques pertenecen al Bosque Siempreverde Montano Alto (Sierra 1999); están ubicados altitudinalmente desde los 3.103 a 3.178 m s.n.m. En este ecosistema dentro de la provincia del Azuay se registra una precipitación promedio anual de 1.111 mm. (ETAPA EP, Estación meteorológica de la laguna de Llaviucu, Empresa Pública Municipal de Telecomunicaciones Agua Potable Alcantarillado y Saneamiento). El BMz registra una temperatura promedio anual de 10,05 °C, T_{\max} de 12,34 °C y T_{\min} de 7,25 °C; HR promedio de 94,83 %, HR_{\max} registrada 100 % y HR_{\min} de 71,42 %. El BLL registra una temperatura promedio anual de 9,66 °C, T_{\max} de 12,33 °C y T_{\min} de 6,88 °C; humedad relativa (HR) promedio de 94,89 %, HR_{\max} de 100 % y HR_{\min} de 77,42 %.

Colecta de especies seleccionadas. Los frutos de las tres especies seleccionadas: *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* fueron colectados de 8 árboles por cada especie, distribuidos en todo el contexto de los bosques Mazán y Llaviucu; se consideró una distancia mínima de 100 m entre sí y en cada árbol se cotejaron características fenotípicas superiores como: buen desarrollo de la copa del árbol, fuste recto, madurez fisiológica, tamaño y sanidad de los frutos.

Desinfección de semillas. Las semillas fueron lavadas en agua corriente durante tres a 10 minutos; a continuación, se agregó de tres a ocho gotas de jabón líquido, dependiendo del tamaño de las semillas y se procedió al lavado con abundante agua destilada. A las semillas se las sumergió en alcohol por uno a cinco minutos y finalmente se lavaron con abundante agua destilada.

Pruebas de viabilidad. Se realizó una prueba de viabilidad, para lo que se eliminó la testa de las semillas y extrajo los embriones; estos fueron sumergidos en una solución de tetrazolio ($C_{19}H_{15}ClN_4$) al 1 % por 24 horas en ausencia de luz y a una temperatura ambiente. Ese procedimiento permitió evaluar el porcentaje de viabilidad de las semillas según el patrón de coloración de los embriones; si los embriones reaccionan y tiñen de rojo se consideran viables, caso contrario se consideran no viables ISTA (2007).

Germinación – tratamientos – pre-germinativos. Las semillas desinfectadas fueron sometidas a los diferentes tratamientos pre-germinativos (cuadro 1). Posteriormente se colocaron en cajas Petri, sobre papel toalla para la evaluación de la germinación (figura 2). La protrusión de la radícula y emisión de los dos primordios foliares fueron considerados como criterios para el conteo de semillas germinadas y cálculo del porcentaje de germinación de acuerdo a las normas ISTA (2007).

Diseño experimental y análisis de datos. Para evaluar la germinación dentro de cada tratamiento pre-germinativo en cada especie, se utilizó un diseño completamente al azar con diferentes niveles de análisis (cuadro 1). En cada nivel se utilizó un total de 100 semillas, distribuidas en cuatro repeticiones con 25 semillas cada uno (unidad experimental). Las cajas Petri con las semillas fueron coloca-

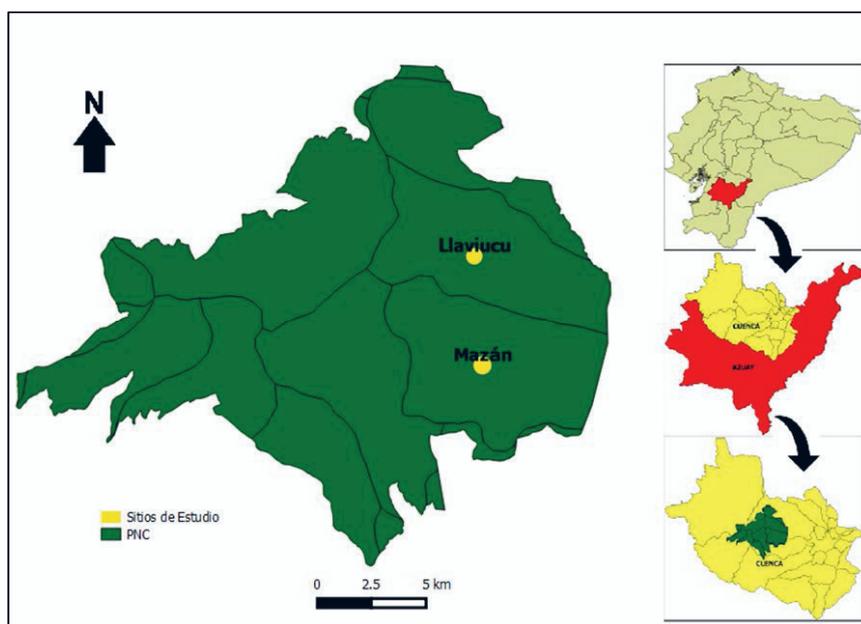


Figura 1. Ubicación de los sitios de colecta de semillas en los bosques montanos: Mazón (BMz) con coordenadas 18 S 708064; 9682048 y LLaviucu (BLI) con coordenadas 18 S 705650; 9685499 ubicados en el Parque Nacional El Cajas en la provincia del Azuay, Ecuador.

Location of seed collection sites in montane forests: Mazón (BMz) with coordinates 18 S 708064; 9682048 and LLaviucu (BLI) with coordinates 18 S 705650; 9685499 located in El Cajas National Park in the province of Azuay, Ecuador.

Cuadro 1. Tratamientos y tiempos de exposición (niveles) aplicados para evaluar la germinación por cada especie.

Treatments and exposure times (levels) applied to evaluate germination for each species.

Especie	Tratamientos pre-germinativos	Niveles de análisis
<i>Myrcianthes rhopaloides</i> , <i>Oreocallis grandiflora</i> , y <i>Weinmannia fagaroides</i>	Estratificación fría a 4 °C	7, 14 y 21 días
	Estratificación caliente húmeda (enfriar 12h)	30, 50 y 80 °C
	Inmersión en ácido giberélico AG ₃ a 270 ppm	12, 24, 36 y 48 horas
	Escarificación ácida (inmersión en H ₂ SO ₄ 1 %)	10, 30 y 60 minutos

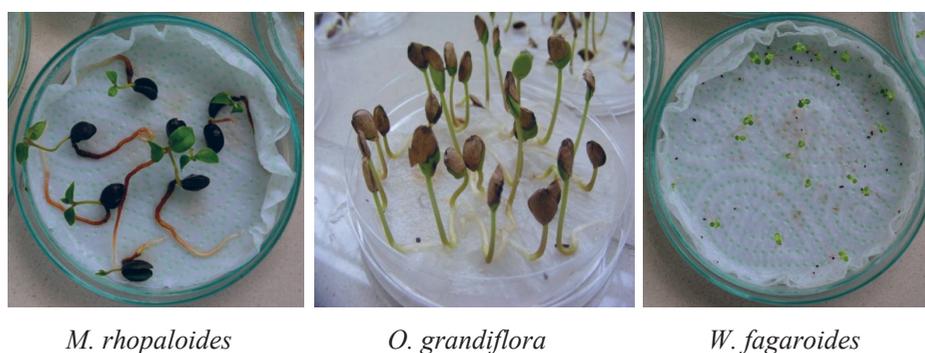


Figura 2. Fotografías que representan la germinación de semillas de *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* en cajas Petri, utilizando varias condiciones de estratificación con temperaturas, ácido giberélico y ácido sulfúrico.

Photographs representing the germination of *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* and *W. fagaroides* seeds, in Petri dishes, using various stratification conditions with temperatures, gibberellic acid and sulfuric acid.

das en un cuarto de crecimiento a 25 °C, 64 % de humedad relativa, 12 horas luz y 12 horas oscuridad para su posterior monitoreo de germinación. La evaluación se realizó en un periodo de 30 días, considerados a partir de la primera germinación. En cada especie: *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* para comparar el efecto de los niveles dentro de cada tratamiento (prueba de imbibición, estratificación fría, estratificación caliente, inmersión en GA_3 y escarificación ácida) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Las variables dependientes fueron el porcentaje de germinación y días hasta la germinación. Las distribuciones normales de los datos obtenidos fueron comprobadas mediante el test Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors Lilliefors (1967). La homogeneidad de varianza fue comprobada a través del test de Levene (Montgomery y Runger 2003). Se utilizó la prueba de Tukey (*Post hoc*, $P < 0,05$) para las comparaciones entre niveles (cuadro 2), aplicada desde el paquete estadístico SPSS 16.0 para Windows (SPSS Inc. Released 2007).

La dormancia de las semillas fue identificada en base al sistema de clasificación propuesto (Baskin y Baskin 2007). Para evaluar la dormancia física de las semillas se realizó una prueba de imbibición que consistió en sumergir en agua destilada las semillas durante 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas Orozco-Segovia *et al.* (2007). Esto permitió identificar la permeabilidad de la testa y su capacidad de absorción de agua en intervalos de tiempo progresivos. Esta prueba fue analizada mediante curvas de regresión con intervalo de confianza al 95 % para las medias del tiempo y el peso ganado de las semillas. La dormancia morfológica se la evaluó en base a la morfología embrionaria (embriones subdesarrollados o completamente desarrollados) y embriones diferenciados (presencia de cotiledones, hipocótilo-radícula) si los embriones no estuvieron desarrollados y/o subdesarrollados (pequeños) se clasificaron con dormancia morfológica (clave corregida por Baskin y Baskin 2007). Para ello, 100 semillas y 20 embriones por especie fueron medidos con un estereoscopio OLYMPUS SZ61, el

que está dotado de una cámara digital INFINITY ANALYZE y fueron clasificados con base a las características de sus tamaños (largo-ancho) expresados en milímetros (mm), tipo y ubicación del embrión y tipo de endospermo.

RESULTADOS

Viabilidad de las semillas (prueba de tetrazolio). La viabilidad de *M. rhopaloides* fue de 99 %, *O. grandiflora* 92 % y *W. fagaroides* 25 %.

Germinación con estratificación fría a 4 °C por 7, 14, 21 días. Con la estratificación fría a 4 °C, la germinación fue mayor significativamente ($P = 0,019$) para *M. rhopaloides* (figura 3A), que llega a un 91 % de germinación; para *O. grandiflora* puede llegar a un 69 % pero no es significativo. Para *W. fagaroides* (figura 3B y 3C) la germinación con estratificación fría es baja 11 %, no se observa respuesta significativa, sin embargo, este bajo porcentaje es similar al porcentaje de viabilidad observado en la muestra original. En las tres especies, se evidenció una disminución en los días hasta la germinación, conforme el tiempo de exposición se incrementaba (figura 3 D, E, F).

Germinación con estratificación caliente a 30, 50 y 80 °C (enfriar hasta 12 h). La germinación y días a la germinación, no fueron estadísticamente significativas con la estratificación caliente para *M. rhopaloides* y *O. grandiflora*, se obtuvieron porcentajes de germinación entre 64 y 70 %. Nuevamente las semillas de *W. fagaroides* presentaron bajo porcentaje de germinación (16 %) y diferencias estadísticas ($P = 0,030$) entre todos los niveles de la estratificación (control, 30 °C, 50 °C y 80 °C) (figura 4). De la misma manera, no hay diferencia estadística para tiempo de exposición en ninguna especie.

Germinación con ácido giberélico (GA_3 , 270 ppm) por 12, 24, 36 y 48 horas. Tras la aplicación del GA_3 se incremen-

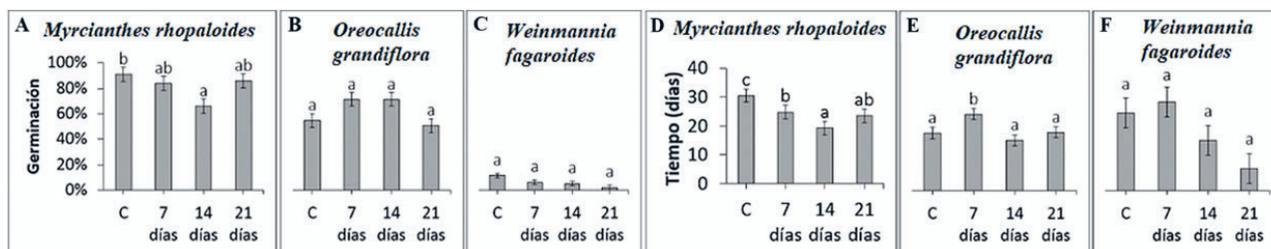


Figura 3. Promedios \pm error estándar de semillas germinadas y los días hasta la germinación para las especies *Myrcianthes rhopaloides* (A, D), *Oreocallis grandiflora* (B, E) y *Weinmannia fagaroides* (C, F) tras la aplicación de los distintos niveles de la estratificación fría. (C: Control, 7 días, 14 días, 21 días), n = 4.

Means \pm standard error of germinated seeds and days until germination for the species *Myrcianthes rhopaloides* (A, D), *Oreocallis grandiflora* (B, E) and *Weinmannia fagaroides* (C, F) after the application of the different levels of cold stratification. (C: Control, 7 days, 14 days, 21 days), n = 4.

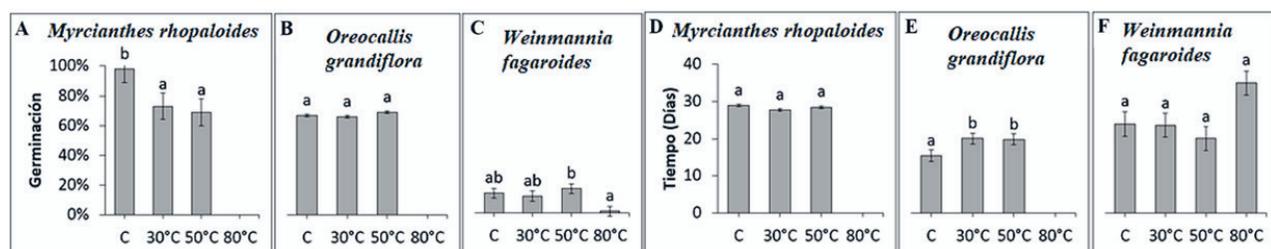


Figura 4. Promedios \pm error estándar de semillas germinadas y los días hasta la germinación para las especies *Myrcianthes rhopaloides* (A, D) *Oreocallis grandiflora* (B, E) y *Weinmannia fagaroides* (C, F) tras la aplicación de los distintos niveles de la estratificación caliente (C: control, 30 °C, 50 °C y 80 °C), n = 4.

Means \pm standard error of germinated seeds and days until germination for the species *Myrcianthes rhopaloides* (A, D) *Oreocallis grandiflora* (B, E) and *Weinmannia fagaroides* (C, F) after the application of the different warm stratification levels (C: control, 30 °C, 50 °C and 80 °C), n = 4.

to the number of germinated seeds in a significant way for all species (table 2). The highest average of germinated seeds with 24,75 seeds that indicates a 99% was recorded at 24 and 48 hours of immersion in GA₃ for *M. rhopaloides*. At 36 hours for *O. grandiflora* 24 seeds germinated (96%) and at 48 hours for *W. fagaroides* with 14 seeds (56% germination).

The immersion in GA₃ significantly ($P < 0,001$) reduced the number of days until germination, for the three species (table 2). For *O. grandiflora* the days until germination were statistically significant for the control, 12, 24, 36 and 48 hours ($P = 0,021$). In *W. fagaroides* the days until germination for the different levels of immersion were statistically significant ($P = 0,001$). The immersion for 36 hours was the level that presented the shortest time until germination (15 days).

Germinación con escarificación ácida (H_2SO_4 al 1%) por 10, 30 y 60 minutos. The variable of response in germination was not statistically significant with acid scarification for *M. rhopaloides* (germination between 40 and 70%) and *O. grandiflora* (20%). However, for *W. fagaroides* significant differences ($P = 0,001$) were recorded.

with an increase in the average of germinated seeds with immersion for three and five minutes (11,25 seeds – 45%). While for the response variable days until germination no significant differences were observed in the three species (figure 5 D, E, F).

Tipos de dormancia. The seeds of the three species studied present a permeable testa and therefore lack physical dormancy. These results were confirmed after the seeds were soaked in distilled water during 4, 8, 12, 24, 36, 48 and 72 hours; in the first four hours it was possible to evidence an increase in the weight of the seeds ($\geq 7\%$ of the initial weight in the three species). It was observed, in addition, that the seeds of the three species have the capacity to absorb water in progressive time intervals (figure 6). However, for *W. fagaroides* two groups of seeds were recorded; the first recorded a lower weight gain and the other a higher weight gain (figure 6B).

On the other hand, it was confirmed that the seeds of *O. grandiflora* and *M. rhopaloides* lack morphological dormancy because the embryos were completely developed and differentiated with the presence of cotyledons,

Cuadro 2. Efecto del tiempo de inmersión en ácido giberélico (270 ppm) sobre el número de semillas germinadas en 12, 24, 36 y 48 horas para las especies *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*.

Effect of immersion time in gibberellic acid (270 ppm) on the number of germinated seeds in 12, 24, 36 and 48 hours for the species *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* and *W. fagaroides*.

Variable	Tiempo de inmersión en GA ₃ (h)				
	0	12	24	36	48
<i>M. rhopaloides</i>					
MNSG	22 ab (88 %)	22 ab (88 %)	24,75 b (99 %)	21,5 a (86 %)	24,75 b (99 %)
MTG	29 c	30 c	25,75 b	27 b	24 a
<i>O. grandiflora</i>					
MNSG	20 a (80 %)	23,25 ab (93 %)	22,25 ab (89 %)	24 b (96 %)	23 ab (92 %)
MTG	14 b	12,25 ab	13,5 ab	11,5 a	12 ab
<i>W. fagaroides</i>					
MNSG	4,74 a (18,96 %)	8,25 ab (33 %)	7,5 ab (30 %)	4,75 a (19 %)	14 b (56 %)
MTG	21,75 b	16 a	18,25 ab	14,75 a	17,25 a

MNSG = media del número de semillas germinadas, MTG = media del tiempo de germinación en días, n = número de repeticiones, P < 0,05.

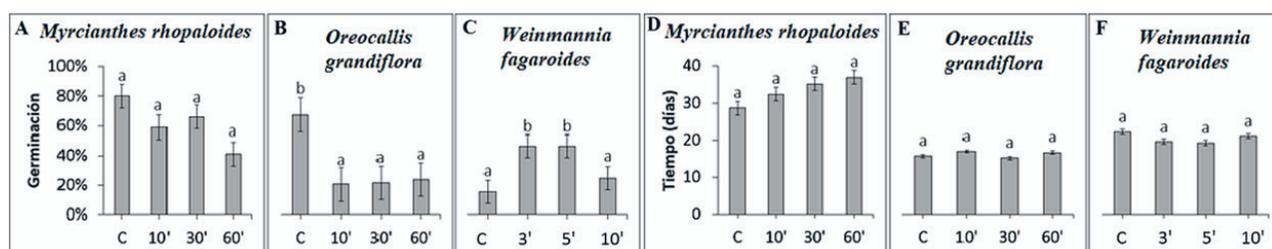


Figura 5. Promedio ± error estándar del número de semillas germinadas y los días hasta la germinación para las especies *Myrcianthes rhopaloides* (A, D), *Oreocallis grandiflora* (B, E) y *Weinmannia fagaroides* (C, F) tras la aplicación de los distintos niveles de inmersión en H₂SO₄ (control, 10, 30 y 60 min), n = 4.

Mean ± standard error of the number of germinated seeds and days to germination for the species *Myrcianthes rhopaloides* (A, D), *Oreocallis grandiflora* (B, E) and *Weinmannia fagaroides* (C, F) after application of the different levels of immersion in H₂SO₄ (control, 10, 30 and 60 min), n = 4.

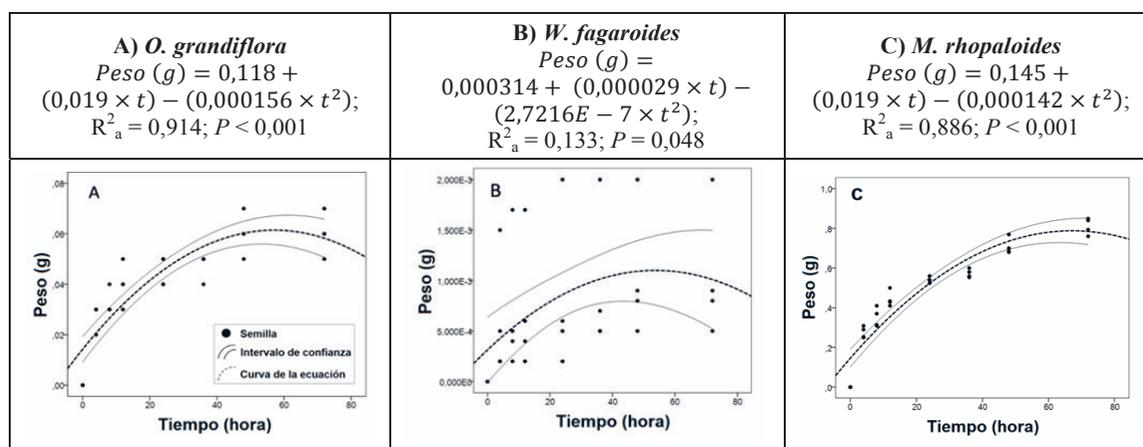


Figura 6. Curvas de regresión con intervalo de confianza al 95 % para las medias del tiempo y el peso ganado de las semillas de las especies *O. grandiflora* (A), *W. fagaroides* (B) y *M. rhopaloides* (C) n = 4; R²_a: Coeficiente de determinación ajustado; P: Valor de significación del modelo.

Regression curves with 95 % confidence interval for the means of time and weight gained from the seeds of the species *O. grandiflora* (A), *W. fagaroides* (B) and *M. rhopaloides* (C) n = 4; R²_a: Adjusted determination coefficient; P: Significance value of the model.

hipocótilo-radícula (figura 7 A, C). En *W. fagaroides* se evidenció embriones desarrollados y subdesarrollados.

El tamaño de embriones registrados para *O. grandiflora* fue de $1,74 \pm 0,26$ mm de largo y de $0,84 \pm 0,08$ mm de ancho, el embrión es dicotiledóneo (figura 7A). Para *M. rhopaloides* el tamaño de embrión fue de $2,84 \pm 0,44$ mm de largo y de $1,83 \pm 0,34$ mm de ancho, el embrión o parte de él es periférico con respecto al endospermo (figura 7B). En *W. fagaroides* el tamaño medio de la semilla fue de $0,79 \pm 0,07$ de largo y $0,49 \pm 0,04$ mm de ancho, los embriones no se midieron por ser muy pequeños < 1 mm. El endospermo para *W. fagaroides* es deficiente generalmente un radio E: S de $> 0,5$, debido a que el embrión es grande en relación al endospermo y sus cotiledones no son expandidos, el embrión es más largo que ancho (figura 7C).

DISCUSIÓN

Viabilidad y germinación. La respuesta de las semillas de las especies *Myrcianthes rhopaloides*, *Oreocallis grandiflora* y *Weinmannia fagaroides* a los diferentes tratamientos de este estudio permite determinar características relacionadas con su germinación y dormancia. La importancia de entender estos mecanismos se basa en las implicaciones para su conservación, reproducción y/o restauración ecológica una vez que las tres especies están dentro de las 15 especies representativas de los bosques secundarios alto andinos del Azuay-Ecuador (Jadán *et al.* 2017, Jadán *et al.* 2021).

La prueba de viabilidad de tetrazolio França-Neto *et al.* (2019) es efectiva y demuestran el buen estado fisiológico de las semillas en estudio de *M. rhopaloides* y *O. grandiflora*, sin embargo, la muestra de *W. fagaroides* presenta una viabilidad inicial baja. El porcentaje de germinación obtenido bajo estratificación fría, caliente y ácida reflejan la tendencia establecida con el tetrazolio.

Sin embargo, son un poco más bajas en relación a datos de germinación reportados por Limaico Torres (2018) para *M. rhopaloides* (82,5 %) o Palomeque *et al.* (2017), para las especies: *O. grandiflora* (43 y 91 %) y *M. rhopa-*

loides (36 y 98 %), aunque en estas investigaciones no se describe el método de germinación utilizado, dificultando la comparación con este estudio. De cualquier manera, si consideramos que la prueba de tetrazolio se basa en un muestreo aleatorio, existe la posibilidad de que la germinación intermedia de *O. grandiflora* se deba a la calidad de la muestra total, una vez que esta especie tiene una baja fructificación e incluso de frutos abortivos Cárdenas-Calle (2020). La baja germinación en *W. fagaroides* está relacionada con el estado fisiológico inicial de la muestra de semillas (resultados de tetrazolio). También existe la posibilidad de que la baja germinación pueda estar relacionado con la presencia de semillas vanas o vacías en la muestra, debido a la biología reproductiva de las especies, por ejemplo, la autopolinización que es causa principal para el desarrollo de semillas vanas dado el incremento de genes letales y como consecuencia, la muerte de los embriones Willson (1983).

Estratificación de temperaturas. Las condiciones óptimas de germinación de cualquier semilla están relacionadas con las condiciones climáticas en las que se desarrollan naturalmente Dürr *et al.* (2015). Las tres especies de este estudio se desarrollan en temperaturas máximas entre 14 y 16 °C y mínimas entre 3,8 y 5,2 °C (Jadán *et al.* 2021). Sin embargo, contrario a lo que se espera en las especies estudiadas, la aplicación de la estratificación fría a 4 °C durante 7, 14 y 21 días disminuye el porcentaje de germinación para *O. grandiflora* y *W. fagaroides* mientras que se incrementa en *M. rhopaloides*. Según Dey *et al.* (2019) factores como la temperatura, la humedad y los tiempos de exposición son importantes tanto para inducir la dormancia de las semillas como para romperla. Es posible entonces que la temperatura baja, induce a dormancia a las especies *O. grandiflora* y *W. fagaroides*. En vista de que los procesos ecológicos de adaptación de las especies tienden a que la germinación suceda en las mejores condiciones para asegurar su reproducción Bareke (2018) y adaptarse así a los cambios ambientales Donohue *et al.* (2010).

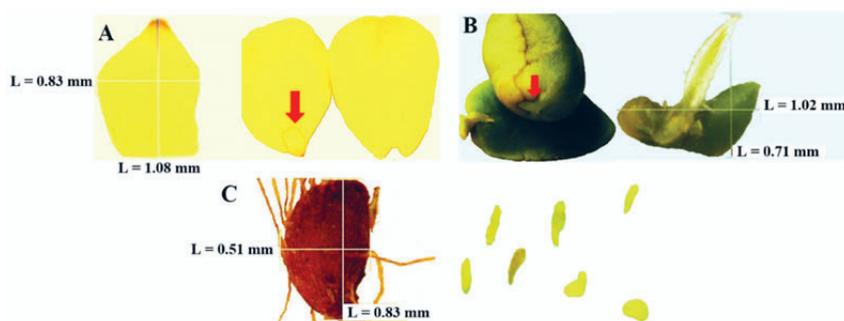


Figura 7. Ilustración de las semillas y embriones de las especies: A) *O. grandiflora* (Proteaceae), B) *W. fagaroides* (Cunoniaceae), y C) *M. rhopaloides* (Myrtaceae).

Illustration of seeds and embryos of the species: A) *O. grandiflora* (Proteaceae), B) *W. fagaroides* (Cunoniaceae), and C) *M. rhopaloides* (Myrtaceae)

Por otro lado, se ha reportado que la estratificación con calor húmedo mejora significativamente la germinación de semillas de varias especies (Rodrigues-Junior *et al.* 2014, Botsheleng *et al.* 2014). No obstante, en el presente estudio los tratamientos con escarificación caliente no mejoran la germinación en ninguna de las tres especies. Este comportamiento resulta similar para especies forestales tales como *Pycnanthus angolensis*, *Terminalia superba*, *Mansonia altissima* y *Pterygota macrocarpa* cuyas semillas no tratadas y que se mantenían en inmersión de agua a temperatura ambiente producen una mayor tasa de germinación en comparación con las tratadas en agua a 100 °C por 12 y 24 horas Akaffou *et al.* (2021). Altas temperaturas y tiempos prolongados de exposición (12 y 24 h) dañan el embrión y vuelven a una semilla inviable (Müller *et al.* 2017, Akaffou *et al.* 2021).

Inmersión en ácido giberélico GA_3 . En este estudio, al aplicar ácido giberélico GA_3 , la germinación muestra un incremento significativo y reducción significativa en el número de días hasta la germinación en las tres especies. Estos resultados coinciden con Grzesik *et al.* (2017), Linkies y Leubner, (2012) y Di Cecco *et al.* (2019) quienes afirman que el GA_3 no solo promueve la germinación de las semillas, sino que se considera un método fácil, eficaz y barato para romper la dormancia. Los ácidos giberélicos (AGs) son potentes estimuladores de la germinación de las semillas y capaces de contrarrestar el efecto del ácido abscísico (ABA) (Linkies y Leubner 2012). El ABA es una fitohormona inhibidora de la germinación de la semilla durante la maduración del embrión, originando la dormancia de las semillas en muchas especies de plantas Penfield (2017); por lo tanto, el inicio de la germinación depende de la proporción de ABA y GA_3 presentes en las semillas. El GA_3 activa varios procesos fuertemente correlacionados con la inducción, el mantenimiento y la ruptura de la dormancia en semillas maduras, además, de la expansión y desarrollo del embrión y la movilización de reservas de nutrientes almacenadas Chen *et al.* (2008).

Escarificación en ácido sulfúrico. La escarificación ácida con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1 %, no es efectiva para la germinación de *M. rhopaloides* y *O. Grandiflora* ya que a mayor tiempo de exposición disminuye la germinación de las semillas. En ciertos casos este tratamiento reduce la germinación de las semillas, en relación a los controles en los estudios de Naim *et al.* (2015) en *Crotalaria senegalensis*, o Mandujano *et al.* (2005) en *Opuntia rastrera*. Esta disminución en la germinación puede deberse a la penetración del ácido dentro de la semilla ocasionando un daño físico o químico al embrión Zarchini *et al.* (2011). Se afirma, considerar la temperatura, la concentración del ácido, la duración del tiempo en remojo y el tipo de semilla cuando se trabaja con escarificación ácida (Warakogoda y Subasinghe 2015). Las concentraciones y los tiempos

de exposición utilizados en este estudio posiblemente no son los adecuados y causan daños a los embriones de las semillas.

Dormancia. Las semillas de *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides* muestran absorción de agua al poco tiempo después de ser embebidas, lo cual indica permeabilidad de la testa. Orozco-Segovia *et al.* (2007) indican que las pruebas de imbibición son los únicos métodos para saber si las semillas tienen o no una capa permeable. Baskin y Baskin (2007, 2014) indican que la dormancia física de la semilla es causada por capas impermeables externas de las semillas, es decir, que los resultados de imbibición sugieren que las especies estudiadas no presentan este tipo de dormancia.

En relación a la dormancia morfológica, Baskin y Baskin 2007 manifiestan que se da cuando existen embriones subdesarrollados, inmaduros y no desarrollados en términos de tamaño. Las características del tamaño de los embriones de este estudio permiten clasificar a las semillas de *O. grandiflora*, *M. rhopaloides* y *W. fagaroides* con embriones desarrollados, lo que confirma que las tres especies carecen de dormancia morfológica. La dormancia morfológica atrasa el crecimiento del embrión, desarrollo y actividad física de la semilla a causa del descenso de la actividad metabólica (Baskin y Baskin 2007, Baskin y Baskin 2014).

La dormancia fisiológica es la razón principal para que una semilla embebida no logre germinar a pesar de tener embriones completamente desarrollados Orozco-Segovia *et al.* (2007). Por lo tanto, los resultados de la germinación tras la aplicación de ácido giberélico, sugieren la presencia una dormancia fisiológica para las tres especies. Baskin y Baskin 2007, Baskin y Baskin 2014 manifiestan que las semillas con dormancia fisiológica son permeables al agua y tienen un embrión completamente desarrollado con un mecanismo de inhibición fisiológico que previene la emisión de la radícula.

CONCLUSIÓN

En conclusión, nuestros resultados permiten comprender las características de germinación y dormancia en semillas de 3 especies nativas de importancia ecológica para los Andes: *M. rhopaloides*, *O. grandiflora* y *W. fagaroides*. El tratamiento pregerminativo con ácido giberélico muestra un incremento significativo en los porcentajes y velocidad de germinación por lo que puede ser recomendado para la propagación de las dos primeras especies. El caso de *W. fagaroides* necesita ser estudiado a más profundidad, una vez que la muestra original no tiene mucha viabilidad y la germinación refleja esta característica. Ninguna de las especies presenta dormancia física, ni morfológica, pero si se sugiere la presencia de dormancia fisiológica, aunque se requiere de futuros ensayos para confirmar y validar estos resultados.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

PV: dirección de trabajo de investigación, campo, laboratorio y redacción; AJ y JD: trabajo de campo y laboratorio, toma de datos y análisis de resultados; OJ: revisión, edición, interpretación de resultados; AMA: discusión y edición; DP: revisión y actividades de laboratorio; XP: Gestión y administración de proyecto, estadística y análisis experimental, revisión y edición.

FINANCIAMIENTO

La investigación fue financiada por La Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC) en el marco del proyecto “Efectos del cambio climático en la capacidad germinativa de semillas y producción de plántulas de especies forestales nativas andinas en la provincial del Azuay”.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC) por el financiamiento del estudio, al Ministerio del Ambiente por los permisos de investigación (N° 105-16-IC-FLO-DPMA/MA) y Empresa de Telecomunicaciones, Agua Potable, Alcantarillado y saneamiento de Cuenca ETAPA EP por el apoyo logístico. Al profesor Dr. Jean Feyen por los comentarios y correcciones al manuscrito, y a los revisores anónimos por sus acertadas observaciones.

REFERENCIAS

- Al-Namazi AA, BS Al-Ammari, AJ Davy, TA Al-Turki. 2020. Seed dormancy and germination in *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) from south-western Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27(9), 2420-2424. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.036>
- Akaffou SD, AK Kouame, NB Boh Gore, GY Abessika, HK Kouassi, P Hamon, S. Sabatier, J Duminiel. 2021. Effect of the seeds provenance and treatment on the germination rate and plants growth of four forest trees species of Côte d'Ivoire. *Journal of Forest Research* 32: 161-169. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01064-y>
- Bareke T. 2018. Biology of seed development and germination physiology. *Adv. Plants Agric. Res.* 8(4): 336-346. DOI: <https://doi.org/10.15406/apar.2018.08.00335>
- Baskin JM, CC Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14 (1) : 1-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1079/SSR2003150>
- Baskin CC, JM Baskin. 2007. A revision of Martin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. *Seed Science Research* 17(1): 11-20. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258507383189>
- Baskin CC, JM Baskin. 2014. Germination ecology of seeds with morphophysiological dormancy. In: *Seeds Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination* (2a ed.). San Diego, CA, US. Elsevier pag. 119-143.
- Botsheleng B, T Mathowa, W Mojeremane. 2014. Effects of pre-treatment methods on the germination of Pod Mahogany (*Azzeria quanzensis*) and Mukusi (*Baikiaea plurijuga*) seeds. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* 3(1): 8108-8113.
- Cárdenas-Calle S, JD Cárdenas, BO Landázuri, G Mogrovejo, AM Crespo, N Breitbach, M Schleuning, BA Tinoco. 2020. Pollinator effectiveness in the mixed-pollination system of a Neotropical Proteaceae, *Oreocallis grandiflora*. *Journal of Pollination Ecology* 26(5): 38-46. DOI: [https://doi.org/10.26786/1920-7603\(2020\)601](https://doi.org/10.26786/1920-7603(2020)601)
- Cavieres LA, A Sierra-Almeida. 2017. Assessing the importance of cold stratification for seed germination in alpine plant species of the High-Andes of central Chile. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 30: 125-131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2017.09.005>
- Chen SY, SR Kuo, CT Chien. 2008. Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (*Myrica rubra*) seeds. *Tree Physiology* 28(9): 1431-1439. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/28.9.1431>
- Cho JS, BK Jang, CH Lee. 2018. Seed dormancy and germination characteristics of the endangered species *Cicuta virosa* L. in South Korea. *Horticulture Environment and Biotechnology* 59: 473-481 DOI: <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0062-7>
- Dürr C, JB Dickie, XY Yang, HW Pritchard. 2015. Ranges of critical temperature and water potential values for the germination of species worldwide: contribution to a seed trait database. *Agricultural and Forest Meteorology*. 200: 222-232. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2014.09.024>
- Dey DC, BO Knapp, MA Battaglia, RL Deal, JL Hart, KL O'Hara, CJ Schweitzer, TM Schuler. 2019. Barriers to natural regeneration in temperate forests across the USA. *New Forests* 50: 11-40. DOI : <https://doi.org/10.1007/s11056-018-09694-6>
- Di Cecco V, M Di Musciano, A Frattaroli, L Di Martino. 2019. Seed ecology of *Saxifraga italica*: effects of light, temperature and gibberellic acid. *Folia Geobot* 54: 139-150. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12224-019-09352-5>
- Donohue K, R Rubio de Casas, L Burghardt, K Kovach, CG Willis. 2010. Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annual review of ecology, evolution, and systematics* 41: 293-319. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144715>
- França-Neto JDB, FC Krzyzanowski. 2019. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science* 41: 359-366. DOI: <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n3223104>
- Grzesik M, K Górnik, R Janas, M Lewandowki, Z Romanowska-Duda, B van Duijn. 2017. High efficiency stratification of apple cultivar Ligol seed dormancy by phytohormones, heat shock and pulsed radio frequency. *Journal of Plant Physiology* 219: 81-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.09.007>
- ISTA (International Seed Testing Association, CH). 2007. Tetrazolium test. In *International Seed Testing Association eds. International Rules for Seed testing*. Wallisellen, Suiza. p. 6-10.
- Jadán O, C Toledo, B Tepán, H Cedillo, A Peralta, P Zea, P Castro, C Vaca. 2017. Forest communities in high Andean secondary forests (Azuay, Ecuador). *Bosque* 38(1): 141-154. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002017000100015>

- Jadán, O, D Donoso, H Cedillo, F Bermúdez, O Cabrera. 2021. Floristic Groups, and Changes in Diversity and Structure of Trees, in Tropical Montane Forests in the Southern Andes of Ecuador. *Diversity* 13(9): 400. DOI: <https://doi.org/10.3390/d13090400>
- Li T, X Min. 2020. Dormancy characteristics and germination requirements of *Phoebe bournei* seed. *Scientia Horticulturae* 260, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108903>
- Lilliefors HW. 1967. On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown. *Journal of the American Statistical Association* 62(318): 399-402. DOI: <https://doi.org/10.1080/01621459.1967.10482916>
- Limaico DE. 2018. Evaluación de métodos de desinfección y control de la fenolización en semillas de arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*) para la germinación “in vitro”. Tesis de Ingeniero en Biotecnología. Ibarra, Ecuador. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y ambientales. Universidad Técnica del Norte. 68 p.
- Linkies A, Leubner-Metzger G. 2012. Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports* 31(2): 253-270. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1180-1>
- Mandujano MC, C Montaña, M Rojas-Aréchiga. 2005. Breaking seed dormancy in *Opuntia rastrera* from the Chihuahuan desert. *Journal of Arid Environments* 62(1): 15-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2004.10.009>
- Mínga D, A Verdugo. 2016. Árboles y arbustos de los ríos de Cuenca. Serie Textos Apoyo a la Docencia Universidad del Azuay. Cuenca, Ecuador. Imprenta Don Bosco.
- Myers N, RA Mittermeier, CG Mittermeier, GA Da Fonseca, J Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858. DOI: <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Morales, J. F. 2010. Sinopsis del género *Weinmannia* (Cunoniaceae) en México y Centroamérica *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 67(2): 137-155 DOI: <https://doi.org/10.3989/ajbm.2247>
- Montgomery, D. C. and Runger, G. C. 2003. Applied Statistics and Probability for Engineers. New York (USA). 976 p.
- Naim AH, AA El Hadi, AF El Gasim. 2015. Evaluation of different pre-sowing seed treatments to break dormancy of *Crotalaria senegalensis*, a famous rangeland forage in Sudan. *Asian Journal of Plant Science and Research* 5(10): 16-21.
- Orozco-Segovia A, Márquez-Guzmán J, Sánchez-Coronado ME, Gamboa de Buen A, Baskin JM, Baskin CC. 2007. Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Annals of Botany* 99(4): 581-592. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcm001>
- Palomeque X, A Maza León, JP Iñamagua, S Günter, P Hildebrandt, M Weber, B Stimm. 2017. Intraspecific variability in seed quality of native tree species in mountain forests in Southern Ecuador: Implications for forest restoration. *Revista de Ciencias Ambientales* 51(2): 52-72 DOI: <https://doi.org/10.15359/rca.51-2.3>
- Penfield S. 2017. Seed dormancy and germination. *Tropical Journal of Environmental Science* 51(2): 52-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.050>
- Rahbek C, MK Borregaard, A Antonelli, RK Colwell, B Holt, D Nogues-Bravo, K Richardson, M Rosing, RJ Whittaker, J Fjeldsa. 2019. Building mountain biodiversity: Geological and evolutionary processes. *Science* 365: 1114-1119. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aax0151> PMID: 31515384
- Rodrigues-Junior AG, JMR Faria, TAA Vaz, AT Nakamura, AC José. 2014. Physical dormancy in *Senna multijuga* (Fabaceae: Caesalpinioideae) seeds: the role of seed structures in water uptake. *Seed Science Research* 24(2): 147-157. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258514000087>
- SPSS Inc. 2007. SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc. Available http://www.unimuenster.de/imperia/md/content/ziv/service/software/spss/handbuecher/englisch/spss_brief_guide_16.0.pdf
- Sierra R. 1999. Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental. Proyecto INEFAN/GEF y Ecociencia. Quito, Ecuador. 194 p. DOI: <https://doi.org/10.13140/2.1.4520.9287>
- Wang J, JM Baskin, CC Baskin, G Liu, X Yang, Z Huang. 2017. Seed dormancy and germination of the medicinal holoparasitic plant *Cistanche deserticola* from the cold desert of northwest China. *Plant Physiology and Biochemistry* 115: 279-285 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.010>
- Warakagoda PS, S Subasinghe. 2015. Studies on seed germination of *Coscinium fenestratum* (Menispermaceae): A threatened medicinal plant. *International Journal of Minor Fruits, Medicinal and Aromatic Plants* 1(1): 37-46.
- Willson MF. 1983. Plant reproductive ecology. Nueva York, USA. John Wiley & Sons. 282 p.
- Zarchini M, D Hashemabadi, B Kaviani, PR Fallahabadi, N Negahdar. 2011. Improved germination conditions in *Cycas revoluta* L. by using sulfuric acid and hot water. *Plant Omics Journal*, 4(7): 350-353.

Recibido: 02.10.23
Aceptado: 23.12.23